

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Wenz)

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

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Juliane Nehring  
aus  
Dresden  
2016

Dekan: Herr Prof. Dr. Sergij Goerd  
Referent: Herr Prof. Dr. Patrick Maier

*Für Oliver*

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
1 EINLEITUNG .....	4
1.1 Bestrahlung in der Tumorthherapie .....	4
1.2 Strahlenbiologie .....	6
1.3 Strahlensensibilisierung und Radioprotektion durch Gentherapie .....	11
1.4 MDR1 und Caveolin-1 als Radioprotektoren .....	17
1.5 Das TK6-Zellmodell .....	23
1.6 Ziele .....	24
2 MATERIAL .....	25
2.1 Geräte .....	25
2.2 Verbrauchsmaterial .....	26
2.3 Chemikalien und kommerzielle Lösungen .....	27
2.4 Puffer und Lösungen .....	29
2.5 Kits .....	32
2.6 Enzyme und Reagenzien .....	32
2.7 Primer .....	32
2.8 Vektoren .....	33
2.9 Inhibitoren .....	33
2.10 Antikörper .....	34
2.11 Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	35
2.12 Zellen .....	36
3 METHODEN .....	37
3.1 Zellbiologische Methoden .....	37
3.2 Virusarbeiten und Etablierung von TK6 Zellmodellen .....	38
3.3 Proteinbiochemische Methoden .....	42
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	45
3.5 Zellbehandlung .....	49
3.6 Analysen zum Zellüberleben nach Bestrahlung .....	50
3.7 Co-Lokalisationsstudien .....	52
3.8 Statistische Auswertung .....	56

4	ERGEBNISSE .....	57
4.1	Etablierung der Zellmodelle .....	57
4.2	Funktionelle Studien zur gleichzeitigen Überexpression von CAV1 und MDR1 .....	64
4.3	Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 nach Bestrahlung .....	87
4.4	Rolle der Phosphorylierung von CAV1 an Tyrosin 14.....	96
5	DISKUSSION .....	113
5.1	Etablierung der Zellmodelle .....	113
5.2	Bedeutung der gleichzeitigen Expression von CAV1 und MDR1 für die Strahlenantwort .....	114
5.3	Co-Lokalisation.....	121
5.4	Bedeutung der Phosphorylierung von CAV1 an Tyrosin 14 nach Bestrahlung .....	123
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	128
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	130
8	TABELLARISCHER ANHANG .....	133
9	LITERATURVERZEICHNIS .....	134
10	LEBENS LAUF .....	153
11	DANKSAGUNG .....	154

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
2A	2A Peptidsequenz des FMD Virus
A	Ampere
A	Adenosin
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytidin
CAV1	Caveolin-1
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i> , Protein mit verstärkter Grünfluoreszenz
et al.	und andere
For	<i>forward</i> , vorwärts
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung

G	Guanosin
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
I-E	IRES-EGFP
ICQ	<i>Intensity correlation coefficient</i> , Intensitätskorrelationskoeffizient (Li)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	<i>ionizing radiation</i> , ionisierende Bestrahlung
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> , interne ribosomale Eintrittsstelle
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium für Bakterienkultur
M	molar
m	Milli-
MDR1	<i>multidrug resistance 1</i> , Multidrug-Resistenz 1
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Faktor infektiöser Viruspartikel pro Zelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	nano-
NeoR	Neomycinresistenz
NP-40	Nonidet™ P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , Säuregrad
PJ	Propidiumjodid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo)-2,7-naphthalindisulfonsäure

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerasekettenreaktion
Rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer
RPMI	<i>Roswell-Park-Memorial-Institute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SFK	<i>SRC family kinase(s)</i> , Kinase(n) der SRC Familie
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i> , WHV posttranskriptionales Regulationselement
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Bestrahlung in der Tumorthherapie

### 1.1.1 Tumorerkrankungen

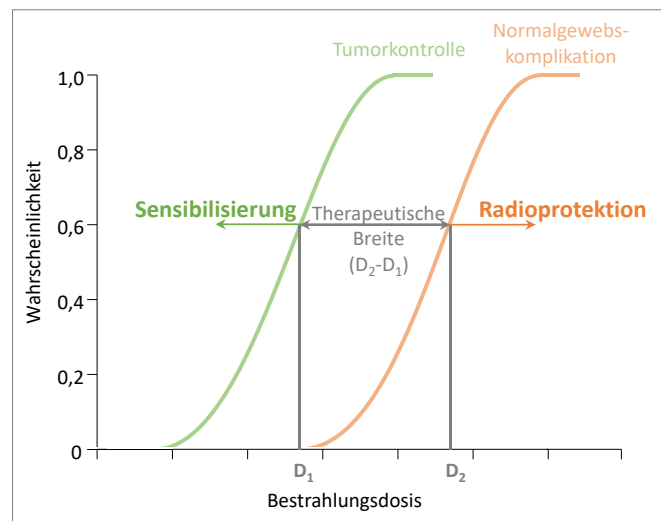
Für das Jahr 2012 schätzte die Weltgesundheitsorganisation 14 Millionen Krebsneuerkrankungen und 8,2 Millionen krebsassoziierte Todesfälle <sup>1</sup>. Schädigungen der DNA, die z. B. durch genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten und virale Infektionen ausgelöst werden, sind die Grundlage der Entstehung von Krebs. Neben UV-Strahlung, die Basendimere hervorruft, und ionisierender Strahlung, die zu DNA-Strangbrüchen führt, sind alkylierende Agenzien exogene Substanzen, die schadhafte DNA-Veränderungen auslösen. Auch endogene Prozesse können zu DNA-Schäden in Form von Basenverlust, Basentransition und Basentransversion führen, z. B. während der Replikation, wenn Fehler nicht durch die Korrekturlese-Funktion der DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  verhindert werden. Bei Einschränkung der zelleigenen Reparaturmechanismen (siehe 1.2.2) steigt die Menge an DNA-Schäden und kann so die Krebsentstehung begünstigen <sup>2</sup>.

### 1.1.2 Tumorthherapie

Die derzeit mehr als 200 bekannten Tumorarten stellen eine heterogene Gruppe dar, innerhalb der es Unterschiede u. a. bezüglich Ursprungsgewebe, Malignität und Behandlungserfolg gibt <sup>3</sup>. Bestrahlung, operative Entfernung und Chemotherapie stellen die drei grundlegenden Behandlungsmodalitäten von Tumoren dar, die häufig auch in Kombination eingesetzt werden. Die operative Entfernung ist besonders bei nicht metastasierten Tumoren geeignet. Bei inoperablen Tumoren oder zur Vermeidung der Nebenwirkungen einer Operation eignet sich die Behandlung mit ionisierender Strahlung, die gute Langzeit-Tumorkontrolle erzielt, aber auch als palliative Behandlung eingesetzt wird. Schätzungsweise mehr als die Hälfte aller Krebspatienten erhält eine Strahlentherapie <sup>4</sup>. Die Intervention mittels Chemotherapie zielt bei der Behandlung auf den kurativen Effekt ab, aber auch als adjuvante Therapie auf eine Minderung der Krankheitssymptome und die Eindämmung des Fortschreitens der Erkrankung. Rezidive oder Metastasen können auftreten, wenn die entarteten Tumor-(stamm-)zellen nicht restlos entfernt oder inaktiviert wurden.

### 1.1.3 Bestrahlung in der Tumorthherapie

Der Einsatz von ionisierender Strahlung zur Tumorbekämpfung führt neben der Zerstörung von Krebszellen auch zur Schädigung von umliegendem Normalgewebe. Die Erhöhung der Bestrahlungsdosis zur besseren Tumorkontrolle, ist durch die Induktion schädlicher Effekte im gesunden Gewebe limitiert <sup>5</sup>. Die therapeutische Breite kann durch zwei Ansätze verbessert werden: einerseits durch die Strahlensensibilisierung des Tumors (bessere Tumorkontrolle bei vergleichbarer Verträglichkeit), andererseits durch Radioprotektion von gesundem Gewebe (weniger Normalgewebsschäden bei gleichen Heilungsraten) (Abb. 1).



**Abb. 1: Die therapeutische Breite in der Strahlentherapie.** Die therapeutische Breite ist das Fenster zwischen der Dosis, die eine Tumorkontrolle erreicht und der Dosis, die die Normalgewebsschäden auslöst. Sowohl Tumorsensibilisierung als auch Radioprotektion tragen zur Erweiterung der therapeutischen Breite bei. Modifiziert nach <sup>5</sup>.

#### *Physikalische und biologische Ansätze zur Verbesserung der Strahlentherapie*

Das entscheidende Ziel bei der Strahlentherapie ist die effektive Behandlung von Tumoren und gleichzeitig die Schonung von gesundem Gewebe. Moderne Bildgebungsverfahren (MRT, PET), die dreidimensionale Bestrahlung und die Verwendung von Multilamellenkollimatoren stellen nur einen Teil der Möglichkeiten dar, dieses Ziel zu erreichen. Eine weitere Vermeidung der Strahlenexposition von gesundem Gewebe kann durch intraoperative Strahlentherapie erreicht werden. Auch die Art der Strahlung kann zu einer Verbesserung beitragen: Elektronenstrahlung mit begrenzter Reichweite ist vorteilhaft für oberflächennahe Zielvolumen, während Protonenstrahlung für die Bestrahlung tiefer Strukturen nützlich ist <sup>6, 7</sup>.

Bei Tumoren mit reduzierter Fähigkeit zur DNA-Reparatur<sup>8-10</sup> kann durch fraktionierte Bestrahlung mit niedrigen Einzeldosen die Gesamtdosis erhöht werden. Kombinationstherapien aus Radio- und Chemotherapie, beispielsweise mit Zytostatika wie Cisplatin, 5-Fluoruracil oder Doxorubicin, können zur Verbesserung des Therapieerfolgs eingesetzt werden. Therapieansätzen, die auf molekularer Ebene gezielt Tumorzellen angreifen, werden als *targeted therapies* zusammengefasst.

Insgesamt sind die Therapiemöglichkeiten vielfältig, stoßen jedoch dann an ihre Grenzen, wenn Tumor und gesundes Gewebe nicht deutlich abgrenzbar sind und das therapeutische Fenster zu eng ist, wie bei bestrahlungsresistenten Tumoren oder besonders strahlensensiblen Normalgewebe. Das zunehmende Verständnis biologischer Prozesse nach Bestrahlung kann an dieser Stelle dazu beigetragen, Tumorpatienten mit verbesserten Therapiekonzepten zu behandeln.

## 1.2 Strahlenbiologie

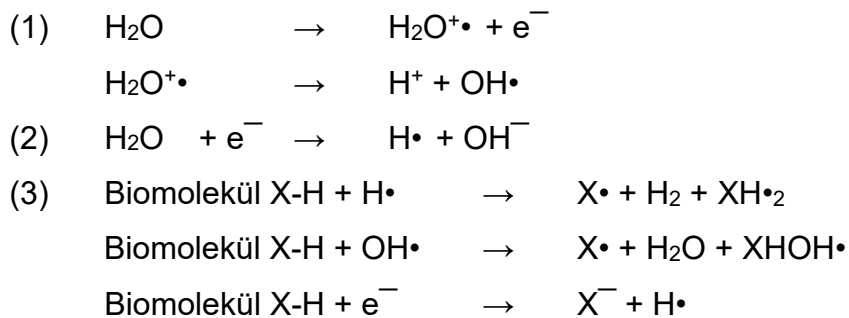
### 1.2.1 Strahlenwirkung

Die Wirkung ionisierender Strahlung kann zeitlich betrachtet in eine physikalische, chemische und biologische Phase unterteilt werden. Ein Teil der Strahlungsenergie wird innerhalb von Pikosekunden nach Passage zellulärer Strukturen auf atomare Strukturen übertragen. Wird bei hochfrequenter Bestrahlung (UV-, Röntgen- oder Gammastrahlung) ein Photon absorbiert und dadurch ein Elektron aus seiner Bindung gelöst (Ionisierung), spricht man vom photoelektrischen Effekt. Wird das freigesetzte Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben, spricht man von Exzitation. Bei ausreichender Energie können diese veränderten Atome und Sekundärelektronen weitere Ionisierungen und Exzitationen auslösen, die in Form von für ionisierende Strahlung typischen Clustern auftreten. Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA zählen zu daraus resultierenden direkten Strahlenschäden<sup>11</sup>.

Weitere Prozesse bei der Wechselwirkung von Gammastrahlung mit Materie sind Compton-Effekt und Paarbildung. Beim Compton-Effekt überträgt ein Photon seine Energie auf ein Elektron und bewegt sich dann mit reduzierter Energie (größerer Wellenlänge) in eine andere Richtung weiter. Mit steigender Photonenenergie nehmen Compton- und Fotoeffekt ab und Paarbildung zu. Bei der Paarbildung wird die Energie des Photons derart umgewandelt, dass ein Elektron und ein Positron entstehen.

Bei der Einwirkung von ionisierender Strahlung auf DNA unterscheidet man die direkte Strahlenwirkung auf Biomoleküle (v. a. DNA) und die indirekte Strahlenwirkung,

die über die Radikalisierung von Wasser verläuft (Reaktionen unter (1): Entstehung freier Elektronen  $e^-$ , Protonen  $H^+$  und Hydroxyl-Radikale  $OH^\bullet$ ); Reaktionen unter (2): das entstandene Elektron wird von einem anderen Wassermolekül aufgenommen, was zu einem Hydroxidion ( $OH^-$ ) und einem Wasserstoffradikal ( $H^\bullet$ ) zerfällt). Die Radikalisierung von Wasser hat weitere Effekte zur Folge, wie die Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die Molekülbindungen umliegender Strukturen, z. B. von Lipiden und Proteinen, zerstören (Reaktionen unter (3)) <sup>12, 13</sup>.



Im Übergang zur biologischen Phase werden innerhalb von Sekunden bis Tagen zelluläre Reparaturmechanismen aktiviert um die entstandenen Zellschäden zu reparieren oder bei irreparablen Schäden (Membranruptur, DNA-Strangbrüchen) den Zelltod einzuleiten. Insbesondere die Zerstörung von Stammzellen und die nachfolgende Zelldepletion führen zu Komplikationen in Geweben, deren Funktionalität auf die kontinuierliche Erneuerung angewiesen ist. Blutbildende Zellen, Haut und Schleimhäute sind damit besonders strahlensensibel. Im Patient tritt daher eine Vielfalt an mit Bestrahlung assoziierten Symptomen auf: Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe (gastrointestinales Syndrom), Infektionsanfälligkeit, Blutungsneigung durch Myelosuppression (hämatopoetisches Syndrom), Haarausfall, Nekrosen, Erythema und andere Hautveränderungen, neurologische und kardiovaskuläre Defekte <sup>14, 15</sup>. Im Abstand von Monaten oder Jahren können sich Spätfolgen wie Fibrosen und Entzündungsreaktionen, permanente Gewebeschäden und persistierende Organdysfunktion sowie strahleninduzierte Sekundärtumore entwickeln <sup>16</sup>.

### 1.2.2 DNA-Reparaturmechanismen

Komplexe Systeme dienen dem Schutz vor persistenten DNA-Schäden. Reparatursysteme, die Schäden an einem Strang reparieren, sind Basenexzisionsreparatur (BER), bei der die geschädigte Base durch die DNA-Glykosylase entfernt wird und die korrekte Base komplementär zum fehlerfreien Strang synthetisiert wird, und Nukleotidexzisionsreparatur (NER), bei der das schadhafte Oligonukleotid (ca. 20 Basen) frei-

gesetzt und ebenfalls komplementär ersetzt wird. Doppelstrangbruchreparatursysteme sind homologe Reparatur, die auf Korrektur anhand eines Schwesterchromatids basiert, und nicht-homologe Endverknüpfung, einer Reparaturform ohne homologe Vorlage. Zur Erkennung strahlungsinduzierter Schäden dienen das *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) Protein, das in Komplex mit MRN agiert<sup>17</sup>, und Komplexe aus DNA-abhängige Proteinkinasen (DNA-PK) mit Ku70-Ku80<sup>18</sup>. Diese Kinasen phosphorylieren u. a. die H2A-Histonvariante H2AX, was als Rekrutierungs- und Aktivierungssignal für Effektoren der Reparaturantwort dient. Durch zeitliche Verzögerung des Voranschreitens im Zellzyklus, z. B. beim Übergang der Zellen von G1 in S, der Passage durch die S-Phase und dem Übergang von G2 zu Mitose, bleibt mehr Zeit zur DNA-Reparatur<sup>19</sup>.

### 1.2.3 Bestrahlungsinduzierte Zelltodwege

Bestrahlungsinduziertes Zellsterben tritt ein, wenn die Zellschäden über die Möglichkeiten der Reparatursysteme hinausgehen. Nekrose basiert auf Entzündungsprozessen durch Freisetzung zellulärer Strukturen ins umliegende Gewebe. Bedeutsamere strahleninduzierte Zelltodwege bei klinisch relevanten Dosen sind hingegen die genetisch programmierten Zelltodwege Apoptose und Seneszenz, sowie die mitotische Katastrophe.

#### *Seneszenz*

Seneszenz ist ein Zustand fortgesetzter metabolischer Aktivität bei irreversiblen Zellzyklusarrest, sodass die Zellteilungsfähigkeit verloren ist. Seneszente Zellen weisen umfangreiche Veränderungen auf, z. B. Zellvergrößerung, gesteigerte Aktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase, Apoptoseresistenz und die gesteigerte Sekretion von pro-inflammatorischen Molekülen, Wachstumsfaktoren und Metalloproteasen. Die bestrahlungsinduzierte Seneszenz basiert u. a. auf umfangreichen Schädigungen an Makromolekülen<sup>20</sup> und nicht reparierten Läsionen im Telomerbereich der DNA<sup>21</sup>.

#### *Mitotische Katastrophe*

Die mitotische Katastrophe steht im Zusammenhang mit einer fehlerhaften mitotischen Zellteilung. Strahlung und andere DNA-schädigende Agenzien können den vorzeitigen Eintritt von Zellen in die Mitose auslösen<sup>22</sup>. Insbesondere Tumorzellen, die fehlerhafte Zellzyklus-Kontrollpunkten und eine reduzierte p53-Expression aufweisen, reagieren auf DNA-Schäden mit mitotischer Katastrophe. Gekennzeichnet ist sie durch

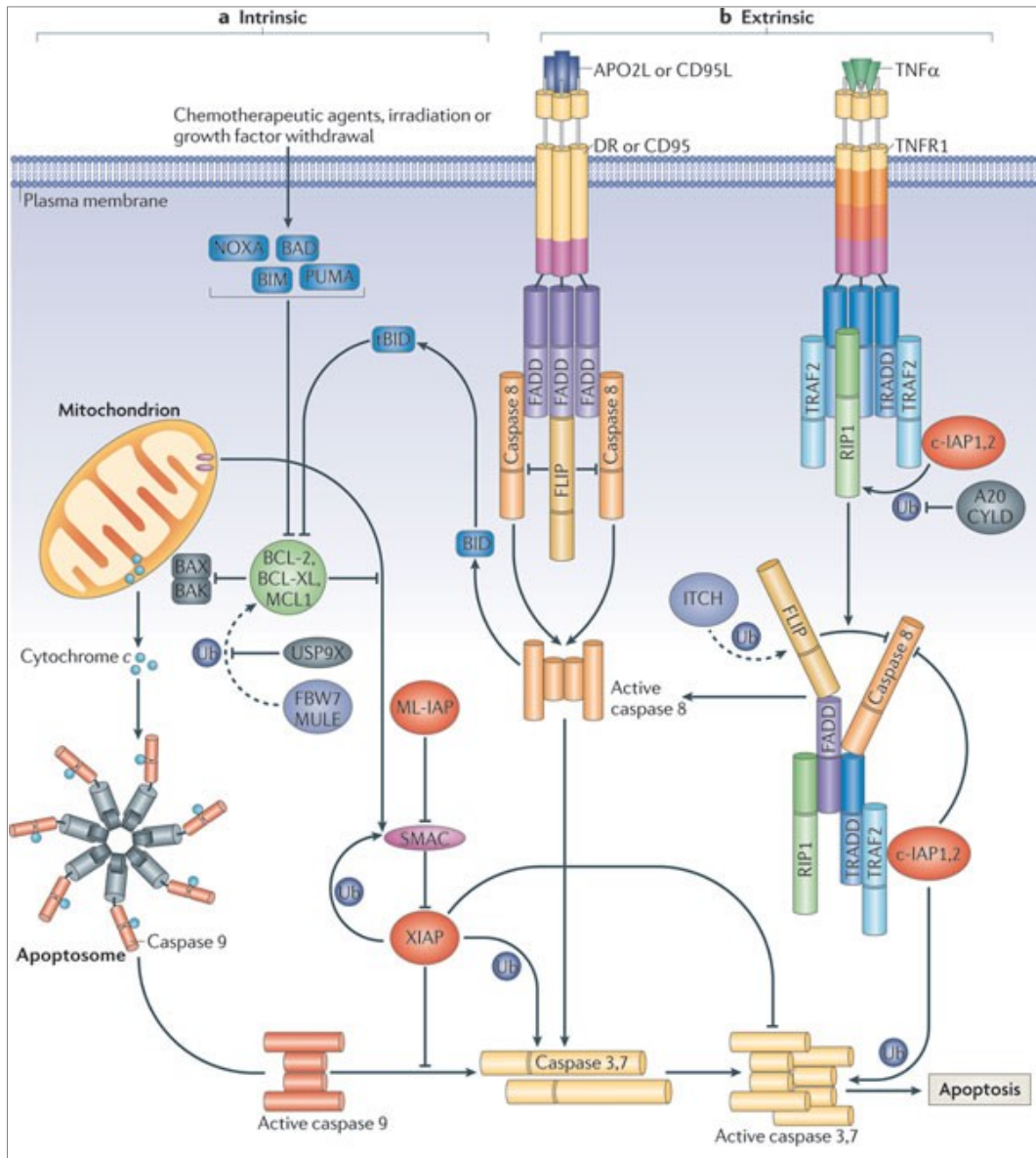
Amplifikation von Zentrosomen, was zu multipolaren Mitosespindeln und fehlerhafter Chromosomenverteilung führt, in deren Konsequenz große Zellen mit unkondensiertem Chromatin und mehrfachen Mikronuklei entstehen. Abschließend bilden sich Kernhüllen um die Cluster fehlerhaft segregierter Chromosomen. Häufig stellt die mitotische Katastrophe eine Vorstufe anderer Formen des Zelltods, wie Apoptose oder Nekrose, dar oder dient Tumorzellen als Überlebensstrategie <sup>23, 24</sup>.

### *Apoptose*

Apoptose wird vermittelt durch eine kaskadenartige Aktivierung von Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen), die in der Zelle in inaktiver Form vorliegen, durch Spaltung aktiviert werden und andere Caspasen oder Proteine spalten <sup>25</sup>. Der extrinsische Weg setzt die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen Todesrezeptor der TNF-Rezeptor Superfamilie wie CD95 (APO1/Fas) voraus, was zur Bildung des *death-inducing signaling complex* (DISC) führt, der gemeinsam mit FADD- bzw. TRADD-Proteinen (*Fas-associated/TNF receptor-associated protein with death domains*) als Bindeglied für Procaspase 8 oder 10 dient und wo deren autokatalytische Aktivierung eingeleitet wird <sup>26</sup>.

Der intrinsische Weg wird, ausgelöst durch externe Stimuli wie Therapeutika, Bestrahlung oder Wachstumsfaktorentzug, initiiert durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen der BCL-2 Familie. Sie regulieren die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und sind in drei Subfamilien unterteilt: pro-*survival* BCL-2 Subfamilie (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1), pro-apoptotische *BAX-like* Subfamilie (BAX, BAK, BOK) und pro-apoptotische *BH3-only* Subfamilie (BID, BAM, BIM, BIK, BMF; NOXA, PUMA, HRK) <sup>27</sup>. Die *BH3-only* Mitglieder neutralisieren die Mitglieder der BCL-2 Subfamilie, was zur Freisetzung von Cytochrom c und schließlich zur Spaltung von Caspase 9 führt. Maßgeblich am intrinsischen Weg ist auch p53 beteiligt, das nach DNA-Schäden aktiviert wird und die Apoptoseantwort durch die Expression pro-apoptotischer Proteine wie BAX und PUMA induziert <sup>28</sup>. Eine Verstärkung des intrinsischen Wegs durch den extrinsischen Weg ist über die Caspase 8 abhängige Spaltung des Proteins BID möglich, das an der Destabilisierung der mitochondrialen Membran beteiligt ist <sup>29</sup>. Durch die aktivierten Initiator-Caspasen 8 und 9 setzt sich die Apoptosekaskade in der Spaltung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 fort (Abb. 2) <sup>30</sup>. Diese können über 1000 verschiedene Proteine aktivieren oder inhibieren <sup>31</sup>; u. a. wird das mitochondriale Transmembranpotential zerstört

und damit die ATP-Produktion eingestellt. Die Aktivierung von Aktin-Zytoskelettmodulatoren führt zum charakteristischen Membran-*Blebbing*. Durch die Aktivierung der Caspase-aktivierten Nuklease (CAD) wird das Chromatin zwischen Nukleosomen geschnitten. Auf diese Weise werden die mit Apoptose assoziierten Veränderungen herbeigeführt <sup>31</sup>.



**Abb. 2: Schema des intrinsischen und extrinsischen Wegs der Apoptose.** Links/a: Externe Stimuli wie Therapeutika oder Bestrahlung induzieren die Verschiebung hin zu pro-apoptotischen BCL-2 Familienmitgliedern, was zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c und der Ausbildung des Apoptosoms führt, wodurch Caspase 9 aktiviert wird. Rechts/b: Die Bindung eines Liganden an CD95 (Fas-Rezeptor) oder TNFR1 führt über Adapterproteine (FADD, TRADD) zur Rekrutierung und Aktivierung von Caspase 8. Die Spaltung von BID durch Caspase 8 kann den extrinsischen Weg verstärken. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 9 mündet in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7.

---

Nachdruck mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, Copyright 2011 <sup>30</sup>.

Das allgemeine Verständnis geht zwar dahin, dass die bestrahlungsinduzierte Apoptose vornehmlich über den intrinsischen Weg und die Spaltung von Caspase 9 induziert wird <sup>32</sup>, allerdings kann ionisierende Bestrahlung durchaus über p53 die CD95-vermittelte Apoptose unterstützen <sup>33</sup> oder aber Apoptose über eine p53-unabhängige Spaltung von Caspase 8 induziert werden <sup>34</sup>. In Jurkat E6 T-Lymphomzellen wurde nach Bestrahlung mit 10 Gy die Spaltung von Caspase 8 nach 12 h – 48 h <sup>35</sup> und die Abnahme der ungespaltenen Caspase 8 zwischen 24 h und 72 h in HeLa-Zellen nachgewiesen <sup>36</sup>. In letzterer Studie ging die Caspase 8 Aktivierung auf eine JNK-induzierte Transkription des FAS-Gens zurück. Eine andere Studie zeigte, dass die Caspase 8 vermittelte bestrahlungsinduzierte Apoptose nicht, wie anfangs vermutet, abhängig war vom CD95 Rezeptorsystem <sup>35, 37</sup>. Eine Rolle von Caspase 8 in der bestrahlungsinduzierten Apoptose wurde außerdem in mit siRNA gegen Caspase 8 behandelten H460-Zellen demonstriert, bei denen 48 h nach Bestrahlung mit 5 Gy und 8 Gy der DNA-Gehalt in der SubG1-Phase signifikant verringert war im Vergleich zur Kontrolle <sup>38</sup>.

Bei der Bewertung von strahlungsinduziertem Zelltod ist nach wie vor das klonogene Überleben ein zentraler Parameter, der unabhängig vom beschrittenen Zelltodweg die Teilungs- und Repopulierungsfähigkeit von bestrahlten Zellen beschreibt und somit weitläufige Einschlusskriterien beinhaltet. Die Steigerung des klonogenen Überlebens von gesunden Zellen ist ein entscheidendes Kriterium bei der Beurteilung der Wirksamkeit von Modulatoren der Strahlenantwort.

### 1.3 Strahlensensibilisierung und Radioprotektion durch Genterapie

Ein breites Feld stellen therapeutische Ansätze dar, die auf eine Steigerung der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren oder die Radioprotektion von Normalgewebe abzielen. Eine essentielle Voraussetzung für die Wirksamkeit der eingesetzten Agenzien ist deren Selektivität für Tumor- bzw. Normalgewebe, da eine in Richtung und Höhe gleiche Verschiebung der Kurven für Tumorkontrolle und Normalgewebsschaden keinen therapeutischen Nutzen bedeutet <sup>39</sup>. Die Ansätze zielen insgesamt darauf ab, die Gewebefunktion zu erhalten indem Schaden verhindert oder gemindert wird, oder sie nach Eintritt einer Strahlenschädigung wieder herzustellen <sup>40</sup>.



### *Strahlensensibilisierung*

Die Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit in Tumoren führt bei gleicher Bestrahlungsdosis zu einer Steigerung der Tumorkontrolle. Per Definition wirken solche Agenzien allein weder auf Tumorgewebe noch auf Normalgewebe toxisch, verstärken jedoch in Kombination mit Bestrahlung ihre Wirkung. Da nur wenige Agenzien diesem Kriterium standhalten, ist diese Gruppe vorzugsweise als „Strahlenmodifizierer“ zu bezeichnen<sup>39</sup>. Verbindungen, die in der Klinik als Strahlensensibilisierer angesehen werden, sind meist zytotoxische Chemotherapeutika, die DNA-Schäden induzieren oder die DNA-Reparatur verhindern und so die Tumorzelle gegenüber Strahlung sensibilisieren. Chemische Strahlensensibilisierer stellen eine breite, heterogene Gruppe an Agenzien dar, die häufig multiple Wirkmechanismen aufweisen. Beispiele sind u. a. Cisplatin, 5-Fluoruracil, Gemcitabine und Temozolomid<sup>41</sup>. Eine Vielfalt monoklonaler Antikörper, u. a. Bevacizumab (Angiogenesehemmer), Trastuzumab (HER2-Inhibitor) und Cetuximab (EGFR-Inhibitor), zielt auf die Modulierung von Zellsignalwegen ab, die häufig von Tyrosinkinase gesteuert werden. *Targeted Agents*, die häufig niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) sind, wie Sorafenib (multipler Kinaseinhibitor) und Erlotinib (EGFR-Inhibitor), werden ebenfalls bei der Modulation von Signalwegen eingesetzt<sup>32</sup>. Eine umfassende Übersicht über Strahlensensibilisierer bietet<sup>42</sup>.

Da bereits eine überlebende Tumor-(stamm)-zelle ausreicht, um die Effektivität der Strahlensensibilisierung stark zu mindern, ist aus praktischer Sicht die Behandlung aller Tumorzellen die große Herausforderung einer Gentherapie. Aus diesem Grund scheint die geeignetere Strategie für die Vergrößerung der therapeutischen Breite die Radioprotektion zu sein, da zur Erholung des Gewebes die Behandlung nur eines Anteils der gesunden Zellen erforderlich ist<sup>43</sup>.

### *Radioprotektion*

Radioprotektoren werden als schützende Faktoren vor den initialen Schäden und subsequenten Folgen ionisierender Strahlung im Normalgewebe eingesetzt. Häufig sind Radikalfänger geeignete chemische Radioprotektoren, die im Nukleus in der Nähe zur DNA die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies neutralisieren, was DNA-Strangbrüche verhindert<sup>43,44</sup>. Das erstmals zugelassene Präparat zur Radioprotektion ist Amifostin (WR-2721), das bei Kopf-Hals-Tumoren zur Minderung von Xerostomie und Nephrotoxizität eingesetzt wird<sup>45-47</sup>. Amifostin wird als Prodrug verabreicht und von der Alkalischen Phosphatase (AP) metabolisiert zum aktiven Wirkstoff 2-((Aminopropyl)amino)ethanthiol (WR-1065)<sup>48</sup>. Die selektive, bis zu 100-fache

Anreicherung von Amifostin im Normalgewebe basiert auf der aktiven Aufnahme von WR-2721 durch Normalgewebe und einer signifikant reduzierten Expression der AP in Tumorgewebe<sup>49, 50</sup>. Aufgrund einer geringen Selektivität für Normalgewebe existieren zu Amifostin nur wenige Alternativen. Neben Amifostin ist nur Palifermin (rekombinanter humaner Keratinozytenwachstumsfaktor) von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* für die Anwendung am Patienten zugelassen. Der zytoprotektive Effekt vor bestrahlungsinduzierter oraler Mukositis wurde einer gesteigerten Expression der anti-apoptotischen Proteine BCL-2 und BCL2L1 und des Transkriptionsfaktors NRF2 zugeschrieben<sup>51-53</sup>.

Alternativ werden sog. Strahlenmitigatoren eingesetzt, die nicht das Eintreten von initialen Strahlenschäden verhindern, sondern die daraus entstehenden negativen Folgen mildern. Somit stellen sie auf Grund ihrer Wirkweise keine Radioprotektoren im engen Sinne dar, sollen aber wie echte Radioprotektoren die Funktionserhaltung des gesunden Gewebes bewirken. Diese Substanzen zielen darauf ab, Zellsignalwege zu beeinflussen und die gesunde Zelle so vor Apoptose und Zellzyklusarrest zu schützen. Cytokine und Wachstumsfaktoren wie G-CSF können die Rolle eines Strahlenmitigators einnehmen<sup>54</sup>.

### 1.3.1 Gentherapie

Der Grundansatz einer Gentherapie ist, die Erbinformation eines therapielevanten Gens, das im Patienten nicht oder fehlerhaft exprimiert wird, in die Zielzellen einzubringen, um die korrekte Expression (wieder) herzustellen. Nach anfänglich überwiegendem Einsatz bei monogenetischen Erkrankungen, bei denen eine Gentherapie Heilung bedeuten kann, werden heute zunehmend multifaktorielle Erkrankungen, so auch Tumorerkrankungen, mittels Gentherapie behandelt.

Die Vorteile von Gentherapie sind zum einen, dass die Promotoren von Gentransfervektoren so modifiziert werden können, dass eine gewebespezifische Expression erfolgt und so die Steigerung der therapeutischen Breite gezielt möglich ist. Zum anderen erlaubt die Gentherapie Flexibilität hinsichtlich der strategischen Umsetzung der Therapie. Radioprotektion beispielsweise kann durch Schutz vor freien Radikalen, Vermittlung von Apoptoseresistenz, Zufuhr von Proliferations- und Überlebensfaktoren oder die Herstellung der Gewebefunktion auf Gen-/Proteinebene erreicht werden. Sowohl physikalische Methoden (Elektroporation und Mikroinjektion) als auch chemische Methoden (Transfektion) eignen sich zum Einbringen therapeutischer Nukleinsäuren. Alternativ besteht die Möglichkeit der Verwendung viraler Vektoren.

### 1.3.2 Virale Gentherapievektoren

Analog zu einer unerwünschten Virusinfektion, bei der das Virus in die Zelle eindringt, werden bei Gentherapien virale Vektoren verwendet, um die Aufnahme des therapeutischen Gens in die Zielzellen zu erreichen. Die am häufigsten verwendeten viralen Vektoren sind Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren<sup>55</sup>. Ein grundlegender Vorteil viraler Gentherapievektoren ist, dass eine gerichtete und effiziente Transduktion des Zielgewebes sichergestellt werden kann<sup>40</sup>. Zusätzlich kann die Expressionsdauer durch entsprechende Genelemente gesteuert und so eine regulierte Transgenexpression erreicht werden<sup>56, 57</sup>. Die häufig verwendeten gentherapeutischen Vektoren sind gut manipulierbar und bieten durch ihre Verpackungsgröße (bei Lentiviren bis zu 17 kb) Platz für eine Vielfalt an Transgenen. Risiken einer unerwünschten Genexpression durch den viralen Promoter in Folge der Integration in das Genom der Zielzellen wurden durch Vektormodifikationen enorm reduziert. Durch den Austausch der viral codierten Information zwischen den LTRs (bis auf das Verpackungssignal  $\psi$ ) gegen die cDNA des therapeutischen Gens und die Codierung der virusrelevanten Gene *in trans* auf zwei oder drei Helferplasmiden wird sichergestellt, dass ausschließlich replikationsdefiziente Viruspartikel entstehen und die hohe Pathogenität therapeutischer Viren attenuiert wird. Die Etablierung selbstinaktivierender (SIN) Vektoren minderte eine mögliche Vektormobilisierung und reduzierte die Gefahr einer spontanen Rekombination, die mit der Wiederherstellung der Replikationskompetenz verbunden sein könnte<sup>58</sup>. Schutz vor einer systemischen Immunreaktion durch virale Vektoren kann durch die Induktion von Immuntoleranz gegenüber dem therapeutischen Vektor oder durch Verwendung nicht-humaner Vektorviren gegeben werden<sup>59, 60</sup>. Mittels Kapsid-Pseudotypisierung kann darüber hinaus der Tropismus des Virus gesteuert werden<sup>57</sup>, und im Fall des vesikulären Stomatitisvirusglykoproteins G (VSV-G) die lentiviralen Partikel stabilisieren<sup>61</sup>.

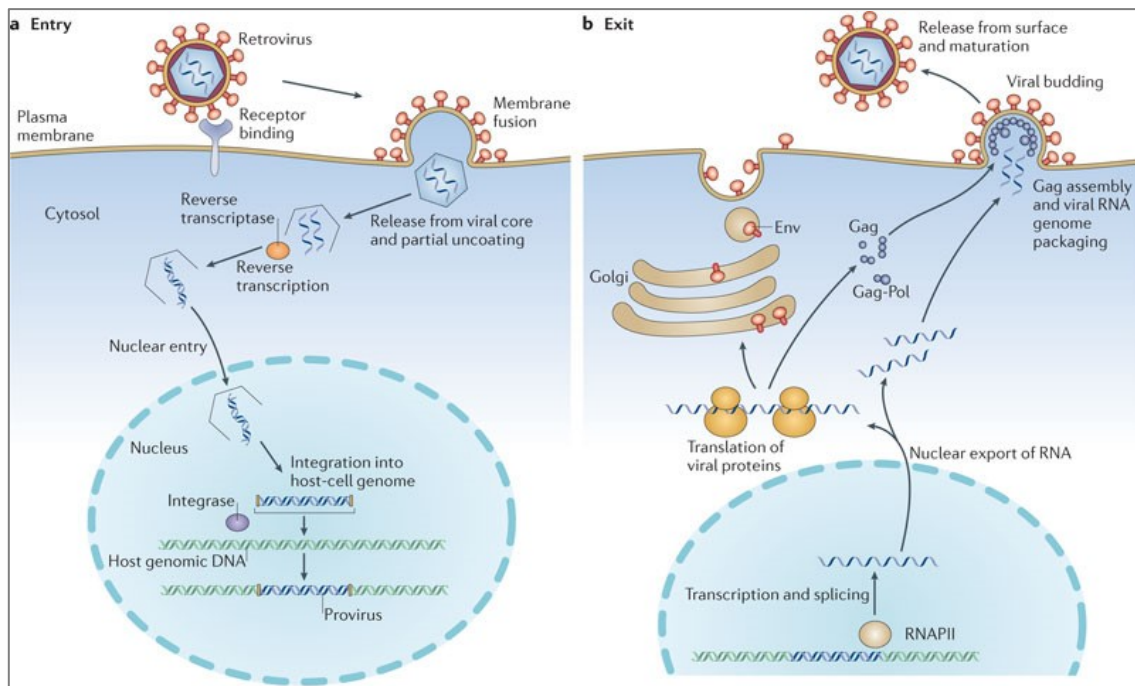
Die weltweit erste der über 2200 bis heute durchgeführten Gentherapiestudien erfolgte 1990 in den USA<sup>62</sup> bei einer Patientin mit schwerem kombiniertem Immundefekt (*severe combined immunodeficiency*, SCID), der auf einem Adenosindesaminasemangel (ADA-Mangel) beruhte<sup>63</sup>.

### 1.3.3 Lentivirale Vektoren in der Gentherapie

Lentiviren, die auf Grund der hohen Transduktionseffizienz in sich teilenden und nicht teilenden Zellen und der stabilen Transgenexpression von großem gentherapeutischen Nutzen sind, zählen innerhalb der Familie der Retroviren zu der Unterfamilie

der Orthoretroviren. Retroviren sind umhüllte Viren, die ein lineares einzelsträngiges (+) RNA-Genom in diploider Ausführung tragen. Das zwischen 7 kb und 12 kb große Retrovirus-Genom, bestehend mindestens aus den Genen *gag*, *pol* und *env*, wird von LTRs begrenzt, die der Steuerung der viralen Genexpression dienen. *gag* (gruppen-spezifisches Antigen) codiert für das Vorläufer-Polyprotein, das in Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein gespalten wird. Die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase werden von *pol* codiert, während *env* für das Glykoprotein gp160 codiert, den gemeinsamen Vorläufer von Oberflächenglykoprotein (gp120) und Transmembranglykoprotein (gp41), die dem Virus die Bindung an und Fusion mit der Zielzelle ermöglichen. Komplexe Retroviren, zu denen die Lentiviren zählen, besitzen darüber hinaus sog. akzessorische Gene, z. B. *rev*, *tat*, *tev*, *vif*, *vpr* und *vpu* bei HIV-1.

Der virale Lebenszyklus beginnt mit der durch gp120 und gp41 vermittelten Bindung und Fusion von Virus und Zielzelle. Anschließend wird die virale RNA ins Zytosol freigesetzt und durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese gelangt in den Zellkern und wird mittels Integrase in das Wirtsgenom integriert. Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II der Wirtszelle dienen der Transkription der Provirus-DNA. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene mRNAs, die im Cytoplasma an Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (*Env*-Proteine) oder an freien Ribosomen translatiert werden. Während *Env*-Proteine direkt an der Zellmembran zu Trimeren gelagert werden, ist für die Bindung der *Gag/Pol*-Vorläuferproteine an die Zellmembran die N-terminale Myristylierung nötig. Ungespleißte mRNA bringt das Verpackungssignal Psi ( $\psi$ ) mit und wird in neue Viruspartikel verpackt. Der Kontakt der Zellmembran mit den viralen mRNAs veranlasst die Einstülpung der Membran und die Abschnürung eines unreifen Viruspartikels. Die autokatalytisch freigesetzte virale Protease schneidet während des Reifeprozesses aus dem Vorläuferprotein die einzelnen viralen Proteine heraus. Am Ende des Reifeprozesses ist der entstandene Viruspartikel infektiös und kann den viralen Lebenszyklus initiieren (Abb. 3) <sup>64</sup>.



**Abb. 3: Retroviraler Lebenszyklus.** Vermittelt durch virale Oberflächenglykoprotein fusioniert das Virus mit der Zielzelle, gefolgt von der Freisetzung der viralen Komponenten. Das einzelsträngige RNA-Genom wird mittels Reverser Transkriptase in ds-cDNA umgeschrieben und tritt in den Zellkern ein, wo sie in das Wirtsgenom integriert wird. Mittels Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle wird die Provirus-DNA transkribiert, gespleißt und aus dem Zellkern freigesetzt. Im Cytoplasma erfolgt die Translation der viralen mRNAs an freien Ribosomen oder dem Endoplasmatischen Retikulum (*Env*-Proteine). Nach Anlagerung der *Env*-, *Gag*- und *Pol*-Proteine an die Zellmembran wird ungespleißte virale RNA verpackt und als Viruspartikel zur Reifung freigesetzt. Nachdruck mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, Copyright 2012 <sup>64</sup>.

#### 1.3.4 Genterapeutische Radioprotektion

Mittels Genterapie kann eine Vergrößerung der therapeutischen Breite durch Strahlensensibilisierung des Tumors oder durch Radioprotektion von gesunden Zellen erreicht werden. Eine Strahlensensibilisierung des Tumors, meist angestrebt durch die Wiederherstellung der Expression von p53 zur Verbesserung der Apoptosesensitivität, ist jedoch aus verschiedenen Gründen begrenzt. Zum einen trägt die strahleninduzierte Apoptose von Tumoren nur einen Anteil zum klonogenen Zellsterben bei <sup>65</sup>, zum anderen sind die klinisch realisierbaren Transduktionsraten oft unzureichend für den Erfolg einer Genterapie. Dies ist besonders relevant da gängige Fraktionierungsschema bereits einen Großteil der Tumorzellen abtöten, aber schon eine entkommene Tumorzelle den Erfolg der Genterapie gefährdet.

Geeigneter ist demnach die Radioprotektion von gesundem Gewebe für die Vergrößerung der therapeutischen Breite, was durch Verbesserung der zellulären Schutzmechanismen vor strahlungsinduzierten freien Radikalen, durch Induktion von Apoptoseresistenz und durch die Unterstützung der DNA-Reparatur erreicht werden kann. Kandidaten, für die bereits Erfolge in Studien zu verzeichnen waren, sind u. a. die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu-Zn-SOD) und die Mangan-SOD (Mn-SOD), die die Reaktion von Superoxid-Ionen mit Protonen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren ( $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ) und auf diese Weise schützend vor freien Radikalen wirken<sup>66, 67</sup>. Darüber hinaus wurde ein radioprotektiver Effekt auch durch den Gentransfer des MDR1 Gens nachgewiesen<sup>68, 69</sup>. Ein radioprotektiver Effekt durch Vermittlung von Apoptoseresistenz wurde auch für Caveolin-1 beschrieben<sup>70</sup>, das als Membranprotein möglicherweise mit MDR1 interagiert.

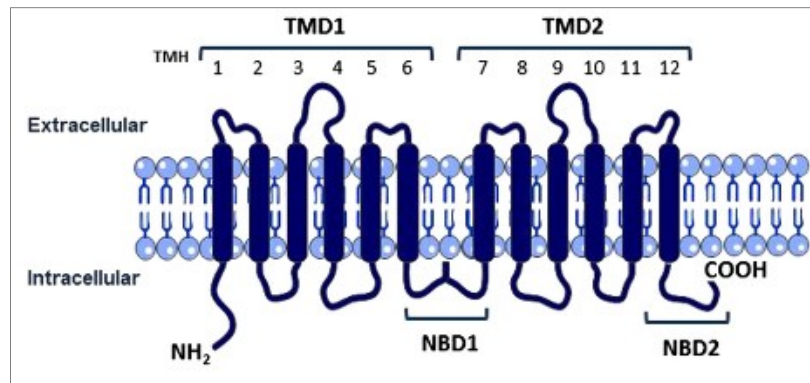
## 1.4 MDR1 und Caveolin-1 als Radioprotektoren

### 1.4.1 Multidrug Resistenz 1

Das Multidrug Resistenz 1 Gen (MDR1), auch bekannt als *ATP-binding cassette superfamily B member 1* (ABCB1) Gen, codiert für ein 170 kDa großes, glykosyliertes Protein (auch: p-Glykoprotein), das aus zwei homologen Hälften mit je sechs hydrophoben Transmembrandomänen und je einer ins Zytosol ragenden Domäne für die Bindung und Hydrolyse von ATP (NBD, Nukleotidbindedomäne) besteht (Abb. 4)<sup>71</sup>.

MDR1 exprimierende Zellen sind in der Lage, strukturell und funktionell diverse Substrate aktiv unter ATP-Hydrolyse aus der Zelle zu transportieren. Dazu zählen u. a. Vinca-Alkaloide wie Vinblastin und Vincristin, Taxane wie Paclitaxel und Docetaxel, Epipodphyllotoxine wie Etoposid und Teniposid und alkylierende Agenzien. Während MDR1 in gesunden Zellen zu deren Schutz vor toxischen Xenobiotika beiträgt, vermittelt MDR1 in Tumorzellen Chemoresistenz gegenüber therapeutisch eingesetzten Substanzen<sup>72, 73</sup>. Neben der Vermittlung von Chemoresistenz wurde MDR1 auch eine Rolle bei der Resistenz gegenüber durch Chemotherapeutika, UV- und ionisierende Strahlung und Todesrezeptorliganden (FAS, TNF) induzierter Apoptose zugeordnet<sup>74-77</sup>. Der protektive Effekt von MDR1 wurde auf eine Resistenz gegenüber FAS-induziertem Zelltod durch Inhibition der Aktivierung von Caspase 8 zurückgeführt, wobei die ATPase-Funktion von MDR1 essentielle Bedeutung hatte<sup>78, 79</sup>. Darüber hinaus wurde eine MDR1-vermittelte Radioprotektion nach retroviraler Transduktion der lymphoblastoiden Zelllinie TK6<sup>69</sup> und nach Behandlung von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen

Stammzellen gezeigt <sup>68</sup>. Bestrahlung führte in beiden Zelltypen zum signifikanten Anstieg der MDR1-positiven Zellfraktion und verbesserte das klonogene Überleben, was MDR1 zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Verbesserung der therapeutischen Breite macht.



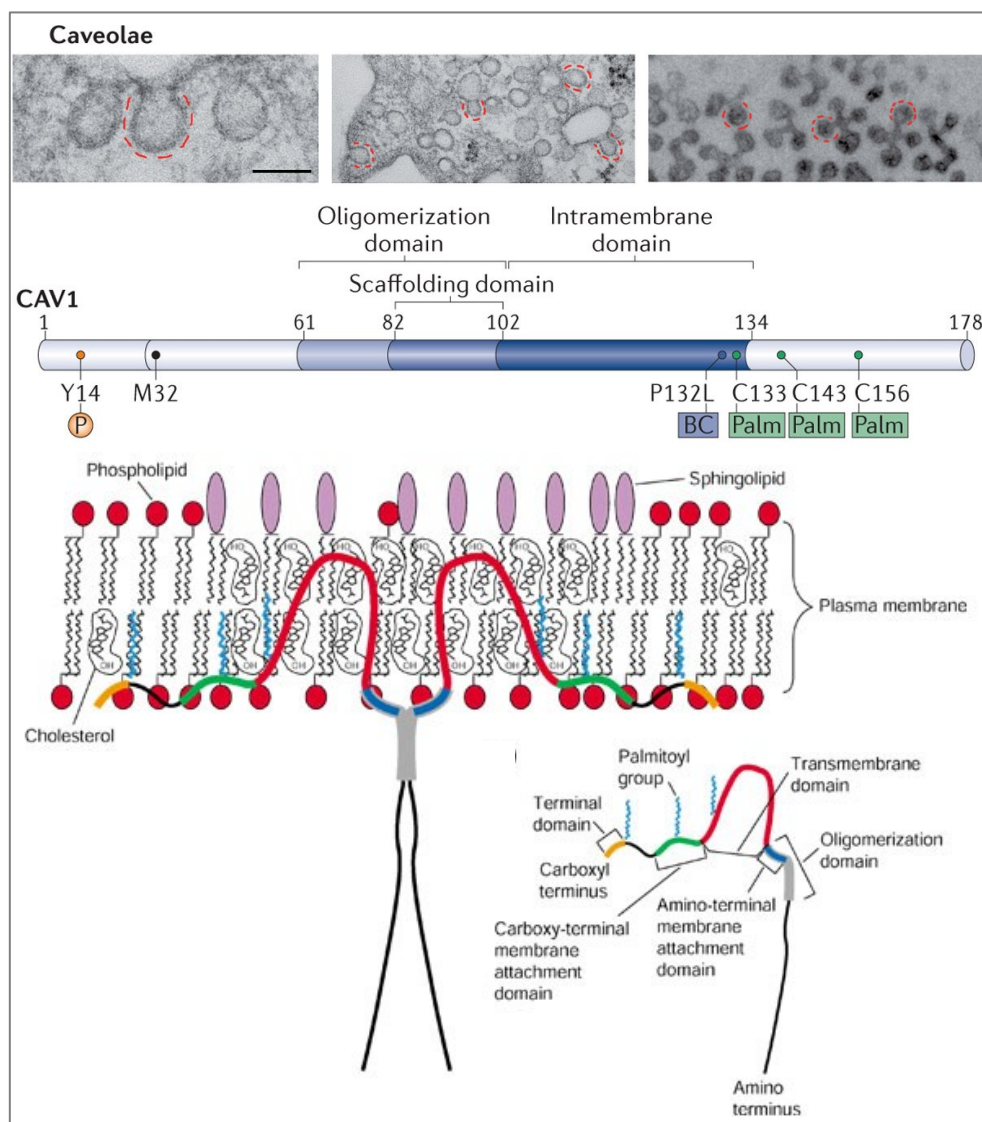
**Abb. 4: Modell des MDR1-Proteins.** Das Protein besteht aus zwei homologen Hälften mit je sechs Transmembrandomänen (TMD) und je einer zytosolischen Nukleotidbindedomäne (NBD). Nachdruck mit Genehmigung von Elsevier: Pharmacology & Therapeutics, Copyright 2015 <sup>71</sup>.

#### 1.4.2 Caveolin-1

Zahlreiche Zellfunktionen gehen von der Zellmembran aus, die keine homogene Einheit darstellt, sondern spezialisierte Membranabschnitte, genannt *lipid rafts* („Lipidflöße“), besitzt. Diese zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren, Sphingolipiden und Cholesterol aus <sup>80</sup>. Neben flachen *lipid rafts* stellen Caveolae eingestülpte *raft*-Abschnitte von 50 nm – 100 nm Größe dar, die am häufigsten in ausdifferenzierten Zelltypen wie Endothelzellen, Adipozyten, glatten Muskelzellen und Fibroblasten vorkommen <sup>81, 82</sup>.

Caveolin-1 (CAV1) ist ein 21 kDa großes, multifunktionales Membranprotein, dessen Expression für die Ausbildung von Caveolae essentiell ist und das die Hauptproteinkomponente der Caveolae darstellt <sup>83, 84</sup>. Über die Oligomerisierungsdomäne wird die Bildung von Cholesterol-stabilisierten CAV1-Clustern, die aus 14 bis 16 Oligomeren bestehen, vermittelt <sup>85, 86</sup>. Die umfangreiche Palmitoylierung von CAV1 dient der weiteren Stabilisierung an der Innenseite der Doppelmembran. Sowohl N- als auch C-Terminus von CAV1 sind zum Zytoplasma orientiert und durch eine in die Lipiddoppelschicht eingebettete hydrophobe *hairpin loop* Struktur verbunden (Abb. 5). Aufgrund ihrer besonderen Lipidzusammensetzung und Proteinkomponenten stellen Caveolae Membranmikrodomänen dar, die insbesondere der Akkumulation von Signalproteinen dienen. Über die Modulation der Signalmoleküle unterschiedlichster Sig-

nalnetzwerke nehmen Caveolae und CAV1 Einfluss auf eine Vielzahl komplexer Zellprozesse<sup>87</sup>. Zu den klassischen mit der Membran assoziierten Funktionen von CAV1 und Caveolae zählen vesikulärer Transport (Endozytose, Exozytose, Transzytose<sup>88</sup>), Zytoskelett-Remodelling<sup>89, 90</sup>, Cholesterol- und Lipidmetabolismus<sup>91</sup> und Mechano-protektion<sup>92</sup>. Darüber hinaus ist CAV1 in der Regulation von Wachstum und Prolifera-tion, Zelltransformation und Zellmigration sowie Zelltod/Zellüberleben involviert<sup>89</sup>.



**Abb. 5: Struktur von Caveolae und CAV1.** Oben: Elektronenmikroskopie von Caveolae (rot umrandet) in Fibroblasten (links), Adipozyten (Mitte) und Skelettmuskelzellen (rechts). Balkengröße: 100 nm. Mitte: Die Hauptstrukturkomponente von Caveolae ist CAV1, dessen wichtigsten funktionellen Domänen Tyrosin (Y) 14 (Phosphorylierung), die Oligomerisierungsdomäne (Homooligomerisierung, Clusterbildung) und die darin enthaltene *Scaffolding*-Domäne (Anlagerung von Signalmolekülen) sind. Die Einbettung in die Membran mittels Intramembrandomäne wird durch Palmitoylierungen im C-terminalen Bereich stabilisiert. BC: Brustkrebs-assoziierte Mutation (Prolin zu Leucin) an Position 132. Nachdruck mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, Copyright 2013<sup>83</sup>. Unten: Ausbildung von CAV1-Clustern über die Oligomerisierungsdomäne. N- und C-Terminus von



CAV1 sind zum Cytoplasma orientiert, während die Transmembrandomäne in die Lipiddoppelschicht eingelagert ist. Abbildung aus Open Access Publikation: <sup>93</sup>.

Die Rolle, die CAV1 dabei einnimmt, kann sowohl pro-apoptotischer <sup>94, 95</sup> als auch anti-apoptotischer <sup>96</sup> Natur sein. Eine Grundlage für das pro-apoptotische Verhalten von CAV1 stellt die Interaktion mit FAS dar, das in *lipid rafts* migrieren und die DISC-Bildung einleiten kann <sup>97</sup>. In Folge der Funktionsvielfalt ist der Verlust von CAV1 und der Caveolae mit unterschiedlichen Störungen, beispielsweise reduzierter Lebenserwartung <sup>98</sup>, Muskel-, Lungenerkrankungen und Störungen im Lipidhaushalt, assoziiert <sup>99</sup>.

#### *Rolle von CAV1 in Zellsignalwegen*

Die *Caveolin Scaffolding Domain* (CSD, Aminosäuren 82-102) ist bedeutsam für die Bindung von Signalproteinen, die ein entsprechendes CAV1 Bindungsmotiv tragen. Zu den Interaktionspartnern von CAV1 zählen heterotrimere G-Proteine <sup>100</sup>, G-Proteingekoppelte Rezeptoren wie der Östrogen-Rezeptor <sup>101</sup> und der Glutamat-Rezeptor <sup>102</sup>, Mitglieder der RAS Familie und der RHO GTPasen <sup>103-105</sup>, Adenylatcyclase <sup>106, 107</sup>, Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR, PDGFR und VEGFR2 <sup>108-110</sup>, eNOS <sup>111</sup>, und zahlreiche Kinasen, u. a. Proteinkinase A <sup>112, 113</sup>, Mitglieder von Kinasen der SRC Familie (SFK) <sup>114, 115</sup> und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie ERK1/2 <sup>116, 117</sup> und p38 <sup>118</sup>. Dabei entsteht ein komplexes Wechselspiel zwischen den Interaktionspartnern selbst und mit CAV1, wobei die von CAV1 ausgehende Modulierung von Signalwegen häufig inhibitorischer Art ist <sup>103, 108, 109, 111, 115, 117</sup>. Demgegenüber stehen Beobachtungen einer aktivierenden Wirkung von CAV1 auf Signalkomponenten (umfassend beschrieben in <sup>119</sup>). Die Freisetzung der Signalproteine aus den *lipid rafts*/Caveolae kann einen weiteren Weg darstellen, über den die Aktivierung reguliert wird <sup>120</sup>.

#### *Rolle von Caveolin-1 in Tumoren*

Deletionen um den D7S522 Locus treten in unterschiedlichen Tumorarten, beispielsweise Brustkrebs, Prostatakrebs, Plattenepithel-, Nierenzell-, Eierstock- und Kolonkarzinomen, gehäuft auf. Die Lokalisation des humanen CAV1-Gens auf Chromosom 7 in der Region q31.1, die den D7S522 Locus enthält, ist ein Hinweis, dass CAV1 ein möglicher Tumorsuppressor ist <sup>121-123</sup>. Die Vorstellung, dass CAV1 als Tumorsuppressor angesehen werden kann, wird von der Beobachtung unterstützt, dass CAV1 in einigen Tumoren <sup>124, 125</sup> und in onkogen transformierten NIH/3T3 Fibroblasten herunterreguliert war <sup>126, 127</sup>. Außerdem war der Verlust der CAV1-Expression mit ge-

steigerter Zellproliferation assoziiert und zusätzlich hinreichend für die maligne Zelltransformation von NIH/3T3-Fibroblasten<sup>117</sup> und für die Tumorentstehung in CAV1<sup>-/-</sup> Mäusen<sup>128</sup>. In Übereinstimmung damit unterdrückte die rekombinante Expression von CAV1 in onkogen transformierten Zellen und in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 den transformierten Phänotyp<sup>126, 129</sup>. In MTLn3 Zellen reduzierte die Überexpression von CAV1 die durch EGF stimulierte Migration<sup>130</sup> und in SiHa Zellen verhinderte CAV1 die durch HPV induzierte Zelltransformation<sup>131</sup>. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse u. a. aus Hirn-, Lungen- und Prostatakrebszelllinien und Tumoren, in denen erhöhte CAV1-Level gefunden wurden, die in Patienten mit einer schlechteren Prognose korreliert waren<sup>132-137</sup>. Daher geht das derzeitige Verständnis bezüglich der Rolle von CAV1 in der Tumorentwicklung dahin, dass die Expression von CAV1 abhängig von Zelltyp und Tumorstadium ist, wobei CAV1 im Normalgewebe als Tumorsuppressor funktioniert, im frühen Tumorstadium jedoch herunterreguliert wird und mit Fortschreiten des Tumors die Expression von CAV1 wieder zunimmt<sup>138, 139</sup>.

#### *Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14*

Neben der Modulation von Signalmolekülen durch die Interaktion mit CAV1 über die CSD spielt die Phosphorylierung von CAV1 an Tyrosin 14 (Tyr14) durch Kinasen eine bedeutsame Rolle für die Modulation von Zellsignalwegen und biologischen Prozessen. Eine der frühesten Entdeckungen über CAV1 war, dass es ein Hauptsubstrat der SRC-Kinase in mit Rous-Sarkomvirus transformierten Hühnerembryo-Fibroblasten darstellte<sup>140, 141</sup>. Während CAV1 unter normalen Bedingungen nicht phosphoryliert ist, kann die Phosphorylierung durch externe Stimuli wie Insulin<sup>142</sup>, EGF<sup>143</sup>, hohe Osmolarität, oxidativen Stress und UV-Strahlung<sup>118</sup> induziert werden. Unterschiedliche Kinasen, u. a. Kinasen der SRC-Familie<sup>144, 145</sup>, p38 MAPK<sup>118</sup> und c-ABL<sup>146</sup>, wurden beispielsweise mit der Phosphorylierung von CAV1 nach Induktion von oxidativem Stress mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assoziiert, während die Rolle der Stress-assoziierten c-JUN N-terminalen Kinase (JNK) für die Phosphorylierung von CAV1 bisher weniger untersucht wurde.

#### *Radioprotektion durch CAV1*

In verschiedenen Studien wurde eine Beteiligung von CAV1 an der Strahlenantwort gefunden. So führte die Überexpression von CAV1 in TK6 Zellen nach Bestrahlung zur gesteigerten Proliferation<sup>70</sup>. In Übereinstimmung damit wurde im Prostatakrebs-Xenograftmodell eine stärkere Wachstumsreduktion von Tumoren in CAV1-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach Bestrahlung beobachtet, die mit gesteigerter Apoptose assoziiert war. In-vitro-Daten mit Endothelzellen bestätigten

eine durch den Verlust von CAV1 erhöhte Sensitivität gegenüber strahleninduzierter Apoptose und eine Minderung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung<sup>147</sup>. Unterstützt wird die Rolle von CAV1 bei der Modulation der Strahlensensibilität von Daten aus Pankreastumorzellen, in denen der *knockdown* von CAV1 radiosensibilisierend wirkte<sup>148</sup>, während die Überexpression von CAV1 Strahlenresistenz vermittelte<sup>149</sup>. In CAV1-defizienten Mäusen wurde darüber hinaus Hyperproliferation der intestinalen Kryptenstammzellen gefunden, was zu einer niedrigeren Überlebensrate im Vergleich zu WT-Mäusen führte. Dies konnte auf eine gesteigerte Apoptose und beschleunigte Proliferation zurückgeführt werden, die mit folglich verstärkter Depletion der Kryptenstammzellen nach Bestrahlung einhergingen<sup>150</sup>. In Hirnmetastasen von Patienten mit Lungenkrebs war die Expression von CAV1 mit Radioresistenz assoziiert<sup>151</sup>. Daher scheint die Überexpression von CAV1 in Normalgewebszellen ein geeigneter Therapieansatz zur Verbesserung der therapeutischen Breite im Zuge einer Strahlentherapie zu sein.

#### 1.4.3 Interaktion von Caveolin-1 und Multidrug Resistenz 1

Neben der Modulation der Strahlenempfindlichkeit ist die Expression von CAV1 auch mit der Entwicklung von Chemoresistenz assoziiert<sup>152-154</sup>. Da sowohl CAV1 als auch MDR1 die Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum an therapeutischen Substanzen und gegenüber ionisierender Bestrahlung vermitteln, ist eine mögliche Interaktion von CAV1 und MDR1 in dieser Hinsicht besonders interessant. Hinweise dafür wurden in unterschiedlichen Studien aufgezeigt. So korrelierte die Expression von CAV1 und MDR1 in Knochenmarkszellen von gesunden und an akuter myeloider Leukämie erkrankten Patienten<sup>155</sup>. Außerdem wiesen Multidrug-resistente Tumorzellen mehr Caveolae im Vergleich zu nicht-resistenten Zellen auf<sup>156, 157</sup>, und die Expression von CAV1 war oftmals bei der Entwicklung der Multidrug-Resistenz erhöht<sup>133, 158, 159</sup>. Die gemeinsame Lokalisation und Komplexbildung von CAV1 und MDR1 in Caveolae<sup>160-162</sup> und der Nachweis beider Proteine in der gleichen Membranfraktion nach Aufreinigung von Detergenz-resistenten Membrandomänen deuteten weiter auf eine mögliche direkte Interaktion hin<sup>160, 161, 163-166</sup>. Studiendaten zur (Co-) Lokalisation und Interaktion von CAV1 und MDR1 und deren funktionelle Bedeutung weisen dabei in unterschiedliche Richtungen. So wurde für CAV1 und MDR1 eine direkte Interaktion gezeigt, und die Überexpression von CAV1 minderte den Multidrug-resistenten Phänotyp und reduzierte die Transporteraktivität des MDR1-Proteins in Doxorubicin-resistenten Hs578T/Dox Zellen<sup>167-169</sup>. Die fehlende Interaktion von MDR1 und CAV1 nach

Mutation der für die Bindung an CAV1 relevanten Positionen im MDR1-Protein war in COS-7 Zellen mit einer gesteigerten Transportaktivität von MDR1 assoziiert <sup>161</sup>. Im Gegensatz dazu führte in RBE4 Zellen (Rattenhirnepithelzellen) die Unterdrückung der Interaktion von CAV1 und MDR1 zur Minderung der MDR1-Transportaktivität <sup>170</sup>. In den humanen Multidrug-resistenten Zelllinien SGC7901/Adr und MCF7/Adr war die Lokalisation von MDR1 in *lipid rafts* von Cholesterol abhängig, und sowohl Cholesteroldepletion als auch der *knockdown* von CAV1 minderten die Transportfunktion von MDR1. Die Studie zeigte außerdem, dass die Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 durch die durch Doxorubicin aktivierte SRC-Kinase von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der MDR1-Transportfunktion war <sup>171</sup>. Die Erkenntnisse von Barakat et al. aus RBE4 Zellen wiesen ebenfalls auf eine gesteigerte Interaktion von CAV1 und MDR1 hin wenn CAV1 phosphoryliert war; jedoch war die reduzierte Interaktion nach Mutation von CAV1 an Tyr14 mit einer gesteigerten Transportaktivität von MDR1 verbunden <sup>172</sup>. Bezüglich ionisierender Strahlung stehen die Analyse einer Interaktion von CAV1 und MDR1 und deren Bedeutung sowie insbesondere die Rolle der Phosphorylierung von CAV1 an Tyrosin-14 noch aus. Für diese Studien wurde das TK6-Zellmodell verwendet, in dem bereits eine Modulation von Apoptose und klonogenem Überleben nach lentiviraler Einzelüberexpression von CAV1 und MDR1 gezeigt worden war.

## 1.5 Das TK6-Zellmodell

Die Zelllinie TK6 entstammt ursprünglich der Lymphoblasten-Zelllinie WI-L2, die aus einer Patientenbiopsie der Milz etabliert wurde <sup>173</sup>. Ein WI-L2 Klon, der keine *feeder layer* für die Koloniebildung in Weichagar benötigte, wurde für die Herstellung einer für die Thymidinkinase (TK) heterozygoten Zelllinie verwendet <sup>174</sup>. Der Karyotyp von TK6-Zellen ist stabil <sup>174-176</sup>. Von der TK6wt Zelllinie existieren Derivate, die sich insbesondere in ihrem p53-Status unterscheiden. Die Zelllinie TK6-WTK1 besitzt neben einem erhöhte Basislevel von p53 <sup>177</sup> auch eine Punktmutation in Codon 237 (Substitution von Methionin durch Isoleucin) <sup>178</sup>, sodass eine mutierte Form von p53 exprimiert wird, die bspw. nicht in der Lage ist, Zielgene wie p21 zu transaktivieren und so deren Expression zu induzieren <sup>177</sup>. Die Expression von p53 ist in der Zelllinie TK6-E6 durch die Expression des E6-Proteins von HPV Typ 16 supprimiert <sup>177</sup>. Obwohl TK6-WTK1 im Vergleich zu TK6wt eine um drei Tage verzögerte Apoptose nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zeigten <sup>178</sup>, ergaben spätere Studien, dass die beobachtete Apoptoseresistenz

nicht alleinig durch den p53-Status, sondern einen komplexeren Mechanismus reguliert ist <sup>177, 179</sup>.

Die stabile Expression von p53 und damit verbundene Apoptosesensitivität nach Bestrahlung machen TK6wt-Zellen zu einem häufig verwendeten Studiensystem der Strahlenantwort. Darüber hinaus exprimiert die TK6wt Zelllinie endogen weder CAV1 noch MDR1, weshalb sie besonders geeignet ist für die angestrebten Untersuchungen zur Radioprotektion durch CAV1 und MDR1.

## 1.6 Ziele

Auf Basis der Erkenntnisse bezüglich Radioprotektion und Interaktion von CAV1 und MDR1 in Einzelexpression sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob eine Verbesserung des Zellüberlebens nach Bestrahlung durch eine gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 erreicht werden kann und dabei die gemeinsame Lokalisation eine Rolle spielt. Weiterhin galt es zu beantworten, ob Caspase 8 im TK6 Zellsystem durch Bestrahlung aktiviert wird und ob ein radioprotektiver Effekt von CAV1 und MDR1 durch eine differenzielle Spaltung von Caspase 8 erklärt werden kann. Bezüglich Bestrahlung sollte außerdem untersucht werden, welche Signalmoleküle für die Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 nach Bestrahlung relevant sind und welche Bedeutung die Phosphorylierung für den bestrahlungsinduzierten Zelltod hat.

Folgende Kernaufgaben wurden formuliert:

- Klonierung und Virusproduktion zur Etablierung der Zelllinien TK6-CAV1-MDR1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> (mit an Position 14 mutiertem CAV1)
- Studien zur Strahlenantwort (Caspase 8 Spaltung, Zelltod) und (Co-) Lokalisation von CAV1 und MDR1 nach ionisierender Bestrahlung
- Analyse der beteiligten Kinasen an der Phosphorylierung von CAV1 nach Bestrahlung und Bedeutung von p-CAV1 Tyr14 für Zelltod nach Bestrahlung

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegeldokumentationseinheit	Intas, Göttingen
Agarosegelelektrophoresekammer	Biozym, Landgraaf, Niederlande
Dokumentationseinheit Fusion SL	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Eismaschine	Manitowoc, Herborn
FACS Analysegerät Guava easyCyte	Merck Millipore, Billerica, USA
FACS Sortiergerät Aria 1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Feinstwaage BP301 S	Sartorius, Göttingen
Feinwaage LP 620 S	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop DMIRB	Leica, Wetzlar
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubator HERA cell	Heraeus, Hanau
Konfokales Laserscanning-Mikroskop TCS SP8	Leica, Wetzlar
Microplate Reader infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Nucleofector	Lonza, Basel, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet	BRAND, Wertheim
Rollinkubator Stuart SRT2	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
SDS-PAGE und Western Blot Zubehör	Biorad, München
Sterilarbeitsplatz Herasafe	Heraeus, Hanau
Stickstofftank Biosafe	Cryotherm, Kirchen/Sieg
Stromversorgungsgerät PowerPack™	Biorad, München

Thermocycler peqSTAR 96X Universal Gradient	VWR, Erlangen
Ultrazentrifuge Discovery 100SE	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vortex Mixer	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Western Blot Dokumentationssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Wippschüttler Stuart SSL4	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Zellzählkammer Neubauer	VWR, Erlangen
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge GS-6R	Beckman Coulter, Krefeld

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
96-well Platte mit flachem Boden	Corning, Corning, USA
Bakterienkulturröhrchen	Corning, Corning, USA
Blotting-Papier	Macherey-Nagel, Düren
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Combitips advanced® biopur	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser	Marienfeld, Lauda Königshofen
Elektroporationsküvetten VPB-1002	Lonza, Basel, Schweiz
Filter 0,45 µm Millex-HA	Merck Millipore, Billerica, USA
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran Protran 0,2 µm	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf

Reagiergefäß 1,5 ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 ml/50 ml	Corning, Corning, USA
Stangenpipetten 2 ml/5 ml/10 ml	Corning, Corning, USA
Super PAP Pen	Beckman Coulter, Krefeld
Vivaspin 20 MWCO 100000	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Corning, Corning, USA
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Corning, Corning, USA
Zellkulturplatte 24-well	Corning, Corning, USA
Zellkulturplatte 6-well	Corning, Corning, USA
Zellkulturschalen	VWR, Erlangen

### 2.3 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt/Main
100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
APS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bradford Proteinstandards	Biorad, München
Bradford Reagenz	Biorad, München
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA



EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd, 37 %	Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hoechst 33342	Thermo Scientific, Waltham, USA
IPTG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Laemmli-Proteinladepuffer, 2x	Biorad, München
LB Nährmedium	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphataseinhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polybrene	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
Proteinladepuffer	Biorad, München
Rhodamine123	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20, 10 %	Biorad, München
Vectashield ohne DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vincristine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck, Darmstadt
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer, Waltham, USA
X-Gal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.4 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders vermerkt, sind Puffer und Lösungen in A. dest. angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 % APS	10 % w/v APS
10 % SDS	10 % w/v SDS
10x TBS-Puffer	0,2 M Tris, pH 7,5 1 M NaCl
10x Tris-Glycin-Puffer	1,92 M Glycin 250 mM Tris ergibt pH 8,7
50x TAE	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0
1x TAE	2 % v/v 50x TAE
7x Proteaseinhibitor	1 Tablette in 1,5 ml A. dest.
Agarosegellösung 1 %	1 % w/v Agarose in 1x TAE

Ampicillin- Stammlösung	100 mg/ml
Annealing-Buffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 50 mM NaCl Steril filtriert
Blockierlösung 1 für Western Blot (nur für phospho-Antikörper)	5 % w/v BSA in TBS-T
Blockierlösung 2 für Western Blot	5 % w/v Milchpulver in TBS-T
Blockierlösung für Immunfärbung	1 % w/v BSA in PBS
Blottingpuffer	10 % v/v 10x Tris-Glycin-Puffer 20 % v/v Methanol
DAPI Stammlösung	5 mg/ml in PBS
Elektroporationspuffer	120 mM KCl 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,6 25 mM HEPES, pH 7,6 2 mM EGTA, pH 7,6 5 mM MgCl <sub>2</sub> steril filtriert direkt vor Gebrauch zugeben: 2 mM ATP, pH 7,6, steril filtriert 5 mM Glutathion, steril filtriert
Hoechst 33342 Stammlösung	10 mg/ml
IPTG Stammlösung	200 mg/ml
Laufpuffer	10 % v/v 10x Tris-Glycin-Puffer 1 % v/v 10 % SDS
LB-Agar mit Ampicillin	2,5 % w/v LB Pulver 1,5 % w/v Agarpulver 0,1 % v/v Ampicillin Stammlösung
LB-Medium mit Ampicillin	2,5 % w/v LB Pulver

	autoklaviert 0,1 % v/v Ampicillin Stammlösung
MTT-Lysepuffer	10 % v/v SDS in 0,01 M HCl
MTT-Reagenz	5 mg/ml in PBS
Poly-D-Lysin	10 % w/v Poly-D-Lysin in PBS
Propidiumjodid Stammlösung	10 mg/ml
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris, pH 7,2-7,6 2 mM EDTA 1 % v/v 10 % SDS 0,5 % w/v Na-Desoxycholat 1 % v/v NP-40 7 % v/v Glycerol 1 % v/v Phosphataseinhibitor II 14 % v/v 7x Proteaseinhibitor
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris pH 6,8
Stainingmedium	4 % v/v FBS 4 mM HEPES in PBS
TBS-T	10 % v/v 10x TBS-Puffer 1 % v/v Tween 20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8
X-Gal Stammlösung	50 mg/ml in Dimethylformamid
Zellsortierungspuffer	2 mM EDTA 1 % v/v FCS 10 mM HEPES in HBSS

## 2.5 Kits

Produkt	Hersteller
Maxipräparationskit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Minipräparationskit peqGOLD	VWR, Erlangen
PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
TopTaq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande

## 2.6 Enzyme und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Transfektionsreagenz Metafectene	Biontex Laboratories, München

## 2.7 Primer

Die für Klonierungen verwendeten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Die mutierte Position in der CAV1 Sequenz ist fett markiert.

Primer	Sequenz
CAV1 For	5'- GGAATTC <u>G</u> GATCCGCCAGCATGTCTGGGGGC
CAV1 Rev	5'- CTCTAGATTATATTTCTTTCTGCAAGTTGATGC
CAV1-2A Rev	5'- <u>CTCGAGT</u> ATTTCTTTCTGCAAGTTGATGCG
CAV1 <sup>Y14F</sup> For	5'- CGGAGGGACATCTCT <b>TTC</b> ACCG
CAV1 <sup>Y14F</sup> Rev	5'- CCGGATGGGAACGGT <b>GA</b> AGAG
EGFP For	5'- <u>GCTCGAG</u> CCGGTCGCCACCATGGTGAGC
EGFP Rev	5'- <u>GTCTAGAT</u> TACTTGTACAGCTCGTCCATGC
MDR1-EGFP For	5'- <u>GGGATCC</u> GCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
MDR1-EGFP Rev	5'- <u>GCGGCCGC</u> CCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

Sequenzierprimer M13 For	5' - GTAAAACGACGGCCAG Geeignet für pGEM-T, pUC und pBluescript
Sequenzierprimer SIN-Vektor	5' - ATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCG

## 2.8 Vektoren

Expressionskassetten/Plasmide	Hersteller
CAV1-2A-MDR	Juliane Nehring
CAV1-IRES-EGFP	David Barzan <sup>180</sup>
CAV1-RFP	Patrick Maier
CAV1 <sup>Y14F</sup> -IRES-EGFP	Juliane Nehring
MDR1-EGFP	Juliane Nehring
MDR1-GFP	Patrick Maier
MGMT-2A-MDR1	Doreen Heckmann <sup>181</sup>
pCMV-VSV.G	<sup>182</sup>
pConst	Prof. Schütz (DKFZ, Heidelberg)
pGEM-T	Promega, Mannheim
pHR'SIN-cPPT-SEW (Zitat)	<sup>183</sup>
pMD.G	<sup>184</sup>
pUC	New England Biolabs, Frankfurt/Main

## 2.9 Inhibitoren

Produkt, Ziel, Lösungsmittel	Hersteller
SB203580, p38 Inhibitor, Ethanol	Merck, Darmstadt
SP600125, JNK Inhibitor, DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SU6656, SFK Inhibitor, DMSO	Merck, Darmstadt

## 2.10 Antikörper

Primärantikörper Proteingröße, Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Caspase 8 (#9746) 57 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Cleaved Caspase 8 (#9496) 41/43 kDa, 18 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CAV1 (N-Terminus) (sc-894) 21 kDa, 1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
CAV1 (C-Terminus) (LS-C118400) 21 kDa, 1:1000	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA
p-CAV1 (Tyr14) 21 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p38 (#8690) 38 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-p38 (#9211) 38 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Src* (#2109) 60 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-SFK (#2113) 60 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-JNK (#9251) 54 kDa, 46 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
JNK (#9258) 54 kDa, 46 kDa, 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
MDR1 (G-1) (sc-13131) 170 kDa, 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
$\beta$ -Aktin (A5441) 42 kDa, 1:20000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

\*Herstellerangaben: Antikörper erkennt möglicherweise auch andere Src Familienmitglieder.

Sekundärantikörper	Hersteller
goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) 1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005) 1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG ReadyProbes® 2 Tropfen pro 1 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG ReadyProbes® 2 Tropfen pro 1 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.11 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Medium/Zusatz	Hersteller/Zusammensetzung
10x Trypsin-EDTA	20 % v/v Trypsin in autoklavierter EDTA-Lösung
2x Trypsin-EDTA	20 % v/v 10x Trypsin-EDTA in PBS
DMEM	Biochrom, Berlin
EDTA-Lösung	0,25 % w/v, pH 7,2 – 7,4 in PBS; autoklaviert
EDTA-Lösung	0,25 % w/v in PBS; autoklaviert
Einfriermedium	10 % v/v DMSO in Wachstumsmedium
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom, Berlin
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Biochrom, Berlin
Polybrene Stammlösung	800 µg/ml in PBS



RPMI	Biochrom, Berlin
Transduktionsmedium	1 % v/v Polybrene Stammlösung in Wachstumsmedium
Trypsin 1:250, 2,5 %	Biochrom, Berlin
Vincristine Stammlösung	1 $\mu$ M Vincristine in PBS
Wachstumsmedium 293T, HT1080	10 % v/v FBS in DMEM
Wachstumsmedium TK6	10 % v/v hitzeinaktiviertes Pferdeserum in RPMI

## 2.12 Zellen

Zellen	Quelle
TK6	174
HEK 293T	ATCC, Manassas, USA 185
HT1080	186
Kompetente <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 3 METHODEN

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Zellkultivierung von TK6 Zellen

TK6 Zellen wurden dreimal pro Woche im Verhältnis 1:15 passagiert. Hierfür wurde 1 ml der Zellsuspension in 14 ml frischem Medium in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> stehend kultiviert. Pferdeserum wurde bei 65 °C für 30 min hitzeinaktiviert.

#### 3.1.2 Zellkultivierung von 293T-Zellen

Für die Virusproduktion benötigte Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:8 bis 1:15 passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgenommen und der Zellrasen vorsichtig mit 6 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml 2x Trypsin zugegeben und die Zellen zum Ablösen bei 37 °C für 2 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen wurden resuspendiert. Ein entsprechender Anteil Zellsuspension wurde zu 13 ml frischem Zellkulturmedium in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> liegend kultiviert.

#### 3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden bei 140 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in Einfriermedium aufgenommen, sodass die Zellkonzentration 1 x 10<sup>6</sup>/ml betrug. Aliquots von je 1 ml wurden in Cryoröhrchen bei -80 °C über Nacht eingefroren, bevor sie zur dauerhaften Lagerung in Flüssigstickstofftanks transferiert wurden. Zum Auftauen wurden die Zellen in handwarmem Wasser aufgetaut, in 7 ml Medium aufgenommen, bei 140 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 5 ml Medium aufgenommen und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche transferiert. Nach 48 h wurde das Medium auf 10 ml aufgefüllt.

## 3.2 Virusarbeiten und Etablierung von TK6 Zellmodellen

### 3.2.1 Produktion lentiviraler Viruspartikel

#### *Transfektion von 293T-Zellen*

An Tag 1 wurden  $5 \times 10^6$  293T-Zellen pro Produktionsplatte (10 cm Durchmesser) in 14 ml Zellkulturmedium ausgesät. Für eine Virusproduktion wurden 8 Platten ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem gewünschten lentiviralen Plasmid sowie dem für das Hüllprotein VSV-G codierenden Plasmid pCMV-VSV.G und pMD.G, das für die Verpackungsproteine codiert. Für die Transfektion wurde Metafectene nach Herstellerangaben eingesetzt. Pro Platte wurden 3,4  $\mu\text{g}$  pCMV, 2,2  $\mu\text{g}$  pMD.G und 4,4  $\mu\text{g}$  des gewünschten lentiviralen Plasmids in 700  $\mu\text{l}$  DMEM ohne FBS gegeben (Plasmid-Ansatz). Für den Metafectene-Ansatz wurden pro Platte 42  $\mu\text{l}$  Metafectene in 700  $\mu\text{l}$  DMEM ohne FBS gegeben. Plasmid- und Metafectene-Ansatz wurden zum Transfektionsansatz vereint und für 15 min inkubiert. Pro Platte wurden 1,4 ml Transfektionsansatz zum Zellkulturmedium zugegeben und die Platte geschwenkt. An Tag 3 erfolgte am Morgen ein Mediumwechsel zu 5 ml Zellkulturmedium mit 10 mM Natriumbutyrat. Am Abend wurde das Natriumbutyrat haltige Medium entfernt und durch 7 ml DMEM ohne FBS ersetzt.

#### *Ernte der lentiviralen Viruspartikel*

An Tag 4 der Virusproduktion wurde der Überstand, der die lentiviralen Viruspartikel enthielt, mit einer 20 ml Spritze abgenommen und mittels 0,45  $\mu\text{m}$  Filteraufsatz geklärt. Danach wurde der geklärte Überstand auf Vivaspin-Säulen gegeben, die vorher mit DMEM ohne FBS äquilibriert worden waren. Die Konzentrierung der Viruspartikel bis auf 1 ml erfolgte durch Zentrifugation der Vivaspin-Säulen bei 1200 g und 4 °C. Die Lagerung der lentiviralen Viruspartikel erfolgte bei -80 °C in Aliquots von 100  $\mu\text{l}$ .

#### *Titration lentiviraler Viruspartikel*

Für die Titration lentiviraler Viruspartikel mittels FACS-Analyse ist die cDNA für einen Fluoreszenzmarker in der Expressionscassette des lentiviralen Plasmids nötig. An Tag 1 wurden  $8 \times 10^4$  HT1080-Zellen in 1 ml Zellkulturmedium pro *well* einer 24-*well* Platte ausgesät. An Tag 2 erfolgte die Transduktion der HT1080 Zellen. Dazu wurde eine serielle Verdünnung des lentiviralen Virus in Transduktionsmedium im Bereich  $1 \times 10^{-1}$  bis  $1 \times 10^{-6}$  erstellt. Das von den Zellen verbrauchte Medium wurde abgenommen und pro *well* wurden je 300  $\mu\text{l}$  jeder Virusverdünnungsstufe zugegeben. Für die Kontrolle wurden 300  $\mu\text{l}$  Transduktionsmedium ohne Virus zugegeben. Nach

24 h wurde das Medium entfernt und durch 1 ml Zellkulturmedium ersetzt. An Tag 5 wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden durch Trypsinierung abgelöst, in Zellkulturmedium aufgenommen und bei 140 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 200 µl PBS aufgenommen. Die Probe wurde zur Unterscheidung lebender und toter Zellen mit Propidiumjodid (1:200) versetzt und im FACS-Gerät analysiert.

### 3.2.2 Etablierung von TK6 Zellmodellen

#### *Transduktion von TK6 Zellen*

Die zu transduzierenden TK6 Zellen wurden einen Tag nach Passagieren gezählt und die Zellzahl auf  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Pro Transduktion wurden 200 µl dieser Zellsuspension in ein *well* einer 24-*well*-Platte pipettiert und mit dem nötigen Volumen an Virus versetzt, um die gewünschte Menge infektiöser Partikel im *well* zu erhalten. Zellen wurden mit einer MOI von 10 transduziert. Das nötige Virusvolumen wurde in Transduktionsmedium angesetzt und wenn nötig auf 300 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Am Folgetag wurde mit 200 µl Medium auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. 48 h nach Transduktion erfolgte die FACS-Analyse auf den Anteil an lebenden Zellen, der für den Fluoreszenzmarker (erfolgreiche Transduktion) positiv war.

#### *Expansion der transduzierten Zellen*

Zur Expansion der Zellen wurde nach erfolgtem Zellwachstum zunächst das Medium bis auf 1 ml im 24-*well* aufgefüllt, der im nächsten Schritt mit 2 ml frischem Medium in ein *well* einer 6-*well*-Platte transferiert wurde. Anschließend wurde mit 2 ml frischem Medium zu 5 ml aufgefüllt und die Zellen wurden in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche transferiert. Abschließend wurde mit 5 ml frischem Medium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. In der Regel konnte der jeweils nächste Expansionsschritt nach 48 h durchgeführt werden. Nach Expansion wurde ein Teil der Zellen bei -80 °C eingefroren und der restliche Teil für die Sortierung verwendet.

#### *FACS-Sortierung der transduzierten TK6 Zellen*

Für die FACS-Sortierung der transduzierten TK6 Zellen, die einen Fluoreszenzmarker enthielten, wurden  $3 \times 10^7$  Zellen in 3 ml eiskaltem Zellsortierungspuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bis zur Sortierung auf Eis gehalten. Nach der Sortierung wurden die Zellen bei 140 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in 500 µl Medium mit Penicillin/Streptomycin (1:100) aufgenommen und in einem 24-*well* kultiviert, bis Zellwachstum sichtbar wurde. Zur

Beurteilung des Erfolgs der FACS-Sortierung wurde eine FACS-Analyse durchgeführt und mit der FACS-Analyse vor Sortierung verglichen. Konnte eine Erhöhung der Intensität und des Anteils an Zellen, die den Fluoreszenzmarker exprimierten, nachgewiesen werden, erfolgte die Expansion der sortierten Zellen in Medium mit Penicillin/Streptomycin (1:100). Sobald das Gesamtvolumen 10 ml in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche betrug, wurden die Zellen 1:10 gesplittet und in je eine Flasche mit bzw. ohne Antibiotika im Medium ausgesät. Kam es zu keiner Kontamination der Zellen in Medium ohne Antibiotika, wurde ein Teil der Zellen bei -80 °C eingefroren. Der Rest wurde für die Weiterkultivierung und anschließende Selektion mit Vincristin oder zur Validierung der Zelllinie verwendet.

#### *Exzision der IRES-EGFP Sequenz mittels Cre-Rekombinase*

Nach Etablierung der Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP sollte die von LoxP-Stellen flankierte IRES-EGFP Sequenz mittels Cre-Rekombinase entfernt werden, um ausschließlich Effekte der mutierten CAV1 Sequenz zu analysieren. Da später auf EGFP negative Zellen sortiert werden sollte, musste zu Beginn der Anteil untransduzierter, für EGFP negative Zellen minimiert werden, indem zwei Sortierunden auf EGFP durchgeführt wurden. Für die Exzision von IRES-EGFP wurde das für die Cre-Rekombinase codierende Plasmid (pConst) mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht. Dazu wurden 2 µg Plasmid mit Elektroporationspuffer auf 95 µl aufgefüllt und 2 x 10<sup>6</sup> Zellen TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP darin resuspendiert. Die Zelllösung wurde in eine Elektroporationsküvette gefüllt und der elektrische Impuls mit Programm X-009 ausgelöst. Danach wurde die Zelllösung in 1 ml Medium mit Penicillin/Streptomycin (1:100) aufgenommen, die Zellen gewaschen und in 500 µl in einem *well* einer 24-*well*-Platte kultiviert. Nach erfolgreicher Expansion wurde mittels FACS die Minderung der EGFP positiven Population kontrolliert. Eine zweite Runde Elektroporation wurde durchgeführt, um den Anteil der EGFP negativen Population zu erhöhen. Anschließend wurden die EGFP negativen Zellen sortiert und in Antibiotika freiem Medium kultiviert um die Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> zu etablieren.

#### 3.2.3 Validierung der transduzierten TK6 Zellen

Die Expression der bei Transduktion eingebrachten DNA musste in den transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurde die Expression auf Proteinebene mittels Western Blot getestet. Dabei wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt und ein Vergleich der Proteinexpression in den unterschiedlichen Etablierungsstadien

durchgeführt. Zelllinien wurden nur dann für Versuche verwendet, wenn Sortierung, Selektion und Validierung abgeschlossen waren.

### *Rhodamin123-Assay*

Für Zellen, die mit MDR1 ohne GFP-Tag transduziert worden waren, war eine FACS-Analyse oder FACS-Sortierung auf GFP positive Zellen nicht möglich. Daher wurde der grün fluoreszierende Farbstoff Rhodamin123 eingesetzt, um MDR1 nachzuweisen und dessen Funktionalität zu prüfen. Der Farbstoff dringt in die Zellen ein und wird aktiv von MDR1 aus der Zelle heraustransportiert. Demzufolge besitzen nur solche Zellen funktionales MDR1, die nach kurzer Aufnahme von Rhodamin123 grün leuchten und nach etwa einer Stunde den Farbstoff herausgepumpt haben und nicht mehr grün leuchten. Das Assay wurde auch bei der Virustiterbestimmung in transduzierten HT1080-Zellen eingesetzt.

Folgender Färbeplan wurde für den Versuch verwendet (Tabelle 1):

Probe	Zellen	Rh123	PJ	Cyclosporin A	Zweck
1	MDR1 negativ	-	-	-	Geräteinstellung
2	MDR1 negativ	+	-	-	
3	MDR1 negativ	-	+	-	
4	MDR1 negativ	+	+	-	Kontrolle
5	MDR1 negativ	+	+	+	
6	MDR1 positiv	+	+	-	Messung
7	MDR1 positiv	+	+	+	

**Tabelle 1: Färbeplan für das Rhodamin123-Assay.**

Pro Reaktionsgefäß wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium eingestellt. Die Negativkontrollen (NK) wurden mit 10 µl Cyclosporin A (Endkonzentration 1,5 µM) versetzt und 2 min inkubiert. Nun wurden 10 µl Rh123 (Endkonzentration 200 ng/µl) in die entsprechenden Reaktionsgefäße gegeben und alle Proben bei 37 °C für 30 min im Schüttler inkubiert. In dieser Zeit gelangt der Farbstoff in die Zellen. Danach wurden die Zellen bei 850 g für 3 min sedimentiert und 3 x mit je 1 ml Stainingmedium gewaschen. Dabei wurden die Negativkontrollen mit je 7,5 µl Cyclosporin A versetzt. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellen in je 1 ml Medium resuspendiert, die Negativkontrollen zusätzlich mit je 7,5 µl Cyclosporin A versetzt und alle Proben bei 37 °C für 1 h im Schüttler inkubiert. In dieser Zeit gaben die MDR1-positiven Zellen den Farbstoff wieder ab. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen. Bis zur

FACS-Messung wurden die Zellen auf Eis gehalten. Unmittelbar vor der FACS-Messung wurde Propidiumjodid (Endkonzentration 5 µg/ml) zu den entsprechenden Proben gegeben. Gemessen wurden die rote und grüne Fluoreszenz.

### *Vincristine Killing Curve*

Zellen, die mit HR'SIN-MDR1 transduziert worden waren, wurden mit Vincristin selektiert, um eine reine Zellpopulation zu erhalten, die funktionales MDR1 exprimiert. Vincristin ist ein Vincaalkaloid, das als Mitosehemmer in der Chemotherapie eingesetzt wird. Nur von Zellen, die funktionales MDR1 besitzen, wird Vincristin aktiv aus der Zelle heraustransportiert, wodurch diese Zellen dem Zelltod entgehen, den dieses Zytostatikum in MDR1-defizienten Zellen hervorruft. Für die Selektion wurde zunächst eine geeignete Vincristin-Konzentration mittels Verdünnungsreihe ermittelt. Ausgehend von einer 2 µM Vincristin Stammlösung wurden jeweils zweifache Verdünnungen (in PBS) bis 0,125 µM hergestellt, die 1:100 eingesetzt wurden (Endkonzentrationen 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,25 nM). Je 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 1 ml pro *well* einer 24-*well* Platte wurden in Duplikaten ausgesät und mit Vincristin behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 96 h Inkubation bei 37 °C wurden Zellen per FACS-Messung analysiert und der Anteil lebender Zellen auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Als geeignete Startkonzentration für die Selektion auf Populationen mit wenig funktionalem MDR1 wurden 10 nM ermittelt, für Populationen mit fast ausschließlich funktionalem MDR1 konnten 20 nM eingesetzt werden. Da die Halbwertszeit von Vincristin im Serum nach intravenöser Injektion zwischen 5 min und 85 h liegt, wurden die mit Vincristin inkubierten Zellen alle 48 h 1:2 gesplittet, wobei die Zellen gewaschen und in Wachstumsmedium mit frischem Vincristin aufgenommen wurden. Die Gesamtzeit der Selektion betrug 8 Tage. Mittels Rhodamin123-Assay wurde der Erfolg der Vincristin-Selektion kontrolliert.

## 3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 Präparation von Proteinlysaten mit RIPA-Puffer

Von den TK6 Zellen wurden 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in ein 15-ml Röhrchen übergeführt, bei 850 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment in 180 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Zur Verhinderung von Dephosphorylierung und Proteindegradation wurden 2,1 µl Phosphataseinhibitor Cocktail II und 30 µl Protease-

inhibitor zugesetzt. Lysate wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor Verwendung wurden Lysate bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5300\text{ g}$  für  $10\text{ min}$  zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Nur der klare Überstand wurde eingesetzt.

### 3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford basiert auf der Bindung des Farbstoffs an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von  $470\text{ nm}$  auf  $595\text{ nm}$  verschiebt. Für die Eichgerade wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  der kommerziellen Proteinstandards ( $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  bis  $2\text{ mg/ml}$ ) von Biorad verwendet. Für den Leerwert wurde A. dest. eingesetzt. Zur Messung wurde das Lysat  $1:20$  in A. dest. verdünnt, um Effekte des SDS im RIPA-Puffer zu reduzieren. Leerwert, Standard und  $5\text{ }\mu\text{l}$  der verdünnten Probe wurden in Duplikaten auf eine *96-well* Platte mit flachem Boden pipettiert, mit  $250\text{ }\mu\text{l}$  Bradford Reagenz versetzt und nach  $5\text{ min}$  wurde die Extinktion bei  $595\text{ nm}$  gemessen.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele wurden verwendet, um Proteine voneinander zu trennen<sup>187</sup>. Durch die Polymerisation des Acrylamids entsteht ein Netzwerk durch das die Proteine wandern, wobei größere Proteine sich langsamer durch das Gel bewegen. Das im Vergleich zum Trenngel großporige Sammelgel lässt Proteine schneller passieren. Dadurch werden sie an der Gelgrenze vor dem Eintritt ins Trenngel konzentriert. Disulfidbrücken im Protein werden durch  $\beta$ -Mercaptoethanol im Proteinladungspuffer reduziert. Das ebenfalls enthaltene anionische SDS bindet an Proteine ( $1,4\text{ g}$  SDS pro  $\text{g}$  Protein) und maskiert deren Eigenladung. Dadurch erfolgt bei der Proteinwanderung zur Anode die Trennung unterschiedlicher Proteine hauptsächlich auf Grund ihrer Größe. Zur Beurteilung der Molekülgröße wurde stets ein entsprechender Proteinmarker mitgeführt, der aus Gründen der Übersichtlichkeit nur teilweise in den Abbildungen dargestellt ist. Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend der unten stehenden Angaben hergestellt (Tabelle 2).

Zur Herstellung der Gele wurde das Biorad-System verwendet. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit A. bidest überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das A. bidest entfernt, das Trenngel mit Sammelgel überschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit  $1\times$  Laufpuffer gespült und die Glasplatten von der Halterung in die mit  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur



gespannt. Pro Vertiefung wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Proteinproben wurden 1:2 mit 2x Laemmli-Proteinladepuffer (komplettiert mit β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert, auf Eis gestellt und vor der Gelbeladung zentrifugiert. Der Gellauf erfolgte bei 85 V bis der Ladepuffer das untere Gelende erreicht hatte.

	12 % Trenngel	Sammelgel
A. bidest	4,9 ml	1,4 ml
Trenngelpuffer	3,8 ml	-
Sammelgelpuffer	-	250 µl
Rotiphorese® Gel 30	6,0 ml	330 µl
10 % SDS	150 µl	20 µl
10 % APS	150 µl	20
TEMED	6 µl	2 µl

**Tabelle 2: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel.**

### 3.3.4 Western Blotting

Mittels Western Blotting wurden die Proteine vom Gel auf eine Membran transferiert<sup>188</sup>. Nach dem Gellauf wurde das Gel aus der Vorrichtung gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Das Trenngel, sowie die passgenau zugeschnittenen Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran wurden in Blottingpuffer äquilibriert. Nacheinander wurden drei Lagen Filterpapier, die Nitrocellulosemembran, das Trenngel und drei abschließende Lagen Filterpapier übereinander gelegt. Luftblasen im Blotstapel wurden durch Abrollen mit einer Glasröhre entfernt. Das Blotten erfolgte für 1,5 h mit 200 mA. Die Membran wurde nach dem Blotten für 2 min in Ponceau S gelegt um den erfolgreichen Proteintransfer nachzuweisen. Nach Entfärbung mit A. bidest und TBS-T wurden freie Proteinbindestellen auf der Membran 1 h mit Blockierlösung blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C auf dem Rollschüttler. Die Antikörperlösung mit dem Primärantikörper wurde abgenommen und die Membran 3x 5 min mit TBS-T auf dem Wippschüttler gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem für den Primärantikörper geeigneten Sekundärantikörper in TBS-T. Die Sekundärantikörperlösung wurde verworfen und die Membran 3x 5 min mit TBS-T auf dem Wippschüttler gewaschen. Für die Detektion

wurde die Membran mit dem Substrat Western Lightning Plus ECL laut Herstellerangaben inkubiert. Das Sekundärantikörper gekoppelte Enzym wandelt das Substrat um, wobei ein Lichtsignal entsteht, das mit dem Fusion Solo dokumentiert wurde. Es wurde ausschließlich unterhalb der Detektionsobergrenze gearbeitet.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

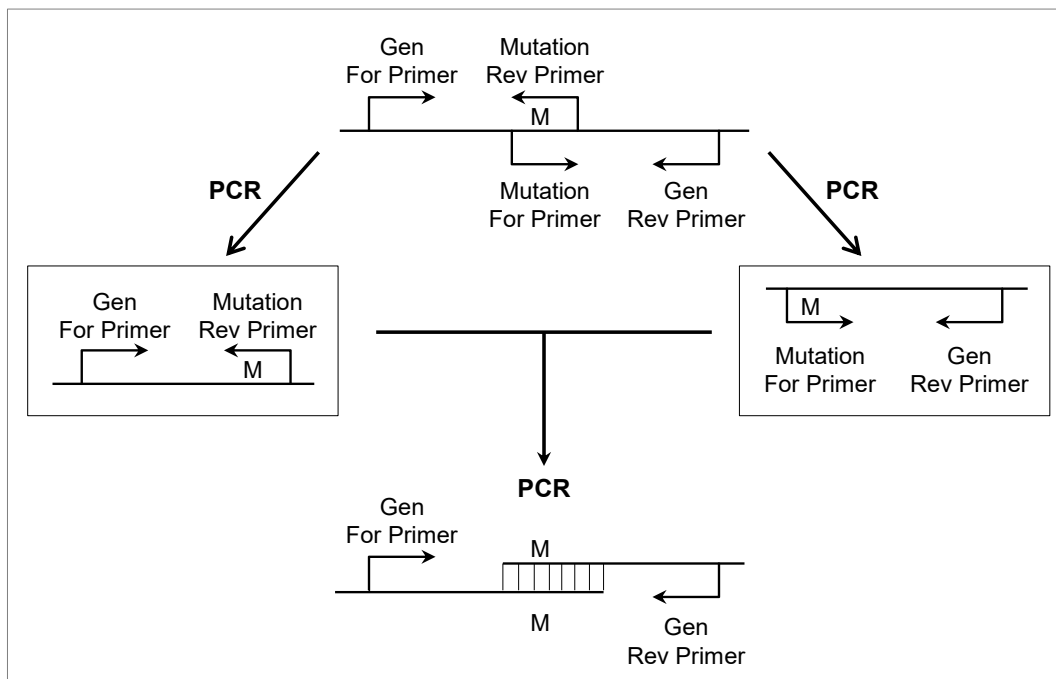
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts, der durch die Wahl der Primer definiert wird<sup>189</sup>. Die doppelsträngige DNA muss zunächst bei 95 °C aufgeschmolzen werden. An die nun einzelsträngig vorliegende DNA können die Primer über komplementäre Basenpaarung spezifisch binden. Diesem sog. *Annealing* schließt sich, ausgehend von den Primern, die Synthese des komplementären Strangs durch die DNA-Polymerase an. Durch Wiederholung der Temperaturänderungen wird die von den Primern begrenzte Sequenz in jedem Zyklus verdoppelt. Das PCR-Produkt kann im Agarosegel auf korrekte Größe kontrolliert werden und anschließend für eine blunt-end Ligation bspw. in pGEM-T verwendet werden, um stets auf die Sequenz von Interesse zugreifen zu können. Die zur Amplifikation der Zielsequenz verwendeten Primer besitzen in ihrem 5'-Bereich die Erkennungssequenz für unterschiedliche Restriktionsendonukleasen. Somit kann das über PCR amplifizierte DNA-Fragment aus pGEM-T geschnitten und in einen anderen Vektor kloniert werden, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut wurde.

Für die PCR wird die thermostabile Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet. Für die Reaktion wurde ein 50 µl PCR-Ansatz laut TopTaq Master Mix Kit pipettiert. Zu 0,6 µg DNA wurden 25 µl 2x TopTaq Master Mix, 1 µl Primer For (10 µM), 1 µl Primer Rev (10 µM) und 5 µl CoralLoad Concentrate pipettiert und auf 50 µl wurde mit A. bidest aufgefüllt. Die PCR erfolgte auf diese Weise:

BamHI-CAV1 <sup>Y14F</sup> -XbaI		BamHI-CAV1 <sup>Y14F</sup> -XhoI	
10 min	95 °C	10 min	95 °C
30 sek	95 °C	30 sek	95 °C
30 sek	60 °C	30 sek	56 °C
1 min	72 °C	1 min	72 °C
Wdh. Schritt 2 – 4 30x		Wdh. Schritt 2 – 4 30x	
10 min	72 °C	10 min	72 °C
∞	4 °C	∞	4 °C

### Mutagenese mittels Overlap-PCR

Um eine Mutation in eine bestehende cDNA einzufügen, wurden Primer synthetisiert, die sich in dem zu mutierenden Bereich überlappen und die entsprechende Mutation enthalten. Zusätzlich wurden ein 5'-flankierender Primer und ein 3'-flankierender Primer verwendet, die jeweils in ihrem 5'-Bereich entsprechende Restriktionsschnittstellen für spätere Klonierungsschritte enthielten (Abb. 6). In zwei unabhängigen PCR-Reaktionen wurden zunächst Amplifikate generiert, die sich aus dem 5'-flankierenden Primer mit 3'-Mutageneseprimer bzw. 3'-flankierenden Primer mit 5'-Mutageneseprimer ergeben. Beide PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese auf korrekte Größe überprüft und anschließend mit dem PCR Purification Kit gereinigt. Dabei werden Nukleotide, Primer, Enzyme und Salze entfernt. In der abschließenden Reaktion wurde mittels 5'- und 3'-flankierenden Primern das Gesamtprodukt hergestellt. Hierfür wurden von jedem PCR-Produkt 50 ng eingesetzt. Eine Größenkontrolle im Agarosegel und die Reinigung mit dem PCR Purification Kit erfolgten ebenfalls. Das PCR-Produkt wurde für eine blunt-end-Ligation eingesetzt.



**Abb. 6: Prinzip der Mutagenese-PCR.** In zwei unabhängigen PCR-Reaktionen werden PCR-Produkte generiert, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Mutageneseprimer überlappen in einem Bereich 5' und 3' um die Mutation. In einer abschließenden PCR werden die zwei vorherigen PCR-Produkte als Template eingesetzt, wobei die Polymerase einen durchgehenden Strang synthetisiert. Dieses PCR-Produkt enthält nun die Mutation an der gewünschten Stelle sowie Restriktionsschnittstellen, wie sie von den genflankierenden Primern vorgegeben werden.

### 3.4.2 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese wurde durchgeführt, um DNA einer Probe ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Phosphatgruppen der DNA sind negativ geladen, daher bewegt sie sich nach Anlegen einer Spannung von der Kathode zur Anode durch das Gel. Handelt es sich um linearisierte DNA, bewirkt der Siebeffekt des Gels, dass längere DNA das Gel langsamer durchläuft als kurze DNA. Neben der Größe beeinflusst jedoch auch die Konformation der DNA ihr Laufverhalten. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde Ethidiumbromid verwendet, das in die DNA interkaliert und sie unter UV-Licht sichtbar macht. Zur Beurteilung der Fragmentgröße wurde stets ein geeigneter Marker mitgeführt. Die 1 %-ige Agarosegellösung wurde unter Kochen hergestellt und nach Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde sie in eine mit Kamm versehene, abgedichtete Vorrichtung gegossen. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde der Kamm entfernt, die Proben mit 6x Probenladepuffer versetzt und aufgetragen. Der Gellauf fand in 1x TAE-Puffer bei 100 V für 30 min statt. Die Geldokumentation erfolgte mit dem Intas Gel Imager. Banden für eine Ligation wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

### 3.4.3 Ligation

Um Vektor und Insert mit Überhängen miteinander zu ligieren, müssen deren Enden zueinander komplementär sein. Die Ligase schließt das Zuckerphosphatrückgrat durch Ausbildung einer Esterbindung zwischen den DNA-Molekülen. Für den Ligationansatz wurden 2 µl 10x Ligationpuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase eingesetzt. Die eingesetzten Mengen an Vektor und Insert variierten je nach Ligation; gängig war ein Verhältnis von 1:3 von Vektor:Insert. Für die Berechnung der einzusetzenden Volumina wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{ng (Insert)} = \frac{\text{ng (Vektor)} \times \text{kb Größe (Insert)}}{\text{kb Größe (Vektor)}} \times \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \text{ Ratio}$$

$$\text{Volumen (Insert)} = \frac{\text{ng (Insert)}}{\text{Konzentration (Insert)}}$$

$$\text{Volumen (Vektor)} = \frac{\text{ng (Vektor)}}{\text{Konzentration (Vektor)}}$$

Der Ansatz wurde auf 10 µl mit A. bidest aufgefüllt und 1 h inkubiert. Für den Kontrollansatz wurde statt Insert A. bidest eingesetzt.

#### 3.4.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

50 µl DH5α *E. coli*-Zellen wurden mit dem Ligationsansatz bzw. dem Ligationskontrollansatz versetzt, 10 min auf Eis inkubiert, für 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und anschließend mit LB-Medium auf 300 µl aufgefüllt. Der Transformationsansatz wurde für 45 min bei 37 °C geschüttelt, danach 3 min bei 850 g sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Sediment wurde im zurückbleibenden LB-Medium resuspendiert und auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden auf die Agarplatten vor Ausplattieren der Bakterien das chromogene Substrat X-Gal und IPTG ausgestrichen. Für die Klonierung wurden *E. coli* verwendet, deren lacZ Operon mit einer multiplen Klonierungsstelle ausgestattet ist. Bleibt das lacZ Operon intakt, wird funktionelle β-Galaktosidase produziert, mit deren Hilfe X-Gal hydrolysiert wird und ein blaues Pigment in den Kolonien entsteht (so genannte α-Komplementation). Wird auf Grund der eingebrachten Fremd-DNA die lacZ Sequenz unterbrochen, wird keine X-Gal hydrolysierende β-Galaktosidase hergestellt, und es bilden sich weiße Kolonien, die eine erfolgreiche Rekombination anzeigen.

#### 3.4.5 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Für die DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Minipräparation) wurde eine Kolonie der LB-Ampicillin-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und über Nacht bei 37 °C in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin geschüttelt. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit laut Herstellerangaben extrahiert. Zunächst wurden die Zellen sedimentiert, lysiert, und anschließend die DNA an eine Silikamembran gebunden. Nach mehreren Waschschritten, in denen Kontaminationen entfernt wurden, erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 50 µl Elutionspuffer.

#### 3.4.6 Restriktionsverdau

Sequenzabschnitte von meist 6 bp oder 8 bp können spezifisch von Restriktionsenzymen erkannt werden. Diese spalten die Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass sie den Zielvektor genau einmal schneiden und gleichzeitig komplementäre Überhänge entstehen, an die ein gleichermaßen verdauter DNA-Abschnitt von Interesse binden kann. Für den Verdau wurde 500 ng DNA eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Verdau 1 µl 10x BSA, je 1 µl der benötigten Restriktionsenzyme und 1 µl Puffer für die entsprechende Enzymkombination verwendet. Der Ansatz wurde auf 10 µl mit A. bidest aufgefüllt und erfolgte für 1 h

bei 37 °C. Der Restriktionsansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei korrekten Bandengrößen nach der Klonierung eines PCR-Fragments erfolgte die Überprüfung der korrekten Nukleotidabfolge durch Sequenzierung. Nach einem präparativen Verdau von 4 µg DNA wurden die Banden der korrekten Größe ausgeschnitten und die DNA extrahiert, bevor sie für die nächste Ligation eingesetzt wurde.

#### 3.4.7 Gelelution

Um die DNA mittels QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel zu extrahieren, wurde laut Herstellerangaben gearbeitet. Die Gelstücke wurden in Puffer QC, einem Hochsalzpuffer, bei 50 °C geschmolzen und anschließend wurde die DNA an eine Silica-Säule gebunden. Nach mehreren Waschschritten, in denen Enzyme, Salze, Agarose, Nukleotide und Primer sowie andere Verunreinigungen entfernt wurden, erfolgte die Elution der DNA mit 30 µl Niedrigsalzpuffer. Die DNA konnte nun für die nächste Ligation eingesetzt werden.

#### 3.4.8 Präparation von Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Für die DNA-Präparation im großen Maßstab (Maxipräparation) wurde nach dem Hitzeschock der DH5α *E. coli*-Zellen eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurden die Zellen in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin aufgenommen und bei 37 °C 4 h geschüttelt. Die Vorkultur wurde anschließend zu 150 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am Folgetag erfolgte die Plasmid-Präparation mittels Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit laut Herstellerangaben. Das Zellsediment wurde lysiert, und die DNA anschließend an eine Silikamembran gebunden. Die Elution erfolgte mit 200 µl Elutionspuffer.

### 3.5 Zellbehandlung

#### 3.5.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Zur Induktion von oxidativem Stress wurden in 6-well Platten ausgesäte TK6 Zellen für die angegebenen Zeitpunkte und Konzentrationen bei 37 °C mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend Zelllysate hergestellt. Für die Inhibitorstudien wurden die Zellen mit Vehikel, 10 µM SB203580 (p38 MAPK Inhibitor), SP600125 (JNK Inhibitor) oder SU6656 (SFK Inhibitor) für 1 h bei 37 °C vorbehandelt und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert.

### 3.5.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit 6 MV Röntgenstrahlung und einer Dosisrate von 6,7 Gy/min am Patientenbestrahlungsgerät (Elekta Synergy) der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen Fakultät Mannheim. Für die Inhibitorstudien wurden die Zellen mit Vehikel, 10  $\mu$ M SB203580 (p38 MAPK Inhibitor), SP600125 (JNK Inhibitor) oder SU6656 (SFK Inhibitor) für 1 h bei 37 °C vorbehandelt und anschließend bestrahlt.

Zellen wurden ausschließlich in der Log-Wachstumsphase bestrahlt, da andernfalls Unterschiede bezüglich Proliferation und Apoptose nicht mehr sichtbar sind <sup>190</sup>.

## 3.6 Analysen zum Zellüberleben nach Bestrahlung

### 3.6.1 Kurzzeit-Proliferationsassay mittels MTT

Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blauviolettes Formazan in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen. Direkt vor Bestrahlung wurden pro Vertiefung  $2 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l in 96-well Platten mit flachem Boden ausgesät. Für jede Bedingung erfolgte eine Vierfachbestimmung. Zellfreies Kulturmedium wurde für die Leerwertbestimmung eingesetzt. Nach Bestrahlung folgte die Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C. Danach wurden 20  $\mu$ l MTT-Reagenz zugegeben, die Platten für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 100  $\mu$ l MTT-Lysepuffer zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde die Absorption bei 540 nm gegen den Hintergrund bei 690 nm gemessen. Von allen Messwerten wurde der Mittelwert des Leerwerts subtrahiert.

### 3.6.2 Langzeit-Proliferationsassay mittels alamarBlue

Das alamarBlue Assay wurde verwendet um die Proliferation bestrahlter TK6 Zellen zu quantifizieren. Das Prinzip basiert auf der Umwandlung des blauen, oxidierten Resazurins in das reduzierte, rote Resorufin durch metabolisch aktive Zellen. Die Fluoreszenzmessung von alamarBlue erfolgt mit einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Direkt vor Bestrahlung wurden pro well 1000 Zellen in 200  $\mu$ l in 96-well Platten ausgesät. Für jede Bedingung erfolgte eine Vierfachbestimmung. Für die Messung der metabolischen Aktivität in den ersten 24 h nach Bestrahlung erfolgte direkt nach Bestrahlung die Zugabe von 20  $\mu$ l alamarBlue pro well und die sofortige Messung der Fluoreszenz. Nach Inkubation bei 37 °C für 24 h wurde die Fluoreszenz erneut gemessen und die Differenz (24 h nach

Zugabe – direkt nach Zugabe) aus 4 *wells* gemittelt. Für Tag 2 wurde 24 h nach Bestrahlung alamarBlue zugesetzt, gemessen und 24 h nach dieser Zugabe erneut gemessen, um die mittlere Differenz zu berechnen. Dieses Schema wurde bis Tag 10 nach Bestrahlung fortgesetzt. Alle Messwerte wurden zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) auf Tag 1 normalisiert.

### 3.6.3 Koloniebildungstest

Zur Untersuchung des klonogenen Zellüberlebens nach Bestrahlung wurden je 200 µl einer TK6 Zellsuspension mit der angegebenen Zellkonzentration (Tabelle 3) in 96-*well* Platten ausgesät und anschließend bestrahlt. Für jede Bedingung wurde eine vollständige 96-*well* Platte eingesetzt <sup>191</sup>. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl an *wells* ohne Kolonien bestimmt und damit die Überlebensfraktion gemäß  $SF = \ln(96/W_{IR}) / \ln(96/W_0)$  berechnet, wobei  $W_{IR}$  die Anzahl an *wells* ohne Kolonien bei einer bestimmten Dosis ist, und  $W_0$  die Anzahl an *wells* ohne Kolonien bei 0 Gy ist. Die Überlebenskurven (SF: *surviving fraction*, Überlebensfraktion) wurden mit dem linear-quadratischen Modell  $SF(D) = \exp(-(\alpha D + \beta D^2))$  *gefittet*, wobei D die Bestrahlungsdosis,  $\alpha$  und  $\beta$  zellspezifische Parameter,  $\alpha D$  die Anfangsneigung der Kurve bei niedrigen Dosen und  $\beta D$  die Krümmung der Kurve bei höheren Dosen darstellen.

Dosis	Zellkonzentration
0 Gy	5/ml
1 Gy	10/ml
2 Gy	100/ml
3 Gy	250/ml
4 Gy	500/ml
6 Gy	2500/ml

**Tabelle 3: Zellkonzentrationen für die verwendeten Bestrahlungsdosen.**

### 3.6.4 Apoptosemessung nach Zellkernfärbung mittels Hoechst

Zellen wurden für 24 h und 48 h nach Bestrahlung bei 37 °C inkubiert und danach für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Fixierte Zellen wurden mit Hoechst 33342 versetzt (Endkonzentration 10 µg/ml) und am Fluoreszenzmikroskop 200 Zellkerne gezählt. Kerne mit irregulärer Chromatinkondensation (fragmentierte Zellkerne) wurden als apoptotisch bewertet.



### 3.6.5 DAPI Färbung

Für die Analyse der Koloniebildungstests wurde DAPI verwendet, um Zellkerne zu färben und Aufschluss über die Natur der Kolonien in TK6-CAV1-MDR1 zu erhalten. DAPI wurde direkt in das zu analysierende *well* gegeben und mittels Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen dokumentiert.

## 3.7 Co-Lokalisationsstudien

### 3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung

#### *Zellbestrahlung*

TK6-CAV1-MDR1 wurden mit 2 Gy bestrahlt und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert. Dazu wurde 1 ml Zellsuspension bei 850 g für 3 min zentrifugiert und das Sediment für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und abschließend in 300 µl PBS gelagert.

#### *Vorbereitung der Objektträger*

Zunächst wurde eine Methode etabliert, mit der die in Suspension wachsenden TK6 Zellen auf dem Objektträger immobilisiert wurden, um die Fluoreszenzfärbung durchführen zu können. Unter sterilen Bedingungen wurde der zu verwendende Objektträger mit Ethanol gereinigt und randnah mit Fettstift ein rechteckiges Areal aufgezeichnet. Dieses Areal wurde mit Poly-D-Lysin für 5 min beschichtet und anschließend 2x mit PBS und A. dest. gewaschen. Der getrocknete Objektträger wurde in eine sterile Petrischale gelegt. Das beschichtete Areal wurde nun mit den nach Bestrahlung fixierten, in PBS gelagerten, Suspensionszellen benetzt und die Schale über Nacht im Inkubator gehalten, um eine gute Zellhaftung zu erreichen.

#### *Immunfluoreszenzfärbung*

Nach Haftung der Zellen an den Objektträger über Nacht wurde das Medium vorsichtig abgekippt und der Objektträger unter sterilen Bedingungen getrocknet. Anschließend wurde das Areal 2x mit PBS gewaschen. Um dabei das Ablösen der Zellen zu vermeiden, wurden nachfolgend alle Flüssigkeiten vorsichtig in einer Ecke des Areals zugegeben und anschließend der Objektträger auf dem Wippschüttler sanft geschwenkt. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 % BSA in PBS für 20 min blockiert und erneut 2x mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem

Primärantikörper (1:100 in PBS) erfolgte für 1 h, anschließend wurde 2x mit PBS gewaschen, gefolgt von Inkubation mit dem Sekundärantikörper im Dunkeln. Nach 2x waschen mit PBS wurden die Zellen mit Vectashield ohne DAPI eingedeckt.

### 3.7.2 Konfokalmikroskopie

Die Analyse der Lokalisation von CAV1 und MDR1 in bestrahlten TK6-CAV1-MDR1 erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Folgende Einstellungen wurden für alle Messungen verwendet: *Airy Unit 1; Frame Average 4; Sequential Scan – Between Frames*. Anhand der *Lookup Tables* (LUT) wurde die Laserintensität so eingestellt, dass die Signalsättigung minimal gehalten wurde. Zur Detektion von Alexa Fluor 488 wurde mit 488 nm angeregt und im Emissionsbereich von 493 nm – 596 nm gemessen; zur Detektion von Alexa Fluor 594 wurde mit 552 nm angeregt und im Emissionsbereich von 600 nm – 765 nm gemessen. Für konfokale z-Stapel wurden Start- und Endpunkt definiert und im Abstand von 0,35  $\mu\text{m}$  in beiden Kanälen sequenziell (*between frames*) ein Bild aufgenommen, sodass pro Stapel 35 - 40 Ebenen aufgenommen wurden.

### 3.7.3 Auswertung

Die statistische Auswertung der Bilder erfolgte mittels ImageJ-Software Version 1.50b und den Plugins Coloc2 und Colocalization Threshold. Es wurden zwei unterschiedliche Plugins verwendet, da Li ICQ nur in Coloc2 verfügbar war und Abweichungen der Datenausgabe beobachtet wurden, die sich erst mit der Zeit als marginal herausstellten. Für die Berechnung der Kolokalisationsparameter wurden 200 Zellen pro Kondition analysiert. Die Bewertung der Co-Lokalisation auf Basis einer Gelbfärbung bei Überlappung von rot und grün ist unzureichend, da sie voraussetzt, dass die Grauskaladynamik der Kanäle „rot“ und „grün“ identisch sind (was praktisch großer Zufall wäre). Der hier verwendete grundlegende Ansatz zur Bewertung von Co-Lokalisation ist ein statistischer Ansatz basierend auf der Analyse von Korrelationskoeffizienten, die die Stärke der linearen Beziehung zwischen Grauwerten der Fluoreszenzintensität der Pixel von rotem und grünem Bildpaar wiedergibt<sup>192, 193</sup>. Mittels Costes-Methode wurde in automatischer Berechnung ein unterer Grenzwert festgelegt<sup>194</sup>.

#### *Pearson R*

Von Pearson entwickelt und von Manders für Lokalisationsstudien adaptiert<sup>195</sup>,

<sup>196</sup>. Die Grauwerte der Pixelintensitäten des roten und grünen Bildes werden in

einem x-y-Koordinatensystem als sog. *scatter plot* dargestellt. Anhand der Verteilung kann für solche Pixel mit Intensitäten in beiden Kanälen eine statistische Beziehung ermittelt werden. Bei Proportionalität ist diese eine Linie, deren Anstieg die Stöchiometrie wiedergibt (bei indentischen Intensitäten der Kanäle ist der Anstieg exakt 1). Pearson R gibt die Korrelation, also die Güte, dieser Geraden wieder (bei perfekter Korrelation:  $R = 1$ ; bei perfektem Ausschluss:  $R = -1$ ). Trotz perfekter Korrelation nimmt R ab, wenn eine der Intensitäten überwiegt. Bei partieller Co-Lokalisation gibt es Pixelintensitäten, die ausschließlich rot oder grün sind, sodass eine diffuse Wolke entsteht, deren Gerade eine Korrelation von  $-1 < R < 1$  aufweist. Die Zunahme von Rauschen führt zu einer diffusen Wolke nahe des Koordinatenursprungs, sodass Korrelation R der Regressionsgeraden in Richtung 0 abnehmen wird.

#### *Manders' Koeffizient*

Dieser basiert auf der Pearson-Korrelation. Der Koeffizient wird für beide Kanäle separat angegeben ( $tM1$  und  $tM2$ ). Er ist unabhängig von Unterschieden der Intensität der Kanäle. Voraussetzung ist, dass der Hintergrund gleich 0 ist; ist sehr anfällig für Rauschen. Es ist keine Unterscheidung zwischen vollständiger und unvollständiger Co-Lokalisation möglich. Es gibt keine Proportionalität der Signale wieder, sondern reines Signalauftreten.

$$tM1 = \frac{\text{Summe (Intensität rot, wenn grün} > 0)}{\text{Summe Intensität rot}}$$

$$tM2 = \frac{\text{Summe (Intensität grün, wenn rot} > 0)}{\text{Summe Intensität grün}}$$

#### *Li ICQ (intensity correlation quotient)*

Dieser Ansatz basiert darauf, dass eine Zunahme in einem Kanal auch eine Zunahme im anderen Kanal bedeutet, und anders herum (synchrone Intensitätskorrelation). Die statistische Berechnung basiert auf der Annahme, dass die Differenz aller Pixelintensitäten ( $A_i, B_i$ ) eines Kanals zur mittleren Intensität ( $a, b$ ) (fast) null ist, und dass das Produkt dieser Differenz  $(A_i - a) \times (B_i - b)$  für die unterschiedlichen Kanäle demzufolge auch nahe null liegt. Bei co-lokalisierten Pixeln ist die synchrone Abweichung der tatsächlichen Intensität vom jeweiligen Kanalmittelwert entweder positiv oder negativ, und in jedem Fall für alle Kanäle mit dem gleichen Vorzeichen behaftet, sodass das Produkt der Differenzen positiv ist. Bei Asynchronität ist das Produkt negativ. Die Intensitätsskala wird herunterskaliert,

sodass die höchste Intensität bei 1 liegt. Die normalisierten Intensitätswerte (zw. 0 und 1) werden als Funktion des Produkts  $(A_i - a) \times (B_i - b)$  angegeben (ergibt pro Kanal ein Diagramm). Für den ICQ wird von dem Quotient der Summe positiver Produkte (synchrone Pixel)  $[(A_i - a) \times (B_i - b) / \text{alle Produkte } (A_i - a)]$  der Wert 0,5 abgezogen. Bei Zunahme der Co-Lokalisation nehmen die positiven Produkte zu und der Wert steigt an; bei Abnahme der Co-Lokalisation sinkt die Synchronität, die negativen Produkte nehmen zu, und der Quotient sinkt.

Die folgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über die ausgewerteten Parameter, deren Bedeutung, mögliche Wertelage und Eigenschaften.

Plugin	Colocalization Threshold und Coloc2		Nur Coloc2
Parameter	Manders' tM1, tM2 <sup>196</sup>	Pearsons' R	Li ICQ <sup>197</sup>
Bedeutung	Ratio aus Summe der Intensitäten eines Kanals (beide Kanäle > 0) zu Gesamtintensität des Kanals	Güte der linearen Regressionsgerade, die die Beziehung zwischen Kanalintensitäten beschreibt	Zeigt, ob Pixelintensitäten in beiden Kanälen über/unter dem jeweiligen Kanalmittel liegen (synchron oder asynchron)
Wertelage	$0 \leq tM1/tM2 \leq 1$ 0: perfekter Ausschluss 1: perfekte Co-Lokalisation	$-1 \leq R \leq +1$ -1: perfekter Ausschluss +1: perfekte Co-Lokalisation	$-0,5 \leq ICQ \leq +0,5$ -0,5: perfekter Ausschluss (asynchron) +0,5: perfekte Co-Lokalisation (synchron)

Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Unabhängig von unterschiedlichen Pixelintensität in den Kanälen</li> <li>▪ biologisch interpretierbar</li> <li>▪ Voraussetzung: kein Hintergrund</li> <li>▪ keine Unterscheidung zwischen vollständiger und unvollständiger Co-Lokalisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ unkomplizierte Berechnung</li> <li>▪ erkennt perfekte Korrelation sehr gut</li> <li>▪ abhängig von einer linearen Beziehung der Pixelintensitäten</li> <li>▪ beeinflusst von <i>bleedthrough</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ keine Wichtung der Signalintensitäten</li> <li>▪ Beeinflusst durch Rauschen</li> </ul>
---------------	---	--	---

▪ **Tabelle 4: Übersicht über Co-Lokalisationsparameter und deren Eigenschaften.**

### 3.8 Statistische Auswertung

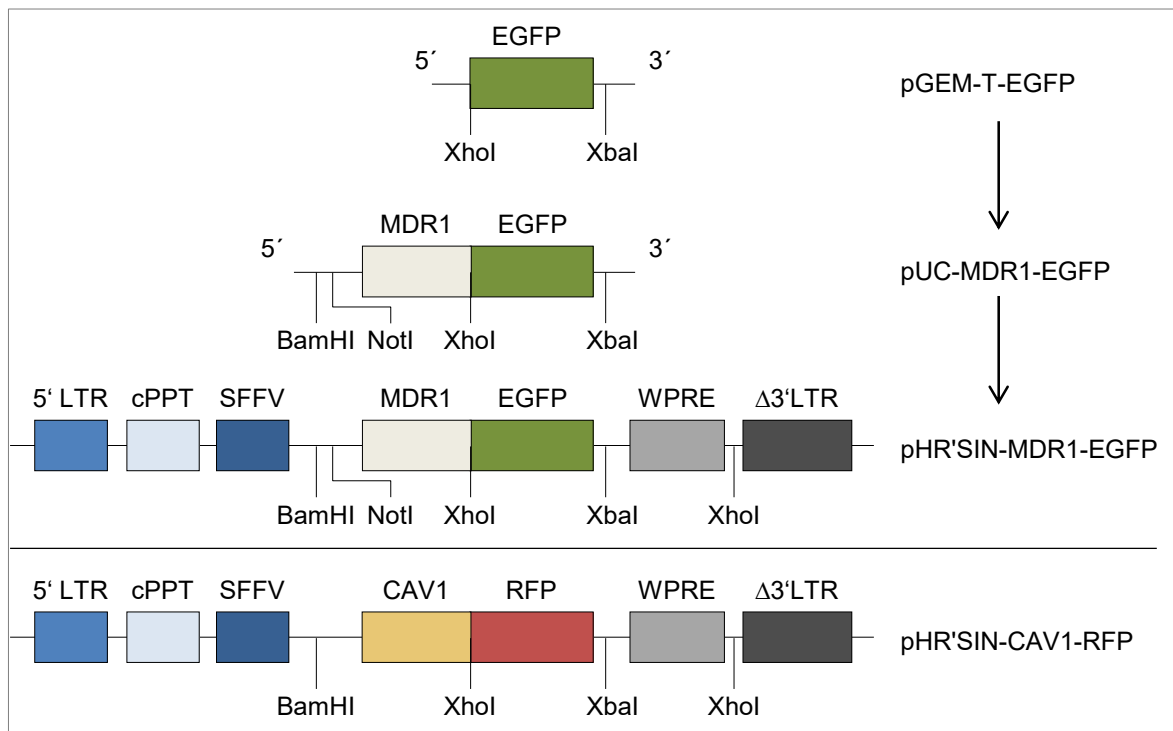
Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt, und der Mittelwert sowie der Standardfehler wurden berechnet. Statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student t-Test berechnet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung der Zellmodelle

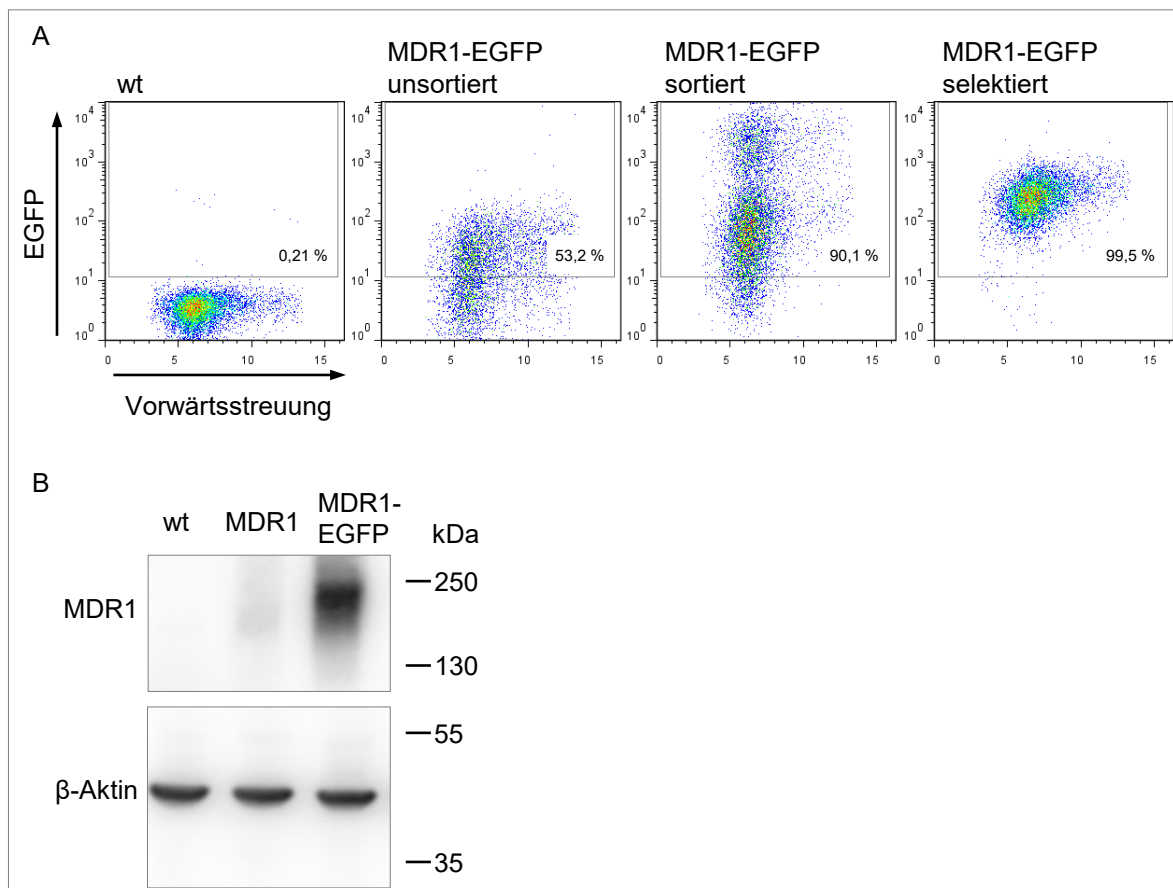
#### 4.1.1 TK6-MDR1-EGFP, TK6-CAV1-RFP und TK6-MDR1-EGFP-CAV1-RFP

Zur Durchführung von Studien zur Kolo­kalisierung von CAV1 und MDR1 sollte ein TK6 Zellmodell etabliert werden, in dem gleichzeitig CAV1 und MDR1 als Fusionsproteine mit RFP bzw. EGFP exprimiert werden. Zunächst sollten TK6wt lentiviral mit MDR1-EGFP transduziert und mittels FACS auf EGFP-Expression sortiert und durch Zugabe von 20 nM Vincristin auf Expression von MDR1 selektiert werden, um anschließend das CAV1-RFP-Konstrukt einzubringen und auf zusätzlich RFP-Expression zu sortieren. Die Umsetzung der Klonierungsstrategie (Abb. 7) und Etablierung der Zelllinie TK6-MDR1-EGFP nach Transduktion war erfolgreich (Abb. 8).



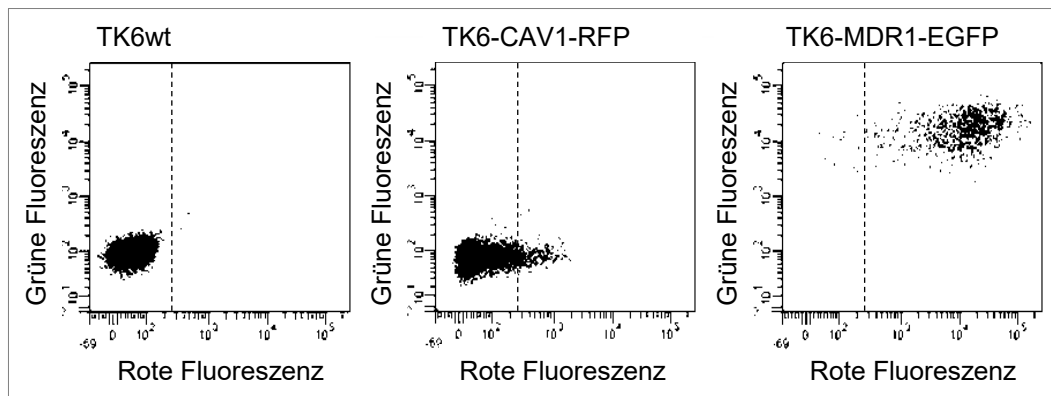
**Abb. 7: Strategie zur Klonierung von pHR'SIN-MDR1-EGFP und Darstellung von pHR'SIN-CAV1-RFP.** Mittels PCR wurde EGFP amplifiziert und in pGEM-T kloniert. Anschließend erfolgte die Klonierung von EGFP in das Leseraster der 5'-liegenden cDNA von MDR1. Die Expressionskassette wurde zur Herstellung von pHR'SIN-MDR1-EGFP mit dem lentiviralen Vektorrückgrat verbunden. Analog dazu war der Aufbau des Plasmids pHR'SIN-CAV1-RFP. Größe der die verschiedenen Elemente der viralen DNA repräsentierenden Felder korreliert nicht mit Länge der DNA-Sequenz.

Nach Transduktion von TK6-MDR1-EGFP mit den lentiviralen Partikeln HR'SIN-CAV1-RFP sollte mittels FACS eine Zellpopulation sortiert werden, die gleichzeitig positiv für EGFP (MDR1) und RFP (CAV1) ist. Dabei fiel auf, dass die Zellpopulation TK6-MDR1-EGFP bei FACS-Analyse auch starke Signale im roten Fluoreszenzkanal aufwies (Abb. 9), sodass eine klare Abgrenzung der TK6-MDR1-EGFP von den zu produzierenden TK6-MDR1-EGFP-CAV1-RFP nicht möglich sein würde. Aus Zeitgründen wurde daher für die Kollokalisationsstudien die in Abschnitt 4.1.2 etablierte Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 verwendet. Vorteile dieser Zelllinie sind, dass Effekte der Fluoreszenz-Tags umgangen werden und mögliche sterische Behinderungen nicht eintreten. Zusätzlich wurden alle funktionellen Studien mit der gleichen Zelllinie durchgeführt, statt für Lokalisationsstudien und Überlebensassays unterschiedliche Zelllinien zu verwenden. Vorteilhaft war außerdem, dass die TK6-CAV1-MDR1 Zellen ähnliche CAV1- und MDR1-Level aufwies wie die Zelllinien mit der jeweiligen Einzelexpression, was für die Vergleichbarkeit des Zellüberlebens nach Bestrahlung bedeutsam war.



**Abb. 8: Etablierung der Zelllinie TK6-MDR1-EGFP.** A) Vergleich der im FACS detektierten grünen Fluoreszenz in TK6wt und TK6-MDR1-EGFP vor und nach Sortierung mittels FACS sowie zusätzlich nach Selektion mit 20 nM Vincristin. B) Expression von MDR1 in TK6wt und sortierten TK6-MDR1-EGFP nach Selektion mit 20 nM Vincristine.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Sortierung auf EGFP und

anschließende Selektion auf funktionales MDR1 führte zu einer starken Expression von EGFP in > 99 % der Zellen in der FACS-Analyse, was durch den Western Blot bestätigt wurde. Der sichtbar niedrigere MDR1-Gehalt wurde durch Selektion mit Vincristin verbessert.

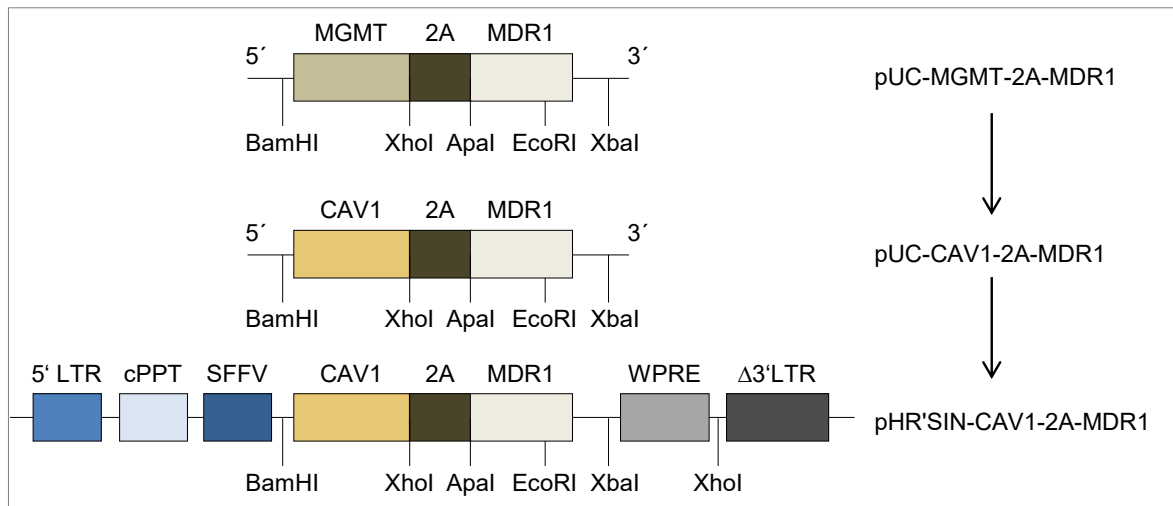


**Abb. 9: Vergleich der roten und grünen Fluoreszenz in TK6wt, TK6-CAV1-RFP und TK6-MDR1-EGFP.** TK6wt Zellen wiesen erwartungsgemäß keine Fluoreszenz auf, während TK6-CAV1-RFP (TK6wt transduziert mit CAV1-RFP, unsortiert) eine geringe rote Fluoreszenz aufwies. In TK6-MDR1-EGFP wurde nicht nur die erwartete grüne Fluoreszenz detektiert, sondern auch ein wesentlicher Anteil roter Fluoreszenz. Für die spätere Etablierung von TK6-MDR1-EGFP-CAV1-RFP wäre keine Unterscheidung zwischen rot und grün möglich gewesen.

#### 4.1.2 TK6-CAV1-MDR1

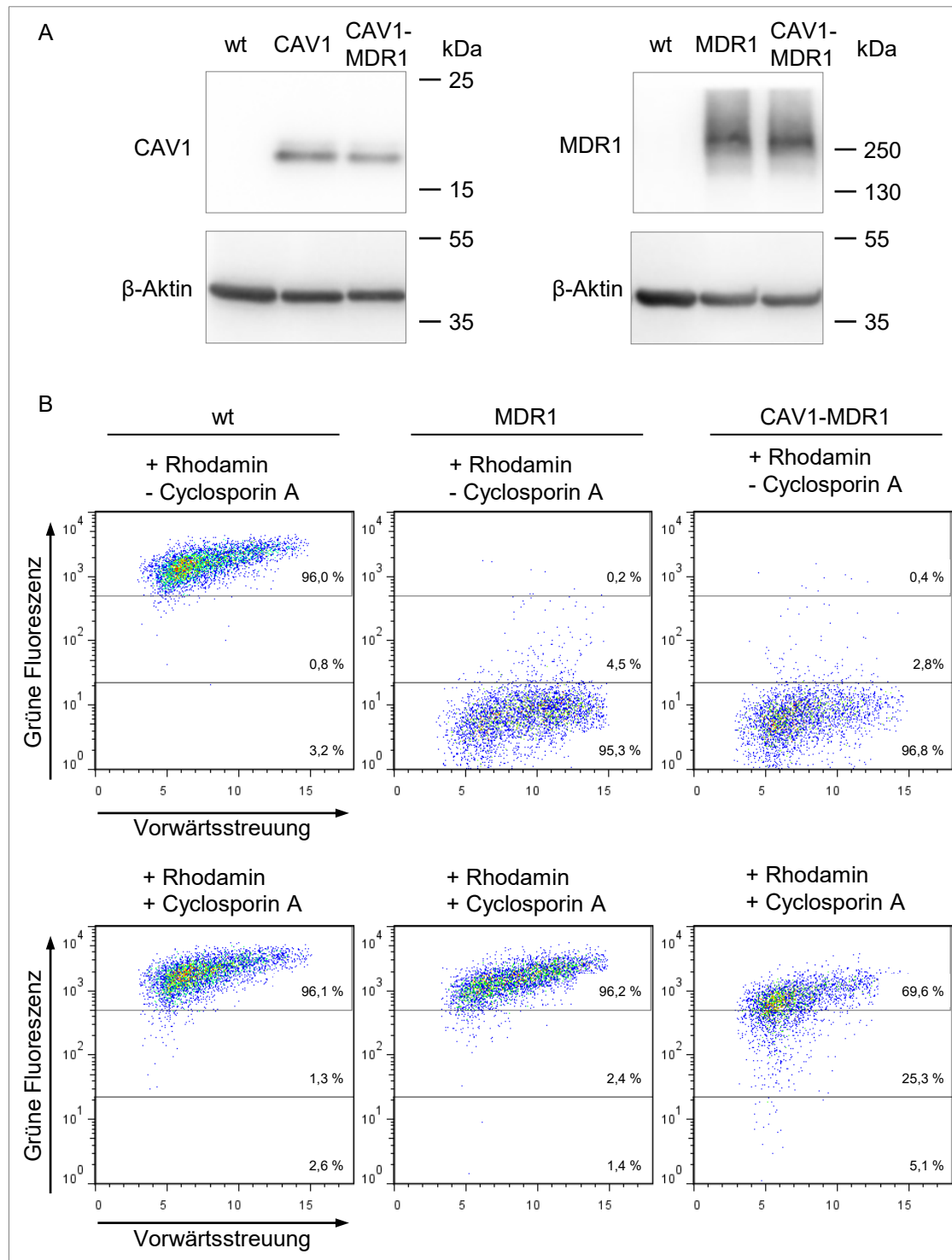
Für die gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 in TK6 Zellen war es anfangs das Ziel, in einer Expressionskassette die jeweilige cDNA von CAV1 und MDR1 über die 2A-Sequenz von FMDV (2A) miteinander zu verbinden. Die Transkription und Translation erfolgt damit als Fusionsgen und erst posttranslational kommt es zur Spaltung innerhalb der 2A-Sequenz, wodurch eine äquimolare Transgenexpression erreicht wird. Die bereits im lentiviralen Vektor vorliegende Expressionskassette MGMT-2A-MDR<sup>181</sup> wurde in einen pUC-Vektor transferiert. Anschließend konnte die cDNA von MGMT durch die cDNA von CAV1 ersetzt und die CAV1-2A-MDR1-Kassette wieder in den Ausgangsvektor kloniert werden (Abb. 10). Der Zwischentransfer in pUC war notwendig, da bei der Substitution von MGMT durch CAV1 die BamHI- und XhoI-Schnittstellen genutzt wurden. Da allerdings das lentivirale Vektorrückgrat ebenfalls eine XhoI-Schnittstelle enthielt, war ein direkter Austausch nicht möglich.





**Abb. 10: Strategie zur Klonierung von pHR'SIN-CAV1-2A-MDR1.** Die cDNA von CAV1 ersetzte MGMT in der bereits bestehenden Expressionskassette MGMT-2A-MDR1, die zunächst in pUC transferiert wurde. Anschließend wurde CAV1-2A-MDR1 in den lentiviralen Vektor pHR'SIN für die Etablierung von pHR'SIN-CAV1-2A-MDR1 eingefügt. Größe der die verschiedenen Elemente der viralen DNA repräsentierenden Felder korreliert nicht mit Länge der DNA-Sequenz.

Nach Selektion mit Vincristin (durch Expression von MDR1 verbessertes Überleben der transduzierten Zellen) konnte im Western Blot keine Expression von CAV1 und von MDR1 nachgewiesen werden. Deshalb wurde mit diesem Vektor nicht weitergearbeitet. Um dennoch die Überexpression beider Proteine in einer Zelllinie zu etablieren, wurden die bereits etablierten TK6-CAV1 mit den lentiviralen Partikeln HR'SIN-MDR1 transduziert. Hier konnte nach Selektion von TK6-CAV1-MDR1 mit Vincristin eine deutliche Überexpression von CAV1 und MDR1 gezeigt werden, wobei TK6wt als Negativkontrolle diente (Abb. 11A). Da das Zellüberleben nach Bestrahlung zwischen den Zelllinien TK6-CAV1-MDR1, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 verglichen werden sollte, war an dieser Stelle wichtig, dass der Grad der Überexpression von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1-MDR1 ähnlich dem in der jeweiligen Zelllinie mit nur einem Transgen war. Die CAV1-Expression war in den Zelllinien TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1 erwartungsgemäß ähnlich, da TK6-CAV1 als Vorstufe von TK6-CAV1-MDR1 dienten. Da die Expression von MDR1 in der vor mehreren Jahren etablierten Zelllinie TK6-MDR1 deutlich niedriger war als in der frisch transduzierten Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 (Abb. 8B), wurden TK6-MDR1 analog zu TK6-CAV1-MDR1 mit Vincristin selektiert, um eine vergleichbare Expression von MDR1 zu erhalten (Abb. 11A, rechts). Im Rhodamin123-Assay wurde die Funktionalität von MDR1 mittels FACS Analyse nachgewiesen (Abb. 11B).



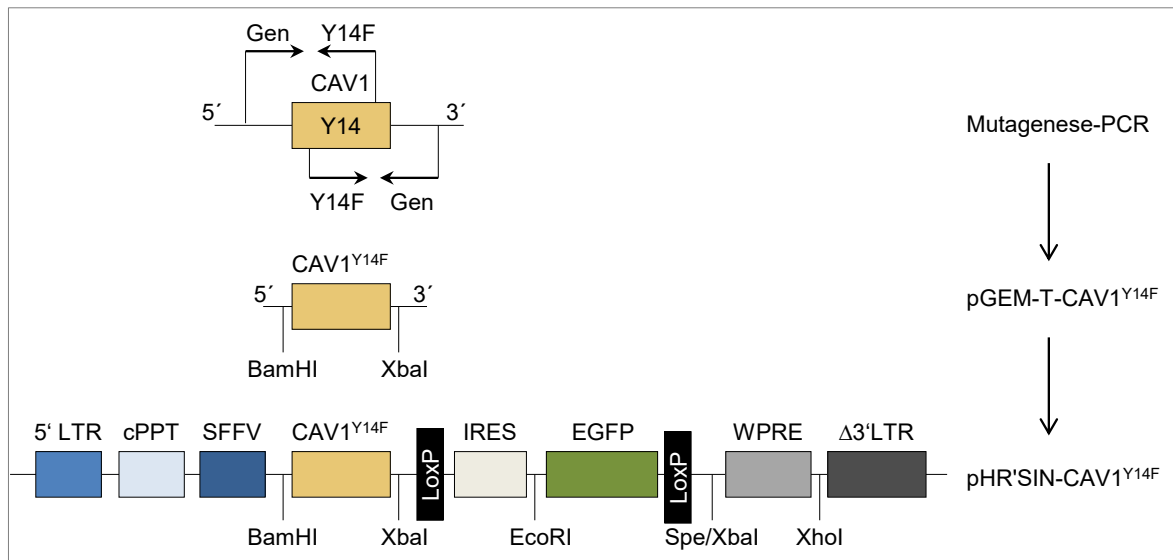
**Abb. 11: Etablierung der Zelllinie TK6-CAV1-MDR1.** TK6-CAV1 wurden mit lentiviralen Partikeln HR'SIN-MDR1 transduziert und nach Expansion mittels Vincristin selektiert. A) Vergleich der Überexpression von CAV1 und MDR1 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 mittels Western Blot. Die Expression von CAV1 bzw. MDR1 ist in den Zelllinien mit jeweiliger Einzeldexpression ähnlich wie in der Zelllinie mit gleichzeitiger Expression von CAV1 und MDR1. B) Bestätigung der Funktionalität von MDR1 mittels FACS-Analyse nach Rhodamin123-Assay. Der grün fluoreszierende Farbstoff Rho-

damin123 dringt in die Zellen ein und wird aktiv von MDR1 heraustransportiert (obere Reihe). Die spezifische Inhibition von MDR1 und seiner Transportfunktion erfolgte mit Cyclosporin A, wodurch der Farbstoff in den Zellen verblieb (untere Reihe).

Der Farbstoff diffundiert in die Zellen und kann durch MDR1 aktiv herausgepumpt werden. In TK6wt, die kein MDR1 exprimieren, verblieb der Farbstoff in ca. 97 % der Zellen, während ca. 95 % der TK6-MDR1 und ca. 97 % der TK6-CAV1-MDR1 negativ für Rhodamin123 waren. Die spezifische Inhibition der Transportfunktion von MDR1 mittels Cyclosporin A führte zur Retention des Farbstoffs in MDR1 positiven Zellen. Der niedrigere Anteil von Zellen mit sehr hohem Rhodamin123-Gehalt in TK6-MDR1 im Vergleich zu TK6-CAV1-MDR1 (ca. 70 % vs. ca. 96 %) ist möglicherweise auf eine experimentelle Variation der Vincristin-Konzentration und/oder eine leicht niedrigere MDR1-Expression zurückzuführen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht kritisch, da in beiden Zelllinien die Transportfunktion von MDR1 vergleichbar war. Die Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 wurde in Abschnitt 4.2 für die Untersuchungen zur Radioprotektion bei gleichzeitiger Überexpression von CAV1 und MDR1 verwendet.

#### 4.1.3 TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>

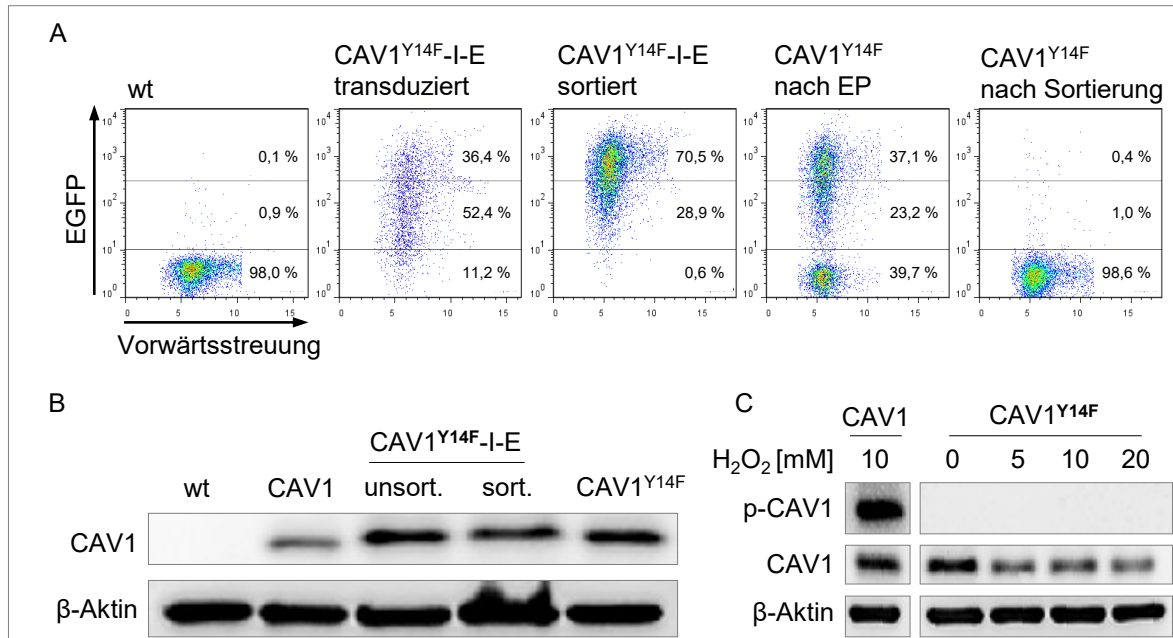
Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Phosphorylierung von Tyrosin (Y) an Position 14 von CAV1 (Tyr14) wurde eine CAV1 Tyr14-defiziente Zelllinie etabliert (Abb. 12). Zuerst wurde das entsprechende Codon der cDNA von CAV1 mittels PCR mutiert (TTC statt TAC), so dass bei der Proteinsynthese an Stelle von Tyr die nicht phosphorylierbare Aminosäure Phenylalanin (F) eingebaut wird. Beide Aminosäuren unterscheiden sich nur in der bei Phenylalanin fehlenden OH-Gruppe, so dass potentielle strukturelle Änderungen des CAV1 Proteins minimal sind. Die so hergestellte cDNA wurde in einen modifizierten lentiviralen Vektor pHR'SIN-cPPT-SEW kloniert <sup>183</sup>.



**Abb. 12: Strategie zur Klonierung von pHR'SIN-CAV1<sup>Y14F</sup>.** Nach Mutagenese-PCR zur Modifikation von Tyr (Y) zu Phe (F) an Position 14 wurde die cDNA CAV1<sup>Y14F</sup> in pGEM-T zwischenkloniert und anschließend in das lentivirale Vektorrückgrat zur Etablierung von pHR'SIN-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP eingefügt. Nach Etablierung der entsprechenden TK6 Zelllinie dienten die LoxP-Stellen der Exzision des IRES-EGFP-Abschnitts mittels Cre-Rekombinase zur Etablierung von TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>. Größe der verschiedenen Elemente der viralen DNA repräsentierenden Felder korreliert nicht mit Länge der DNA-Sequenz.

TK6wt-Zellen wurden mit den lentiviralen Partikeln HR'SIN-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP transduziert und auf Expression von EGFP mittels FACS sortiert, um eine reine Population mit Überexpression der Transgenkassette zu etablieren. Anschließend wurde mit dem Plasmid pConst, das die cDNA der Cre-Rekombinase enthält, durch Elektroporation transfiziert. Durch die Cre-Rekombinase konnte über die LoxP-Stellen der IRES-EGFP-Abschnitt entfernt werden. Fünf Tage nach Transfektion erfolgte die Sortierung mittels FACS auf Zellen ohne Expression von EGFP, um die Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> analog zu den TK6-CAV1 Zellen zu etablieren<sup>180</sup> (Abb. 13A). Dabei war entscheidend, dass die TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP Zellpopulation eine besonders hohe Reinheit aufwies, da durch die anschließende Sortierung EGFP-negativer Zellen auch initial untransduzierte Zellen mitsortiert wurden. Die FACS-Analyse ergab, dass nur 0,6 % der TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP Population EGFP-negativ waren, was als akzeptabel für die Fortsetzung der Etablierung von TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> angenommen wurde. Mittels Western Blot wurde die Expression von CAV1 in allen Etablierungsstadien bestätigt. TK6-CAV1 wiesen dabei eine etwas niedrigere CAV1-Expression auf als TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> (Abb. 13B). Für die Western Blots wurde ein Antikörper eingesetzt, der CAV1 im C-terminalen Bereich bindet, also außerhalb des N-terminalen Bereichs,

in dem sich die Aminosäure 14 befindet. Zusätzlich wurde durch die Behandlung mit  $H_2O_2$  bestätigt, dass durch den Zelletablierungsprozess eine Tyr14 defiziente Zelllinie hergestellt wurde, die kein an Position 14 phosphorylierbares CAV1 exprimiert (Abb. 13C).



**Abb. 13: Kontrolle der erfolgreichen Mutation von CAV1 an Tyr14.** A) FACS-Analyse zur Kontrolle der EGFP-Expression während der Etablierungsstadien von Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP (CAV1<sup>Y14F</sup>-I-E) hin zu TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>. Die Sortierung nach Transduktion ergab eine zu > 99 % EGFP-positive Population. Durch Elektroporation, mit der EGFP entfernt wurde, sank der EGFP-Gehalt, der nach abschließender Sortierung bei > 98 % lag. B) Kontrolle der Expression von CAV1 in unterschiedlichen Etablierungsstadien im Western Blot mit einem C-terminal bindenden CAV1 Antikörper.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. C) Bestätigung der Abwesenheit von Tyr14 in TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> nach Behandlung mit den angegebenen  $H_2O_2$  Konzentrationen für 20 min im Vergleich zu TK6-CAV1.

## 4.2 Funktionelle Studien zur gleichzeitigen Überexpression von CAV1 und MDR1

Da für CAV1 bereits eine Verbesserung des Zellüberlebens nach ionisierender Bestrahlung in TK6 Zellen gezeigt und eine Rolle von MDR1 bei der Radioprotektion ebenfalls etabliert worden war, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 die Radioprotektion verstärkt. Hierzu wurde die Proliferation von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 mit dem Vitalfarbstoff alamarBlue über 10 Tage nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy verfolgt. Für einen kürzeren Zeitraum nach Bestrahlung und ein breiteres Dosispektrum wurde mittels MTT das Zellüberleben analysiert. Im Koloniebildungstest

wurde das klonogene Überleben der TK6-CAV1-MDR Zellen im Vergleich zu TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 14 Tage nach Bestrahlung gemessen. Zusätzlich wurde anhand der Fragmentierung von bestrahlten Zellkernen nach Bestrahlung der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt.

#### 4.2.1 Langzeit-Proliferationsassay mittels alamarBlue

Um das Proliferationsverhalten und die Repopulierung nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden TK6 Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Bestrahlung täglich mit dem Vitalfarbstoff alamarBlue für 24 h inkubiert und die proliferative Kapazität der Zellen in diesem Zeitraum gemessen. Verglichen wurden die Zelllinien TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 (Abb. 14). Als Kontrolle dienten unbestrahlte TK6 Zellen, die innerhalb von 5 Tagen nach Versuchsbeginn eine so hohe Zelldichte erreicht hatten, dass keine weitere Zunahme der Zellzahl stattfand und somit kein weiteres alamarBlue verstoffwechselt wurde. Aufgrund der Vielzahl möglicher statistischer Tests wird im Folgenden insbesondere auf den Vergleich zwischen den Zelllinien über den gesamten Versuchszeitraum bzw. frühe/späte Phase (Tag 2 – 6/Tag 7 – 10) eingegangen, da der Vergleich der Einzelzeitpunkte durch die niedrige Versuchsanzahl und die hohe Schwankung der Daten nur begrenzt aussagekräftig war. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und alle weiteren Angaben wurden relativ dazu getroffen. Eine tabellarische Datenübersicht befindet sich auf Seite 67 (Tabelle 5). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung keine Signifikanzen angegeben.

Ohne Bestrahlung wurde über den gesamten Versuchszeitraum (10 Tage) die stärkste Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) in TK6-CAV1-MDR1 beobachtet (CAV1-MDR1 vs. WT: 16,7 vs. 15,0,  $p = 0,03$  // CAV1-MDR1 vs. CAV1: 16,7 vs. 13,8,  $p = 0,0001$  // CAV1-MDR1 vs. MDR1: 16,7 vs. 14,3,  $p = 0,0002$ ), v. a. bedingt durch die Tage 7-10. Nach TK6-CAV1-MDR1 war die RFI in TK6wt und TK6-MDR1 statistisch vergleichbar (15,0 vs. 14,3,  $p = 0,41$ ). Die niedrigste RFI über den Versuchszeitraum erreichten TK6-CAV1 (WT vs. CAV1: 15,0 vs. 13,8,  $p = 0,003$  // MDR1 vs. CAV1: 14,3 vs. 13,8,  $p = 0,36$ ). Die Bestrahlung induzierte bei allen Zelllinien eine von der Dosis abhängige Minderung der Proliferation, sodass die höchste Zelldichte erst nach 8 Tagen (2 Gy) bzw. 10 Tagen (4 Gy) erreicht wurde (0 Gy: Tag 6).

Nach Bestrahlung mit 2 Gy wiesen TK6-MDR1 im Vergleich zu den anderen Zelllinien die höchste RFI auf, gefolgt von TK6wt, wobei kein statistischer Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien gefunden wurde (MDR1 vs. WT: 13,3 vs. 12,6,

p = 0,32). Auch zwischen TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1 gab es keinen statistischen Unterschied der RFI (11,2 vs. 11,5, p = 0,56), beide Zelllinien lagen jedoch deutlich niedriger als TK6wt und TK6-MDR1 (WT vs. CAV1: 12,6 vs. 11,2, p = 0,0006 // WT vs. CAV1-MDR1: 12,6 vs. 11,5, p = 0,08 // MDR1 vs. CAV1: 13,3 vs. 11,2, p = 0,0004 // MDR1 vs. CAV1-MDR1: 13,3 vs. 11,5, p = 0,009).

Auch nach Bestrahlung mit 4 Gy wiesen TK6-MDR1 im Vergleich zu den anderen Zelllinien die höchste RFI auf, gefolgt von TK6wt und TK6-CAV1 (vergleichbare RFI) und TK6-CAV1-MDR1 (MDR1 vs. WT: 8,8 vs. 7,0, p = 0,02 // MDR1 vs. CAV1: 8,8 vs. 6,3, p = 0,0001 // MDR1 vs. CAV1-MDR1: 8,8 vs. 3,3, p < 0,0001 // WT vs. CAV1: 7,0 vs. 6,3, p = 0,11 // CAV1-MDR1 vs. WT: 3,3 vs. 7,0, p < 0,0001 // CAV1-MDR1 vs. CAV1: 3,3 vs. 6,3, p = 0,0003).

Zusammengefasst war die anhand der RFI bestimmte Proliferation/Repopulierung von TK6-CAV1-MDR1 ohne Bestrahlung am stärksten und nach Bestrahlung am niedrigsten im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Das höchste Überleben nach Bestrahlung wiesen TK6-MDR1 auf, sowohl nach 2 Gy als auch nach 4 Gy. Die Proliferation/Repopulierung von TK6-CAV1 war vergleichbar oder schlechter im Vergleich zu TK6wt und TK6-MDR1.

Tage nach IR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0 Gy; Mittelwert (Standardfehler)										
WT	1,00 (0,00)	2,42 (0,32)	5,89 (0,99)	12,92 (1,96)	18,21 (3,16)	20,01 (4,24)	19,16 (3,53)	17,95 (3,38)	19,34 (4,45)	18,91 (4,68)
CAV1	1,00 (0,00)	2,54 (0,29)	6,10 (1,05)	12,87 (1,78)	16,98 (2,81)	18,33 (3,99)	17,16 (3,20)	16,91 (3,13)	16,18 (4,36)	17,26 (3,87)
MDR1	1,00 (0,00)	2,48 (0,30)	6,16 (0,84)	13,92 (1,65)	18,42 (2,46)	19,32 (2,96)	18,24 (2,16)	17,77 (2,19)	15,07 (4,20)	17,38 (2,81)
CAV1-MDR1	1,00 (0,00)	2,40 (0,26)	5,84 (0,85)	13,43 (1,93)	19,64 (1,95)	22,53 (2,24)	21,65 (1,66)	21,11 (1,55)	22,57 (2,24)	20,97 (1,91)
2 Gy; Mittelwert (Standardfehler)										
WT	1,00 (0,00)	1,45 (0,07)	1,99 (0,24)	2,93 (0,21)	5,83 (1,00)	13,92 (1,27)	20,52 (1,93)	22,67 (3,65)	21,99 (3,76)	22,29 (3,61)
CAV1	1,00 (0,00)	1,50 (0,11)	2,03 (0,23)	2,95 (0,31)	5,43 (0,83)	11,87 (1,10)	18,12 (1,80)	20,31 (3,38)	19,52 (3,84)	19,36 (3,44)
MDR1	1,00 (0,00)	1,58 (0,11)	2,29 (0,21)	3,65 (0,40)	7,52 (0,89)	15,59 (0,85)	22,60 (2,19)	22,52 (2,62)	22,20 (2,78)	22,03 (2,53)
CAV1-MDR1	1,00 (0,00)	1,55 (0,16)	1,95 (0,24)	2,81 (0,36)	4,73 (0,95)	8,92 (2,00)	16,77 (3,30)	21,86 (2,88)	22,64 (3,47)	22,48 (2,78)
4 Gy; Mittelwert (Standardfehler)										
WT	1,00 (0,00)	1,14 (0,05)	1,07 (0,07)	1,13 (0,04)	1,39 (0,09)	2,71 (0,44)	7,18 (2,28)	12,79 (1,16)	17,70 (3,60)	17,70 (2,21)
CAV1	1,00 (0,00)	1,13 (0,05)	1,10 (0,09)	1,03 (0,03)	1,40 (0,15)	2,55 (0,54)	5,78 (1,66)	12,00 (0,86)	15,32 (1,89)	16,66 (1,73)
MDR1	1,00 (0,00)	1,17 (0,08)	1,14 (0,08)	1,27 (0,12)	1,84 (0,11)	4,61 (0,91)	10,71 (2,31)	17,10 (2,32)	20,76 (2,23)	20,39 (2,62)
CAV1-MDR1	1,00 (0,00)	1,32 (0,06)	1,25 (0,09)	1,12 (0,05)	1,16 (0,09)	1,80 (0,32)	3,28 (1,00)	5,20 (1,98)	6,05 (2,99)	8,14 (3,43)

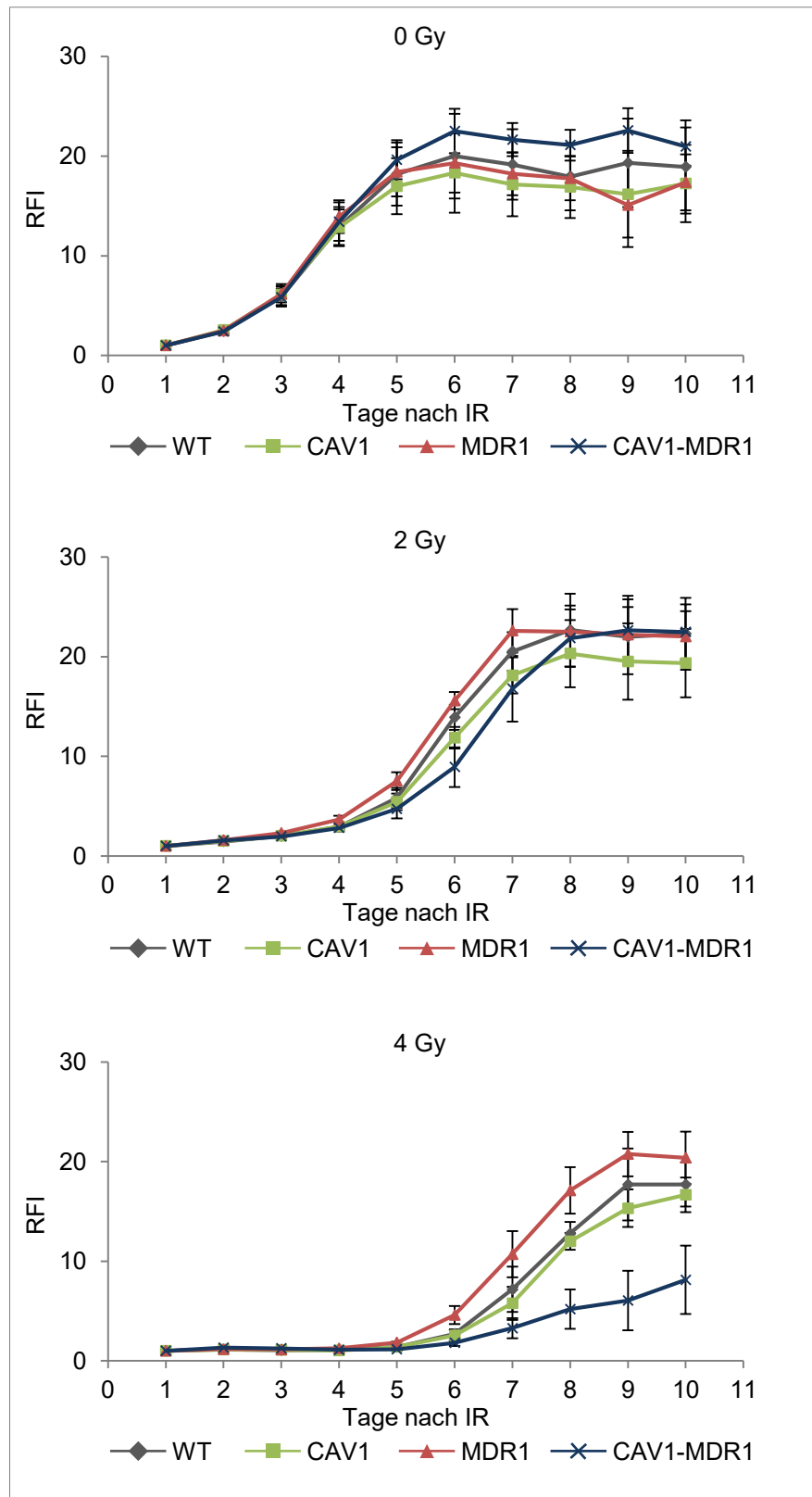
Mittelwert 0 Gy: WT: 15,0 // CAV1: 13,8 // MDR1: 14,3 // CAV1-MDR1: 16,7

Mittelwert 2 Gy: WT: 12,6 // CAV1: 11,2 // MDR1: 13,3 // CAV1-MDR1: 11,5

Mittelwert 4 Gy: WT: 7,0 // CAV1: 6,3 // MDR1: 8,8 // CAV1-MDR1: 3,3

**Tabelle 5: Zellproliferation und Repopulierung von TK6wt, TK6-MDR1 und TK6-CAV1 nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy über einen Zeitraum von 10 Tagen.**





**Abb. 14: Zellproliferation und Repopulierung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy über einen Zeitraum von 10 Tagen.** TK6 Zellen wurden direkt nach Aussaat bestrahlt. Die Inkubation mit alamarBlue für 24 h wurde für jeden Messtag durchgeführt und die Fluoreszenz 24 h nach Zugabe und direkt nach Zugabe ermittelt. Messtag 1 diente der Normalisierung. Die Kurven zeigen Mittelwert und Standardfehler von 4 unabhängigen Experimenten.

Die anhand der RFI abgelesene Proliferation/Repopulierung von TK6-CAV1-MDR1 war ohne Bestrahlung am stärksten und nach Bestrahlung am niedrigsten im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Das beste Überleben nach Bestrahlung mit 2 Gy oder 4 Gy wiesen TK6-MDR1 auf. Die Proliferation/Repopulierung von TK6-CAV1 war vergleichbar oder schlechter im Vergleich zu TK6wt und TK6-MDR1.

#### 4.2.2 Kurzzeit- Proliferationsassay mittels MTT

Weil nach Verwendung von alamarBlue starke Messschwankungen auftraten, wurde überprüft, ob unter Verwendung eines alternativen Farbstoffs präzisere Daten erhoben werden konnten. Außerdem wurden unter alamarBlue-Einsatz vor allem Unterschiede zu späteren Zeitpunkten (Tag 6-10) deutlich. Daher sollten frühe Zeitpunkte nach Bestrahlung mit einem alternativen Farbstoff untersucht werden. Dafür wurde MTT verwendet, das von lebenden Zellen verstoffwechselt wird, wobei ein messbarer Farbumschlag eintritt. Für die Analysen wurde der Zeitraum zwischen 24 h und 72 h nach Bestrahlung gewählt und die Höchstdosis erhöht. Verglichen wurde das Zellüberleben von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 (Abb. 15).

Da sich die initial gemessene Absorption zwischen den unbestrahlten Zelllinien unterschied, wurden die erhobenen Daten jeder Zelllinie auf den Mittelwert von 0 Gy der jeweiligen Zelllinie bezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Die Darstellung der relativen Absorption erfolgte logarithmisch. Aufgrund der Vielzahl möglicher statistischer Tests wird im Folgenden insbesondere auf den Vergleich zwischen den Zelllinien über das gesamte Dosispektrum eingegangen, da der Vergleich der Einzeldosen durch die niedrige Versuchszahl und relativ hohen Schwankung der Daten nur begrenzt aussagekräftig war. Die relative Absorption unbestrahlter Zellen wurde mit 100 % angesetzt und alle weiteren Angaben wurden relativ dazu getroffen. Eine tabellarische Datenübersicht befindet sich auf Seite 71 (Tabelle 6). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Graphik keine Signifikanzen angegeben.

Zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung wiesen TK6wt, TK6-MDR1, und TK6-CAV1-MDR1 über alle Dosen (1-6 Gy) eine vergleichbare Absorption auf, wobei TK6-MDR1 im Mittel die höchste Absorption aufwies, gefolgt von TK6wt und TK6-CAV1-MDR1 (WT vs. MDR1: 59 % vs. 61 %,  $p = 0,60$  // WT vs. CAV1-MDR1: 59 % vs. 57 %,  $p = 0,67$  // MDR1 vs. CAV1-MDR1: 61 % vs. 57 %,  $p = 0,21$ ). Die niedrigste Absorption wiesen TK6-CAV1 auf (CAV1 vs. WT: 45 % vs. 59 %,  $p = 0,002$  // CAV1 vs. MDR1: 45 % vs. 61 %,  $p = 0,007$  // CAV1 vs. CAV1-MDR1: 45 % vs. 57 %,  $p = 0,04$ ).

Zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung wiesen TK6-MDR1, gefolgt von TK6wt und TK6-CAV1, die höchste Absorption auf, unterschieden sich jedoch nicht statistisch signifikant (WT vs. CAV1: 31 % vs. 30 %,  $p = 0,42$  // WT vs. MDR1: 31 % vs. 34 %,  $p = 0,35$  // CAV1 vs. MDR1: 30 % vs. 34 %,  $p = 0,24$ ). Die niedrigste Absorption wurde allerdings in TK6-CAV1-MDR1 beobachtet, die allein zu TK6-MDR1 signifikant unterschiedlich war (CAV1-MDR1 vs. WT: 29 % vs. 31 %,  $p = 0,32$  // CAV1-MDR1 vs. CAV1: 29 % vs. 30 %,  $p = 0,26$  // CAV1-MDR1 vs. MDR1: 29 % vs. 34 %,  $p = 0,02$ ).

Zum Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung wiesen TK6wt im Vergleich zu den anderen Zelllinien die höchste Absorption über alle Dosen auf, gefolgt von MDR1 und CAV1, zwischen denen aber kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden wurde (WT vs. CAV1: 53 % vs. 41 %,  $p < 0,0001$  // WT vs. MDR1: 53 % vs. 45 %,  $p = 0,01$  // WT vs. CAV1-MDR1: 53 % vs. 33 %,  $p = 0,0004$  // CAV1 vs. MDR1: 41 % vs. 45 %,  $p = 0,08$ ). Die signifikant niedrigste Absorption wiesen TK6-CAV1-MDR1 auf (CAV1-MDR1 vs. CAV1: 33 % vs. 41 %,  $p = 0,01$  // CAV1-MDR1 vs. MDR1: 33 % vs. 46 %,  $p = 0,002$ ).

Insgesamt wurde über den Versuchszeitraum von 72 h beobachtet, dass TK6wt und TK6-MDR1 das höchste Wachstum nach Bestrahlung mit 1 Gy – 6 Gy aufwiesen, gefolgt von TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1. Bereits innerhalb der ersten 72 h bewirkte Bestrahlung eine deutliche Abnahme des Zellwachstums von TK6-CAV1-MDR1, was sich mit der Beobachtung im alamarBlue-Assay deckt.

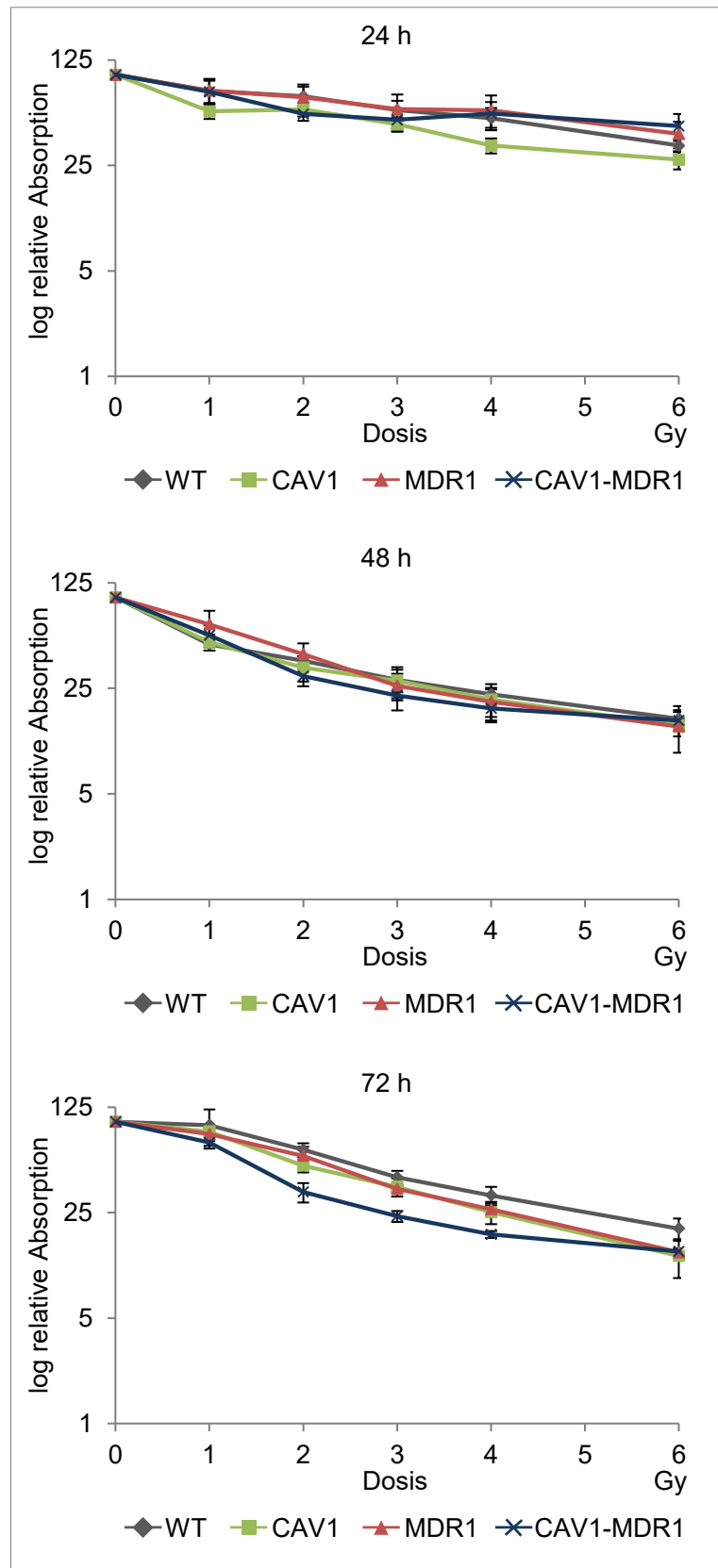
Dosis (Gy)	0	1	2	3	4	6
24 h nach Bestrahlung; Mittelwert (Standardfehler)						
WT	100,00 (0,00)	77,97 (13,20)	71,72 (14,22)	58,17 (8,87)	51,39 (8,60)	33,91 (3,27)
CAV1	100,00 (0,00)	57,01 (6,29)	58,75 (5,99)	46,87 (5,14)	33,93 (3,87)	27,31 (3,78)
MDR1	100,00 (0,00)	78,43 (14,59)	70,82 (12,41)	58,95 (14,84)	57,94 (14,86)	40,50 (8,11)
CAV1-MDR1	100,00 (0,00)	76,97 (16,62)	54,88 (5,57)	50,17 (7,81)	55,19 (10,67)	45,64 (9,21)
24 h nach Bestrahlung; Mittelwert (Standardfehler)						
WT	100,00 (0,00)	48,93 (4,46)	38,12 (2,64)	28,42 (4,82)	22,84 (2,29)	15,73 (2,17)
CAV1	100,00 (0,00)	50,59 (6,05)	34,29 (6,61)	28,04 (6,50)	21,00 (5,71)	14,20 (4,84)
MDR1	100,00 (0,00)	66,44 (15,06)	42,14 (7,43)	26,02 (5,23)	20,38 (4,22)	13,96 (1,94)
CAV1-MDR1	100,00 (0,00)	56,09 (9,39)	30,15 (4,40)	22,42 (4,57)	18,39 (3,50)	15,30 (2,15)
24 h nach Bestrahlung; Mittelwert (Standardfehler)						
WT	100,00 (0,00)	94,91 (25,72)	65,20 (6,93)	42,75 (4,49)	32,51 (4,57)	19,55 (3,25)
CAV1	100,00 (0,00)	85,91 (3,56)	51,17 (5,06)	36,98 (5,06)	25,19 (4,20)	12,92 (3,73)
MDR1	100,00 (0,00)	82,84 (8,28)	59,44 (8,72)	35,81 (1,67)	26,25 (2,53)	13,63 (0,64)
CAV1-MDR1	100,00 (0,00)	72,74 (6,22)	34,19 (5,00)	23,68 (1,98)	17,92 (0,96)	13,80 (0,67)

Mittelwert 24 h: WT: 58,6 // CAV1: 44,8 // MDR1: 61,3 // CAV1-MDR1: 56,6

Mittelwert 48 h: WT: 30,8 // CAV1: 29,6 // MDR1: 33,8 // CAV1-MDR1: 28,5

Mittelwert 72 h: WT: 53,5 // CAV1: 41,2 // MDR1: 45,3 // CAV1-MDR1: 32,5:

**Tabelle 6: Analyse des Zellüberlebens von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy**

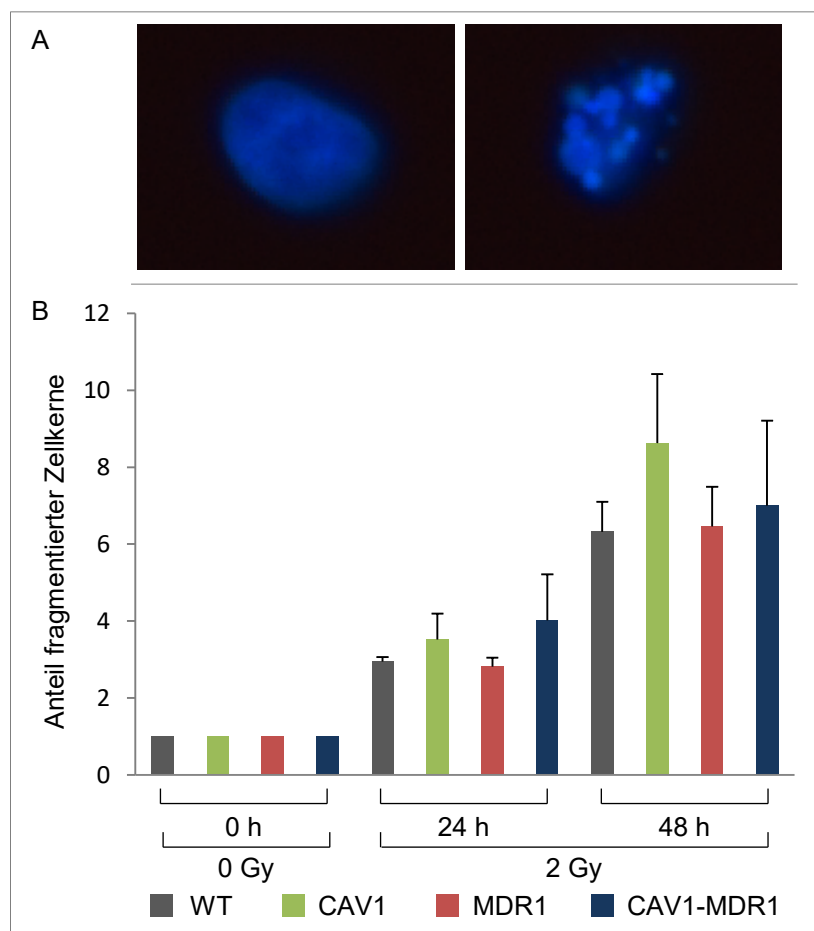


**Abb. 15: Analyse des Zellüberlebens von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy.** Direkt nach Aussaat wurden die TK6 Zellen bestrahlt. Nach Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h wurden die Zellen mit MTT für 4 h inkubiert und

anschließend lysiert. Die Absorption wurde am folgenden Morgen gemessen. Die Kurven zeigen Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten. Insgesamt wurde über den Versuchszeitraum von 72 h beobachtet, dass TK6wt und TK6-MDR1 das höchste Wachstum nach Bestrahlung mit 1-6 Gy aufwiesen, gefolgt von TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1.

#### 4.2.3 Bestrahlungsinduzierte Apoptose von TK6-Zellen

Um zu überprüfen ob Unterschiede im Apoptoseverhalten der Zellen zu Unterschieden bei der bestrahlungsinduzierten Proliferation beitragen, wurden TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung fixiert und mit Hoechst 33342 gefärbt, um die Zellkerne hinsichtlich Fragmentierung zu untersuchen (Abb. 16).



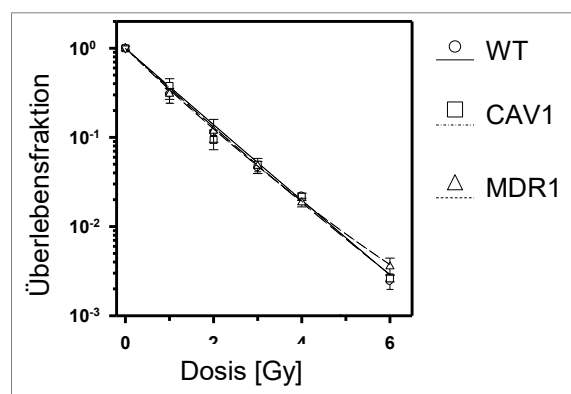
**Abb. 16: Hoechst-Färbung der Zellkerne von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 Zellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.** A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines intakten Zellkerns (links) und eines fragmentierten Zellkerns (rechts). B) Bestimmung des relativen Anteils fragmentierter Zellkerne 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy. Säulen stellen Mittelwerte dar; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Zwar stieg der Anteil fragmentierter Zellkerne nach Bestrahlung und zeitabhängig an, jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien. n=4

Im Vergleich zu unbestrahlten Zellen war der Anteil fragmentierter Zellkerne 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy etwa 3-fach erhöht (WT: 3,0,  $p = 0,0005$  // CAV1: 3,5,  $p = 0,03$  // MDR1: 2,8,  $p = 0,005$  // CAV1-MDR1: 4,0,  $p = 0,08$ ) und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy etwa 7-fach erhöht (WT: 6,3,  $p = 0,007$  // CAV1: 8,6,  $p = 0,03$  // MDR1: 6,5,  $p = 0,01$  // CAV1-MDR1: 7,0,  $p = 0,07$ ). Zwischen 24 h und 48 h nach Bestrahlung kam es somit zu einer Verdopplung des Anteils fragmentierter Zellkerne (WT: 2,1,  $p = 0,02$  // CAV1: 2,45,  $p = 0,02$  // MDR1: 2,3,  $p = 0,04$  // CAV1-MDR1: 1,74,  $p = 0,06$ ). Allerdings wurde zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Zelllinien beobachtet (alle  $p > 0,35$ ); auch beide Zeitpunkte nach Bestrahlung zusammen genommen ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien (alle  $p > 0,2$ ).

Insgesamt erhöhte sich die Apoptoserate erwartungsgemäß in Abhängigkeit von Bestrahlungsdosis und Zeit für alle Zelllinien, aber es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1.

#### 4.2.4 Koloniebildungstest

Neben apoptotischem Zelltod und verminderter Proliferationsfähigkeit induziert ionisierende Bestrahlung auch den Verlust der Teilungsfähigkeit von Zellen. Zur Beurteilung des klonogenen Überlebens wurde der Koloniebildungstest verwendet, bei dem 14 Tage nach Bestrahlung beurteilt wurde, wie viele Vertiefungen einer 96-well Platte keine Kolonie aufwiesen. Anhand des linear-quadratischen Modells wurde die Beziehung zwischen Überlebensfraktion SF und Dosis D *gefittet* (Abb. 17). Dabei konnten für die Zelllinien TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 sehr ähnliche Überlebenskurven erstellt werden.



**Abb. 17: Berechnung der Überlebensfraktion von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 1 Gy und 6 Gy.** TK6 Zellen wurden direkt nach Aussaat bestrahlt und 14 Tage später wurde die Anzahl wells ohne Zellkolonie bestimmt. Für die Zelllinien TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 kam es zu sehr ähnlichen Überlebenskurven, während auf Grund fehlender zellulärer

Kolonien in bestrahlten TK6-CAV1-MDR1 keine Aussage zur Überlebensfraktion möglich war. Die Kurven zeigen Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten.

Überraschend war, dass nach Bestrahlung bei der Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 ein verändertes Zellbild auftrat. Während für die anderen Zelllinien deutliche zelluläre Kolonien beobachtet wurden, bildeten sich bei bestrahlten TK6-CAV1-MDR1 undefinierbare Kolonien, die keine Ähnlichkeit mit den zellulären Strukturen der anderen Zelllinien aufwiesen. Daher war eine vergleichbare Beurteilung dieser Zelllinie für die Berechnung der Überlebensfraktion nicht möglich. Da fast keine Vertiefungen mit Zellkolonien gefunden worden waren, ergab sich eine deutlich verringerte Überlebensfraktion für diese Zelllinie. Der Versuch, den Koloniebildungstest in semisoliden Phase (Agarose gelöst in Wachstumsmedium) durchzuführen, brachte keine Verbesserung.

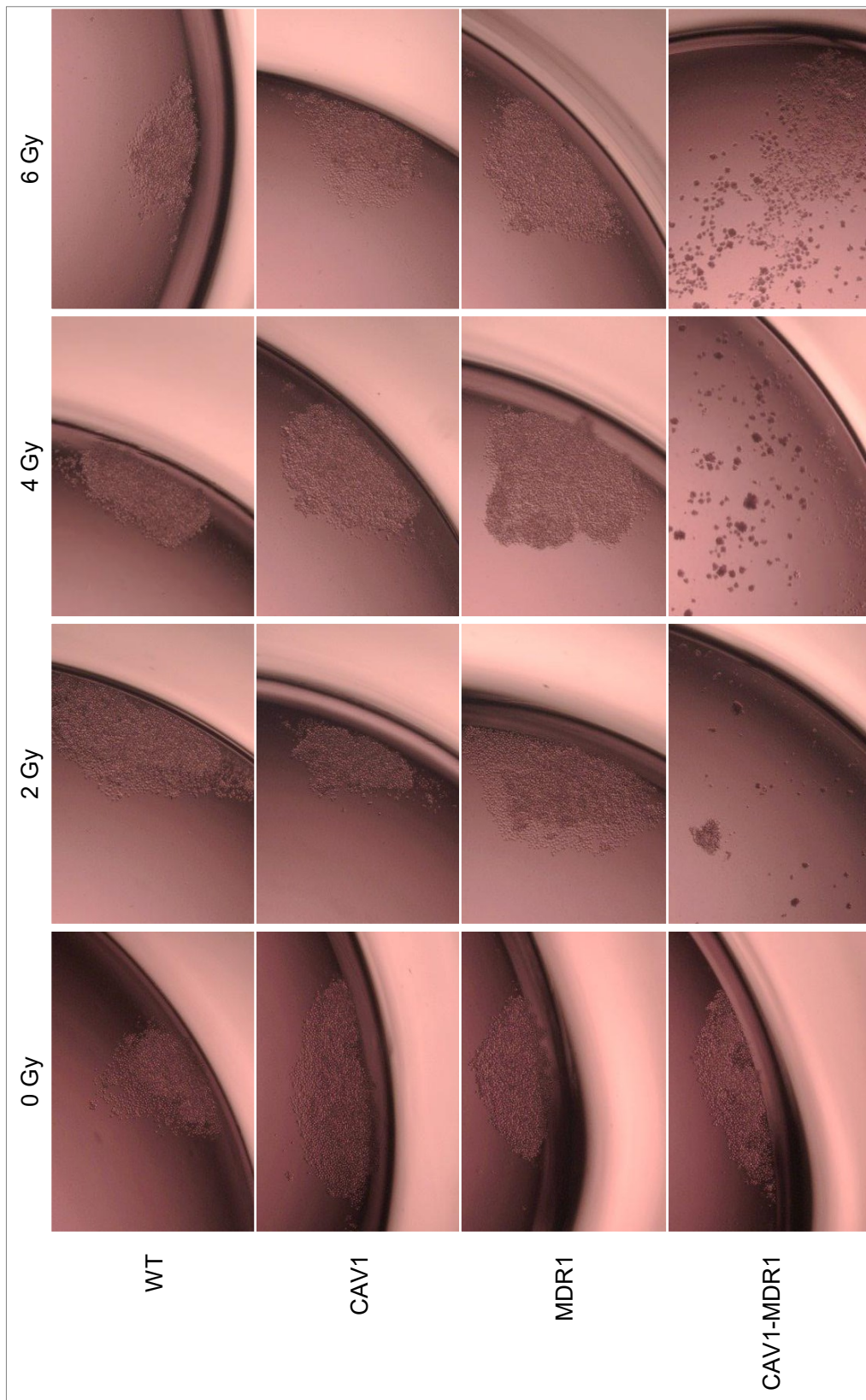
Zunächst wurde in TK6-CAV1-MDR1 eine Kontamination der Zelllinie vermutet, die durch Zugabe von Antibiotika oder einem Antimykotikum behandelt werden könnte. Da dies jedoch keine Verbesserung brachte, sollten die beobachteten unbekannt Strukturen identifiziert werden. Die Abteilung Mikrobiologie der Universitätsmedizin Mannheim wurde mit der Anzucht beauftragt, die mit den vorhandenen Nährböden jedoch nicht möglich war, sodass kein Mikroorganismus als Ursache identifiziert werden konnte.

Um zu erfahren, um was es sich bei den veränderten Kolonien in TK6-CAV1-MDR1 handelte, wurden die Zellen 7 Tage und 14 Tage nach Bestrahlung lichtmikroskopisch untersucht. An Tag 7 nach Bestrahlung (Abb. 18) wiesen alle unbestrahlten Kontrollzellen ein normales Zellwachstum auf, das als kleine Kolonie am Rand der Vertiefung beobachtet wurde. Die bestrahlten Zellen der Linien TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 zeigten vergleichbares Zellwachstum, während in der Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 Strukturen beobachtet wurden, die sich stark von den zellulären Kolonien unterschieden. Besonders auffällig war, dass zelluläre Kolonien randständig wuchsen und bis auf die sichtbare Zellmembran transparent waren, während die unbekannt Strukturen über die gesamte Fläche der Vertiefung verteilt waren und dunkelbraun erschienen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Menge unbekannter Strukturen mit Zunahme der Bestrahlungsdosis anstieg. An Tag 14 nach Bestrahlung (Abb. 19) wurden die gleichen Vertiefungen dokumentiert wie an Tag 7. Die unbestrahlten Vertiefungen aller Zelllinien zeigten dabei vollständigen Bewuchs mit Zellen, die teilweise übereinander wuchsen bzw. dreidimensionale Kolonien bildeten, die als dunkel schattierte Verdichtung erkennbar waren. Die unbekannt Strukturen in TK6-CAV1-MDR1

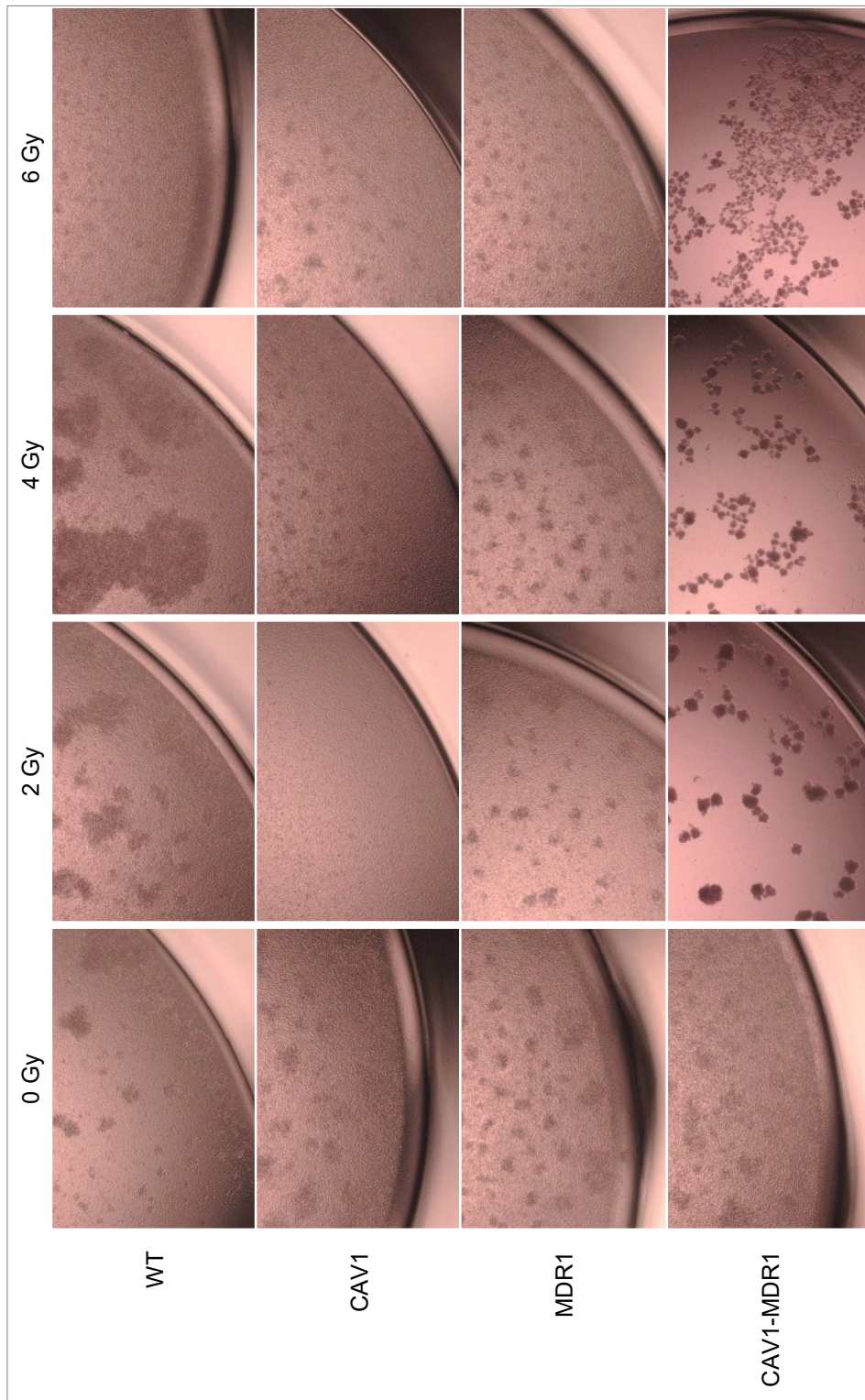


waren im Vergleich zu Tag 7 größer und mehr geworden und waren deutlich dunkler und dichter als die dichten Zellkolonien der anderen Zelllinien. In den Zwischenräumen der unbekannt Strukturen gab es keine oder nur vereinzelte Zellen, die sich deutlich von den tiefdunklen Strukturen abhoben. Dies wurde besonders nach Färbung der Zellkerne mit DAPI deutlich (Abb. 20). Für TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und unbestrahlte TK6-CAV1-MDR1 leuchtete der dichte Zellrasen stark, bis auf die dicht wachsenden dreidimensionalen Zellkolonien, in die DAPI nur schwer eindrang und die im Hellfeld deutlich von den unbekannt Strukturen unterscheidbar waren. Im Gegensatz zu nachweisbaren Zellkernen zeigten bestrahlte TK6-CAV1-MDR1 nur Hintergrund, und auch die unbekannt Strukturen zeigten keine Färbung von DNA. Eine endgültige Identifikation der unbekannt Strukturen war zwar nicht möglich, aber die Anhaltspunkte deuten auf eine lebens- und teilungsfähige Struktur hin, die sehr langsam in Kolonien wächst. Unter normalen Wachstumsbedingungen kam es vermutlich zu einer hohen Konkurrenz um Nährstoffe, zumal TK6 eine stärkere Proliferation aufweisen. Erst unter Bestrahlung erlangten die unbekannt Strukturen einen Proliferationsvorteil, da bestrahlte TK6 reduzierte Proliferation aufweisen. Dies würde auch die beobachtete dosisabhängige Zunahme der unbekannt Strukturen erklären. Eine Aussage bezüglich klonogenem Überleben der Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung war insgesamt nicht möglich.

Da die funktionellen Studien zu Proliferation und Apoptose zeitnah nach Bestrahlung ausgewertet wurden und deutlich höhere Zellzahlen eingesetzt wurden, die einen Proliferationsvorteil der unbekannt Strukturen unwahrscheinlich machen, ist davon auszugehen, dass die erhobenen Daten von MTT- und Hoechst-Assay weiterhin vertretbar sind. Für das alamarBlue Assay könnte der lange Beobachtungszeitraum von 10 Tagen eine Rolle spielen und die unbekannt Strukturen eine Erklärung für die verminderte Proliferation von TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 4 Gy darstellen. Eine Neuetablierung der Zelllinie war aus Zeitgründen nicht möglich.



**Abb. 18: Lichtmikroskopische Untersuchung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 7 Tage nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 Gy und 6 Gy.** Während für unbestrahlte Zellen und bestrahlte TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 normales Zellwachstum (flächig, zusammenhängend) beobachtet wurde, wiesen bestrahlte TK6-CAV1-MDR1 Dosis abhängiges Wachstum unbekannter Strukturen auf.



**Abb. 19: Lichtmikroskopische Untersuchung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 14 Tage nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 Gy und 6 Gy. Während für unbestrahlte**

Zellen und bestrahlte TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 ein dichter Zellrasen mit teilweise dreidimensionalen Zellkolonien beobachtet wurde, wiesen bestrahlte TK6-CAV1-MDR1 Dosis abhängiges Wachstum dunkler, verteilter unbekannter Strukturen auf, ohne dass zelluläre Strukturen auftraten.

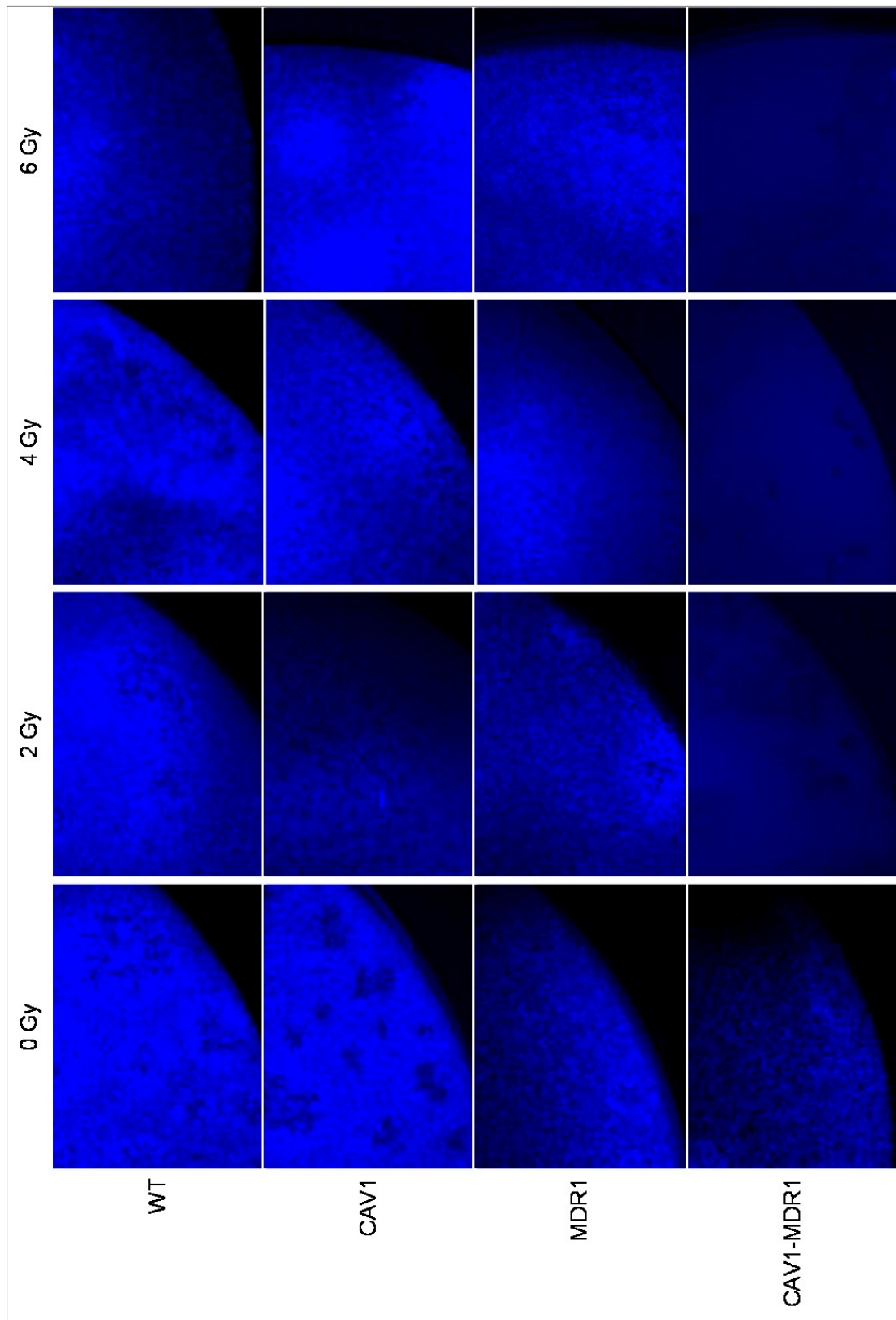


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung DAPI gefärbter Zellkerne von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 14 Tage nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 Gy und

**6 Gy.** Für unbestrahlte Zellen und bestrahlte TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-MDR1 leuchteten die Zellkerne des Zellrasens stark (inhomogene Blaufärbung), wobei große Zellkolonien dreidimensional wuchsen und so dunkler erschienen. Im Gegensatz dazu wiesen die unbekannteren Strukturen bestrahlter TK6-CAV1-MDR1 keine DNA-Färbung auf (dunkle Schatten auf homogen dunkelblauem Grund).

#### 4.2.5 Bestrahlungsinduzierte Spaltung von Caspase 8

Apoptose ist ein reguliert ablaufender Prozess, der durch die Aktivierung von Caspasen als Antwort auf zellulären Stress initiiert wird. So kann durch ionisierende Bestrahlung das mitochondriale Membranpotential zusammenbrechen und daraufhin Caspase 9 gespalten werden, was zur kaskadenartigen Aktivierung weiterer Caspasen, u. a. von Caspase 8, führt. Die initiale Spaltung von Caspase 8 ergibt das p43/41 Spaltprodukt und anschließend erfolgt die Freisetzung der p18 Untereinheit. Daneben wurde auch eine Induktion der von FAS abhängigen Apoptose durch ionisierende Strahlung beschrieben. Eine Rolle der ATPase-Funktion von MDR1 bei der Inhibition der Spaltung von Caspase 8 wurde für den von FAS abhängigen Weg gezeigt. An dieser Stelle wurde daher untersucht, ob die für MDR1 beobachtete bessere Proliferation nach Bestrahlung auf eine Minderung der Spaltung von Caspase 8 zurückgeführt werden kann. Zusätzlich wurde analysiert, ob auch CAV1 eine Rolle bei der Spaltung von Caspase 8 spielt und ob kumulative Effekte von CAV1 und MDR1 bei der gleichzeitigen Überexpression hinsichtlich Caspase 8 Spaltung beobachtet werden können.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 mit 2 Gy bestrahlt und die Spaltung von Caspase 8 im Zeitraum zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mittels Western Blot analysiert (Abb. 21). Die densitometrische Quantifizierung der Western Blots wurde in Abb. 22 für den gesamten Beobachtungszeitraum für jede Zelllinie dargestellt, während in Abb. 23 ausschließlich der Zeitraum zwischen 36 h und 72 h im direkten Zelllinienvergleich betrachtet wurde. Eine tabellarische Datenübersicht (Tabelle 7) befindet sich auf Seite 83. Berechnet wurde die relative Spaltung von Caspase 8 in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, wobei  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung diente. Aufgrund der Vielzahl möglicher statistischer Tests wird im Folgenden insbesondere auf den Vergleich zwischen den Zelllinien über den gesamten Versuchszeitraum bzw. den Zeitraum 36 h – 72 h eingegangen, da der Vergleich der Einzelzeitpunkte durch die niedrige Versuchsanzahl und die hohe Schwankung der Daten nur begrenzt aussagekräftig war. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Signifikanz nur in Abb. 23 angegeben.

Bereits zwischen 2 h und 4 h nach Bestrahlung war eine Zunahme der Spaltfragmente von Caspase 8 im Western Blot nachweisbar. Nach 8 h erfolgte in allen Zelllinien außer in TK6-CAV1 eine vorübergehende Abnahme der nachweisbaren Menge an p41/p43 und p18. Zwischen 60 h und 72 h nach Bestrahlung war die Spaltung von Caspase 8 am stärksten (p41/p43: WT: 11,4; CAV1: 13,6; MDR1: 11,4; CAV1-MDR1: 11,0; p18: WT: 7,9; CAV1: 8,1; MDR1: 2,4; CAV1-MDR1: 10,6). Auffällig war, dass TK6-CAV1 ihr Maximum erst nach 72 h erreichten, während die anderen drei Zelllinien bereits 60 h nach Bestrahlung die maximale Spaltung aufwiesen.

Im Zelllinienvergleich über den gesamten Beobachtungszeitraum nach Bestrahlung mit 2 Gy war die Zunahme des p41/p43 Spaltfragments am stärksten in TK6-CAV1, gefolgt von TK6-CAV1-MDR1, TK6wt und TK6-MDR1, wobei es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien gab (CAV1: 5,9-fach; CAV1-MDR1: 5,2; WT: 4,3-fach; MDR1: 4,0-fach). Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle war der Anstieg des p18-Spaltfragments etwas niedriger als der Anstieg von p41/p43 nach 2 Gy. Die stärkste Zunahme des p18-Spaltfragments über 84 h nach Bestrahlung wiesen TK6-CAV1-MDR1, gefolgt von TK6-CAV1, TK6wt und TK6-MDR1 (WT vs. CAV1: 3,0 vs. 3,9,  $p = 0,17$  // WT vs. MDR1: 3,0 vs. 1,4,  $p = 0,04$  // WT vs. CAV1-MDR1: 3,0 vs. 6,4,  $p = 0,005$  // CAV1 vs. MDR1: 3,9 vs. 1,4,  $p = 0,001$  // CAV1 vs. CAV1-MDR1: 3,9 vs. 6,5,  $p = 0,04$  // MDR1 vs. CAV1-MDR1: 1,4 vs. 6,42,  $p = 0,0001$ ). Somit war in TK6-MDR1 im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine geringere Spaltung von Caspase 8 nachweisbar. Bezüglich der densitometrischen Quantifizierung ist an dieser Stelle zu beachten, dass die Signale insgesamt sehr niedrig waren und somit eine größere Messunsicherheit besteht.

Im Zelllinienvergleich (Abb. 23) im Zeitraum zwischen 36 h und 72 h war die Bildung des p41/p43-Spaltfragments in TK6-CAV1 am höchsten, gefolgt von TK6-CAV1-MDR1, TK6wt und TK6-MDR1 (WT vs. CAV1: 7,0 vs. 10,6,  $p = 0,14$  // WT vs. MDR1: 7,0 vs. 6,4,  $p = 0,61$  // WT vs. CAV1-MDR1: 7,0 vs. 7,1,  $p = 0,99$  // CAV1 vs. MDR1: 10,6 vs. 6,4,  $p = 0,06$  // CAV1 vs. CAV1-MDR1: 10,6 vs. 7,1,  $p = 0,13$  // MDR1 vs. CAV1-MDR1: 6,4 vs. 7,1,  $p = 0,8$ ).

Im Zelllinienvergleich zwischen 36 h und 72 h war die Bildung des p18-Spaltfragments in TK6-MDR1 ebenfalls am niedrigsten, gefolgt von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1 (WT vs. CAV1: 4,6 vs. 6,0,  $p = 0,36$  // WT vs. MDR1: 4,6 vs. 2,1,  $p = 0,16$  // WT vs. CAV1-MDR1: 4,6 vs. 7,8,  $p = 0,19$  // CAV1 vs. MDR1: 6,0 vs. 2,1,  $p = 0,02$  //

CAV1 vs. CAV1-MDR1: 6,0 vs. 7,8,  $p = 0,39$  // MDR1 vs. CAV1-MDR1: 2,1 vs. 7,8,  $p = 0,02$ ).

Bei der Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte gab es bezüglich p41/p43-Spaltfragment einen signifikanten Unterschied zwischen TK6wt und TK6-CAV1-MDR (84 h; 3,0 vs. 3,8,  $p = 0,03$ ), zwischen TK6-CAV1 und TK6-MDR1 (48 h; 11,8 vs. 5,4,  $p = 0,01$ ) und zwischen TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1 (48 h; 11,8 vs. 3,5,  $p = 0,02$ ). Bezüglich p18 gab es nach 4 h einen statistischen Unterschied zwischen TK6wt und TK6-MDR1 (1,7 vs. 0,5,  $p = 0,004$ ), allerdings war auf Grund der niedrigen Werte die Messunsicherheit größer.

Die Daten zeigen insgesamt, dass TK6-MDR1 die geringste bestrahlungsinduzierte Caspase 8 Spaltung aufwies, während TK6-CAV1 deutlich darüber lagen. Die im Mittel höhere Spaltung von Caspase 8 in TK6-CAV1 ist auf ein anhaltend hohes Level der Spaltung nach Bestrahlung zurückzuführen. Während die anderen Zelllinien 48 h nach Bestrahlung nur die Hälfte der maximal erreichten Caspase 8 Spaltung (bei 60 h) aufwiesen, lag sie bei TK6-CAV1 bereits ab 36 h nach Bestrahlung bei mehr als 60 % der maximal erreichten Caspase 8 Spaltung. Die gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 war vergleichbar mit der alleinigen MDR1-Überexpression, sodass keine Annahme besteht, dass CAV1 eine Minderung der Caspase 8 Spaltung in Kombination mit MDR1 bewirkt.

h nach IR	0	2	4	8	12	24	36	48	60	72	84
Caspase 8 p41/p43 Spaltfragment; Mittelwert (Standardfehler)											
WT	1,00 (0,00)	1,53 (0,13)	3,02 (0,63)	4,33 (0,43)	1,48 (0,26)	2,64 (0,67)	4,96 (1,06)	6,15 (3,71)	11,38 (9,40)	5,60 (1,10)	2,26 (0,55)
CAV1	1,00 (0,00)	1,55 (0,08)	2,17 (0,39)	3,29 (1,08)	3,14 (0,94)	3,64 (0,62)	8,21 (3,24)	11,76 (2,10)	8,92 (2,72)	13,63 (5,06)	2,38 (0,19)
MDR1	1,00 (0,00)	1,18 (0,70)	3,24 (2,18)	3,88 (1,59)	1,51 (0,46)	3,16 (1,06)	2,88 (0,76)	5,43 (2,08)	11,40 (8,12)	5,84 (2,42)	1,57 (0,62)
CAV1-MDR1	1,00 (0,00)	3,21 (1,88)	4,64 (2,81)	6,92 (4,76)	2,45 (0,65)	3,37 (1,47)	4,04 (0,49)	3,50 (1,02)	10,99 (5,26)	9,70 (2,40)	3,27 (0,62)
Caspase 8 p18 Spaltfragment; Mittelwert (Standardfehler)											
WT	1,00 (0,00)	0,87 (0,21)	1,69 (0,26)	2,92 (1,05)	1,44 (0,51)	2,32 (0,68)	3,08 (0,29)	4,09 (2,11)	7,90 (6,66)	3,43 (0,65)	2,17 (0,72)
CAV1	1,00 (0,00)	1,84 (0,80)	1,99 (0,84)	2,04 (0,76)	3,01 (1,75)	2,30 (0,62)	4,55 (2,19)	5,73 (1,57)	5,48 (2,43)	8,12 (3,26)	3,52 (0,81)
MDR1	1,00 (0,00)	0,68 (0,25)	0,51 (0,20)	1,06 (0,06)	1,28 (0,81)	1,03 (0,60)	1,55 (1,01)	2,30 (1,78)	2,42 (1,08)	2,00 (1,04)	1,51 (1,04)
CAV1-MDR1	1,00 (0,00)	2,66 (0,50)	4,67 (3,11)	8,56 (5,89)	4,79 (2,00)	6,76 (2,99)	6,56 (2,82)	5,12 (2,30)	8,99 (2,83)	10,56 (7,44)	5,55 (3,29)

Mittelwert p41/43  
0 h – 84 h:

WT: 4,3 // CAV1:5,9 // MDR1: 4,0 // CAV1-MDR1: 5,2

Mittelwert p18  
0 h – 84 h:

WT: 3,0 // CAV1:3,9 // MDR1: 1,4 // CAV1-MDR1: 6,4

Mittelwert p41/43  
36 h – 72 h:

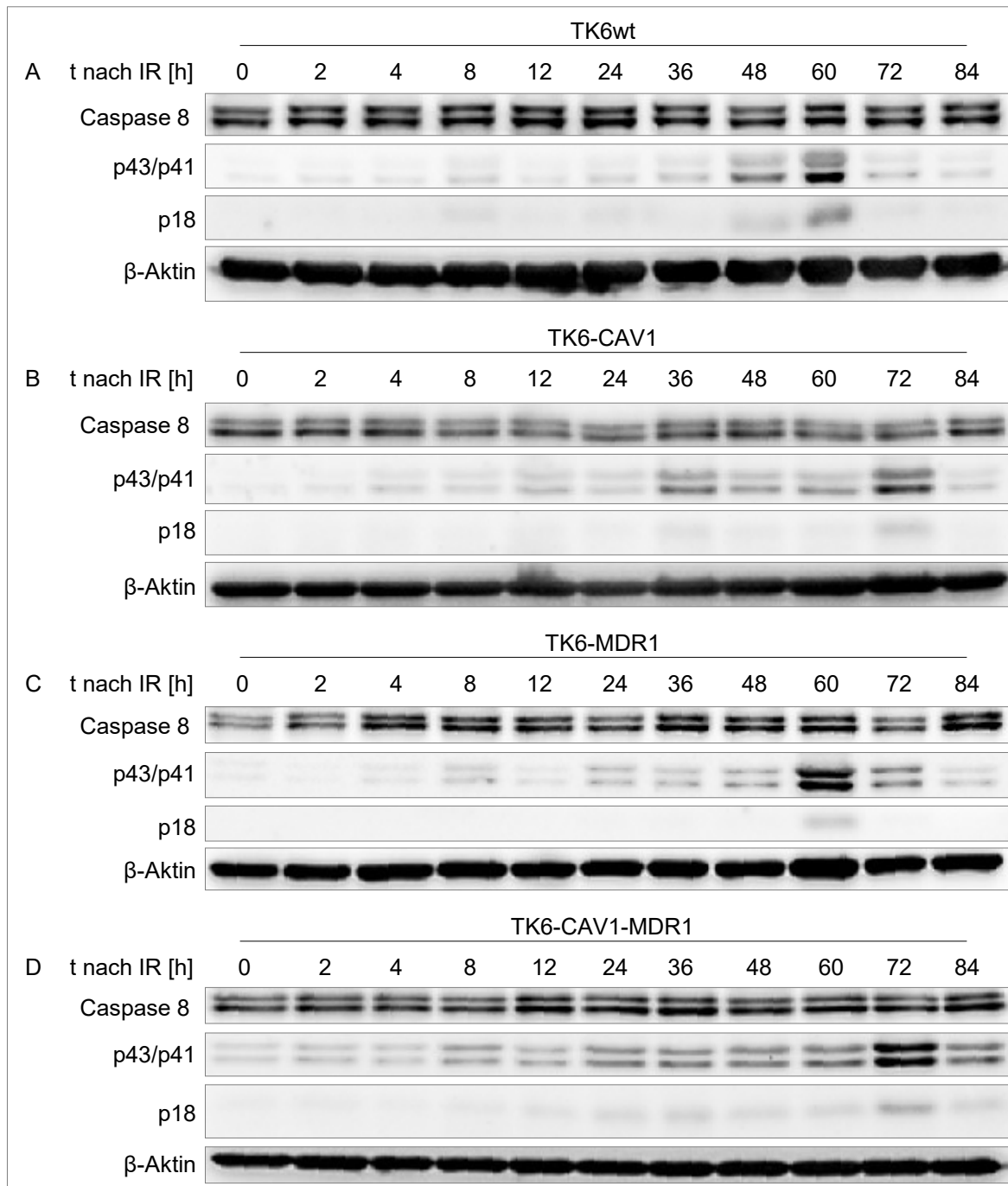
WT: 7,0 // CAV1:10,6 // MDR1: 6,4 // CAV1-MDR1: 7,1

Mittelwert p18  
36 h – 72 h:

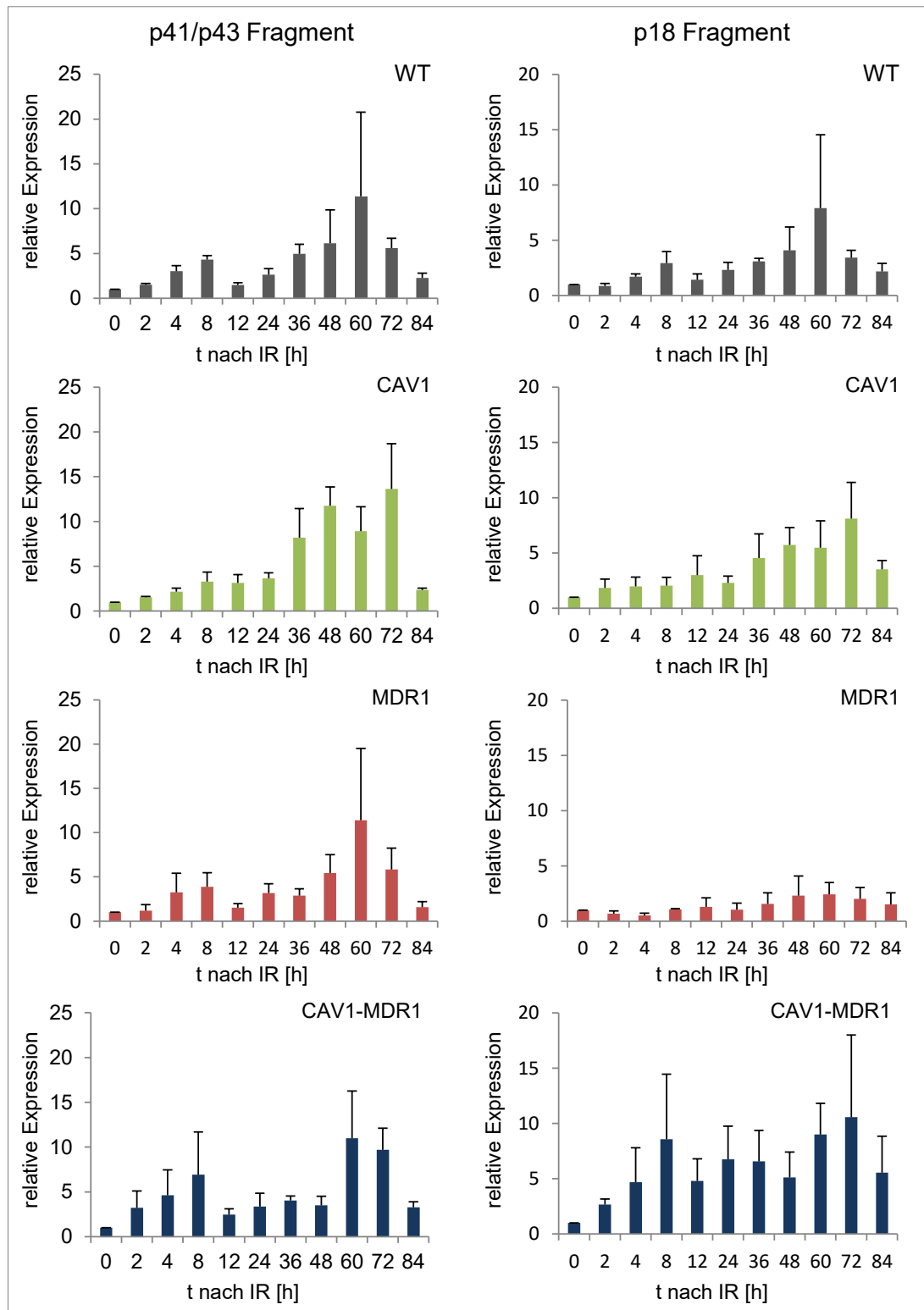
WT: 4,6 // CAV1:6,0 // MDR1: 2,1 // CAV1-MDR1: 7,8

**Tabelle 7: Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.**

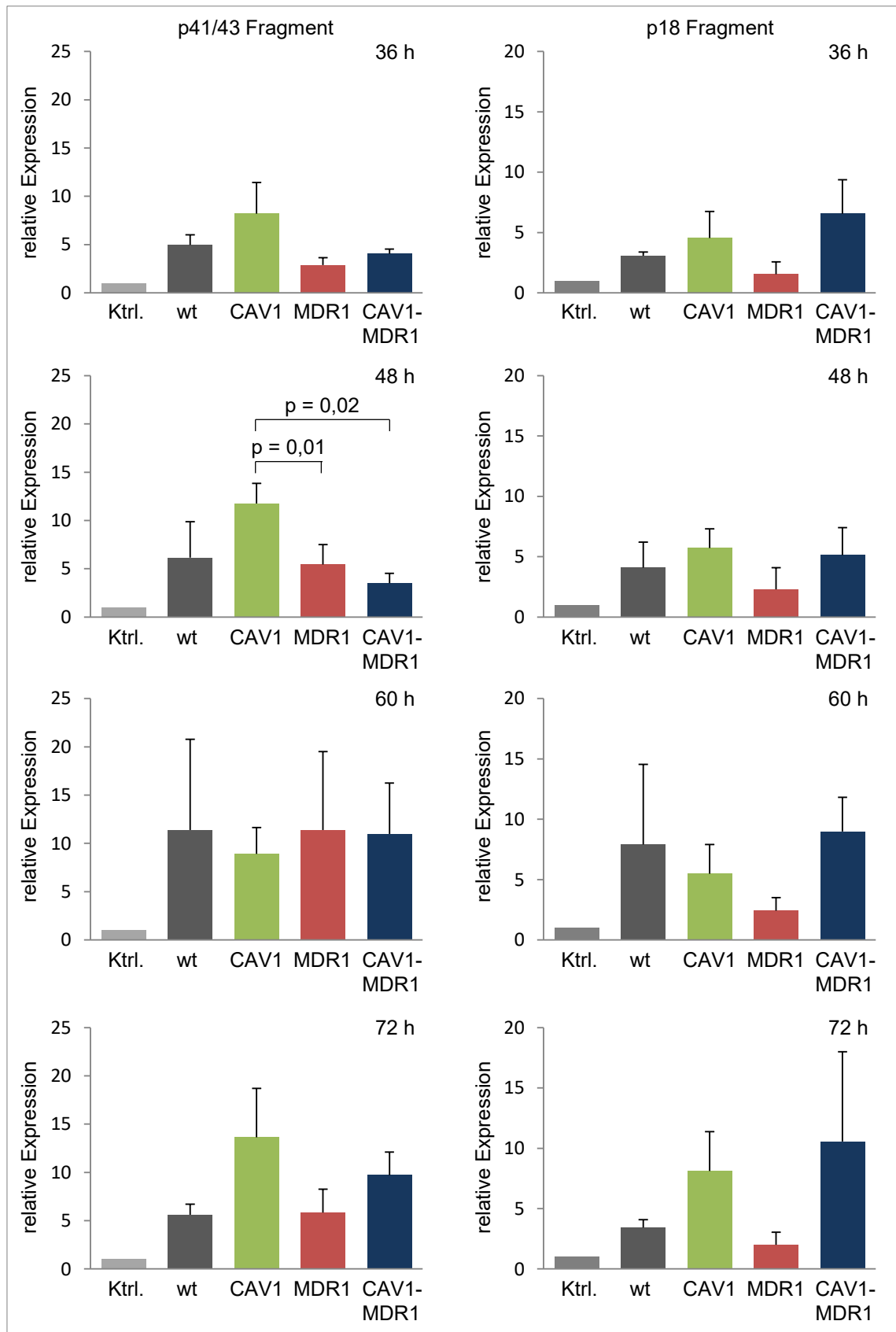




**Abb. 21: Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.** Die Spaltung von Caspase 8 verläuft dabei über das p43/p41 Spaltprodukt hin zur p18 Untereinheit. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung. Die stärkste Zunahme der Spaltfragmente von Caspase 8 wurde zwischen 36 h und 72 h nach Bestrahlung beobachtet.



**Abb. 22: Densitometrische Quantifizierung der Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.** Bestrahlung induziert die Spaltung von Caspase 8 in p41/p43 und p18, die zwischen 60 h und 72 h ihr Maximum erreicht. Die Graphen zeigen Mittelwert und Standardfehler der 3 unabhängigen Experimente. Über den Versuchszeitraum war die Caspase 8 Spaltung am niedrigsten in TK6-MDR1, während TK6-CAV1 eine stärkere Spaltung von Caspase 8 aufwies als TK6wt. Bezüglich des p41/p43 Spaltfragments lag TK6-CAV1-MDR1 unter TK6-CAV1, während sie bezüglich p18 Spaltfragment über TK6-CAV1 lagen.



**Abb. 23: Densitometrische Quantifizierung der Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 36 h und 72 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.** Die Abbildung zeigt den direkten Zelllinienvergleich im Zeitraum zwischen 36 h und 72 h nach Bestrahlung. Die Graphen zeigen Mittelwert und Standardfehler der 3 unabhängigen Experimente.

## 4.3 Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 nach Bestrahlung

### 4.3.1 Etablierung der Geräteeinstellung anhand von Kontrollfärbungen

Für die Etablierung der Färbungen und Geräteeinstellungen zur Untersuchung der Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 wurden TK6-CAV1-MDR1 mit unterschiedlichen Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörper gefärbt, um die Verträglichkeit der Antikörper zu bestätigen und Kreuzreaktivitäten auszuschließen. Dazu wurden für alle Konditionen die unterschiedlichen Kombinationen aus Laser (488 nm: grün, MDR1; 552 nm: rot, CAV1) und Detektor (PMT 1: 493 nm – 596 nm; PMT 2: 600 nm – 765 nm) getestet, wobei stets das identische Sichtfeld für eine Kondition verwendet wurde (Abb. 24). Nur für die korrekte Kombination aus Primär- und Sekundärantikörper (Konditionen 1-2) wurde ausschließlich unter Verwendung der korrekten Kombination aus Laser und Detektor (für CAV1: Reihe 1 und Reihe 4; für MDR1: Reihe 2 und Reihe 6) ein deutliches Signal detektiert. Es wurden keine Autofluoreszenz (Kondition 3), keine Kreuzreaktivitäten der Sekundärantikörper mit dem jeweils falschen Primärantikörper (Konditionen 4 und 5) und keine unspezifische Reaktivität der Sekundärantikörper (Konditionen 6 und 7) beobachtet. Die Signalintensität war unabhängig davon, ob beide Laserlinien oder nur eine aktiv war, da die Sekundärantikörper-gekoppelten Fluoreszenzmarker nur in einem sehr engen Bereich anregbar sind. Zum Nachweis, dass in den gewählten Sichtfeldern jeder Kondition tatsächlich Zellen vorhanden waren, wurde die Bilddatei der mit einem Stern (\*) markierten Abbildung einer Falschfärbung mit Cyan unterzogen und die Intensitätsskala artifiziell erweitert, wodurch schwache Pixel intensiviert dargestellt werden konnten (Zuordnung von initial 1-15 Graustufen auf den gesamten Graustufenbereich bis 255 Graustufen). Auf eine Kernfärbung wurde bewusst verzichtet, um eine gegenseitige Beeinflussung der Farbstoffe zu vermeiden (Abb. 24).

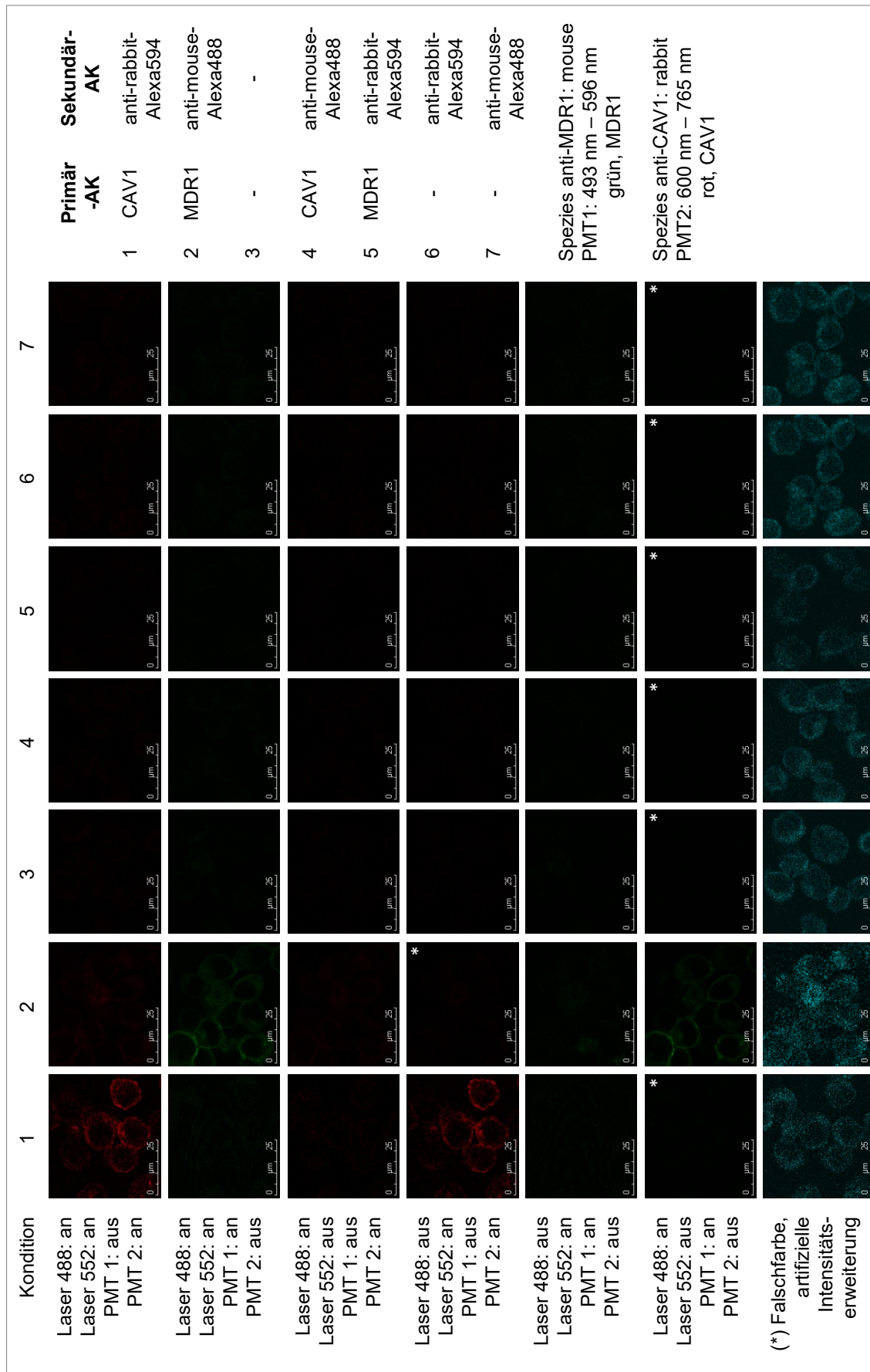


Abb. 24: Nachweis der Antikörper-Spezifität und Etablierung korrekter Systemeinstellungen mit TK6-CAV1-MDR1. Fortsetzung: S. 95.

#### 4.3.2 Detektion der (Co-) Lokalisation nach Bestrahlung von TK6-CAV1-MDR1

Zur Analyse einer möglichen Änderung der (Co-) Lokalisation von CAV1 und MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy wurden fixierte TK6-CAV1-MDR1 konfokalmikroskopisch untersucht (Abb. 25, Abb. 26). Es wurde ein z-Stapel durch die Zellen aufgenommen, aus dem jeweils eine Ebene aus der Mitte des Stapels dargestellt ist. CAV1 (rot, Reihe 1) und MDR1 (grün, Reihe 2) wurden sequenziell detektiert und eine Überlagerung der Farbkanäle (merge, Reihe 3) erstellt. Durch die Überlagerung erscheinen Pixel, die zueinander nahe sind und in beiden Kanälen detektiert wurden, gelb, sofern die Pixel eine ähnliche Intensität aufweisen. Bei unterschiedlicher Intensität der Pixel ergibt die Überlagerung bei überwiegendem Rotanteil einen orangen Farbton, bei überwiegendem Grünanteil einen hellgrünen Farbton. Der z-Stapel wurde mittels 3D-Rekonstruktion in der Vorderansicht abgebildet, wodurch die Pixel nicht in eine gemeinsame Ebene kollabiert wurden, sondern vorgelagerte Pixel dahinterliegende verdecken (3D-Vorderansicht, Reihe 4). Ein Ausschnitt des Sichtfelds von Abb. 25 wurde vergrößert in Abb. 26 dargestellt. Die Pfeile weisen auf Beispiele auffälliger Membranbereiche hin, die entweder fast ausschließlich grün (MDR1, durchgängiger Pfeil), fast ausschließlich rot (CAV1, grob gestrichelter Pfeil) oder gelb (Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1, fein gestrichelter Pfeil) sind.

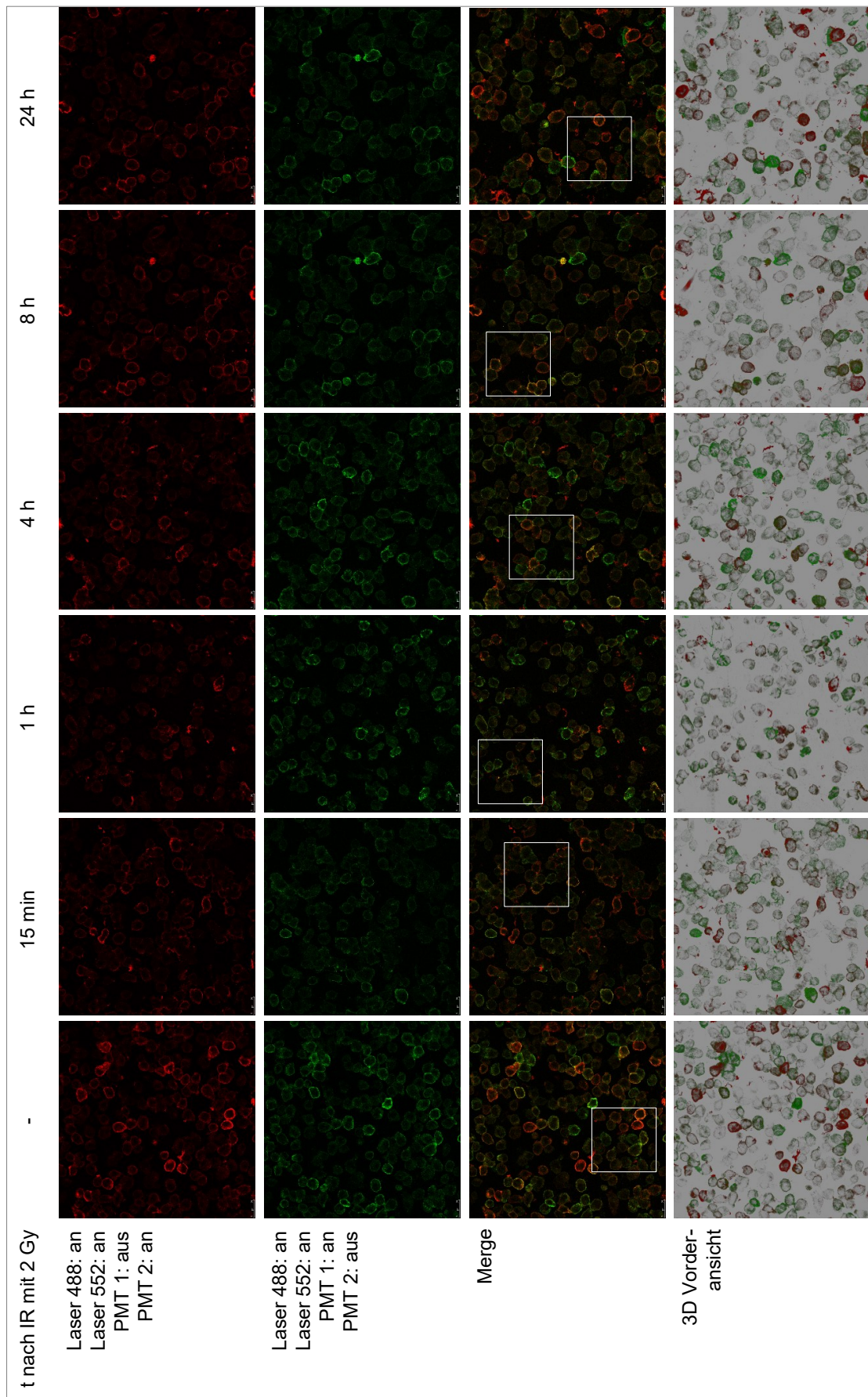


Abb. 25: Lokalisation von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy (A).  
Fortsetzung: S. 95.

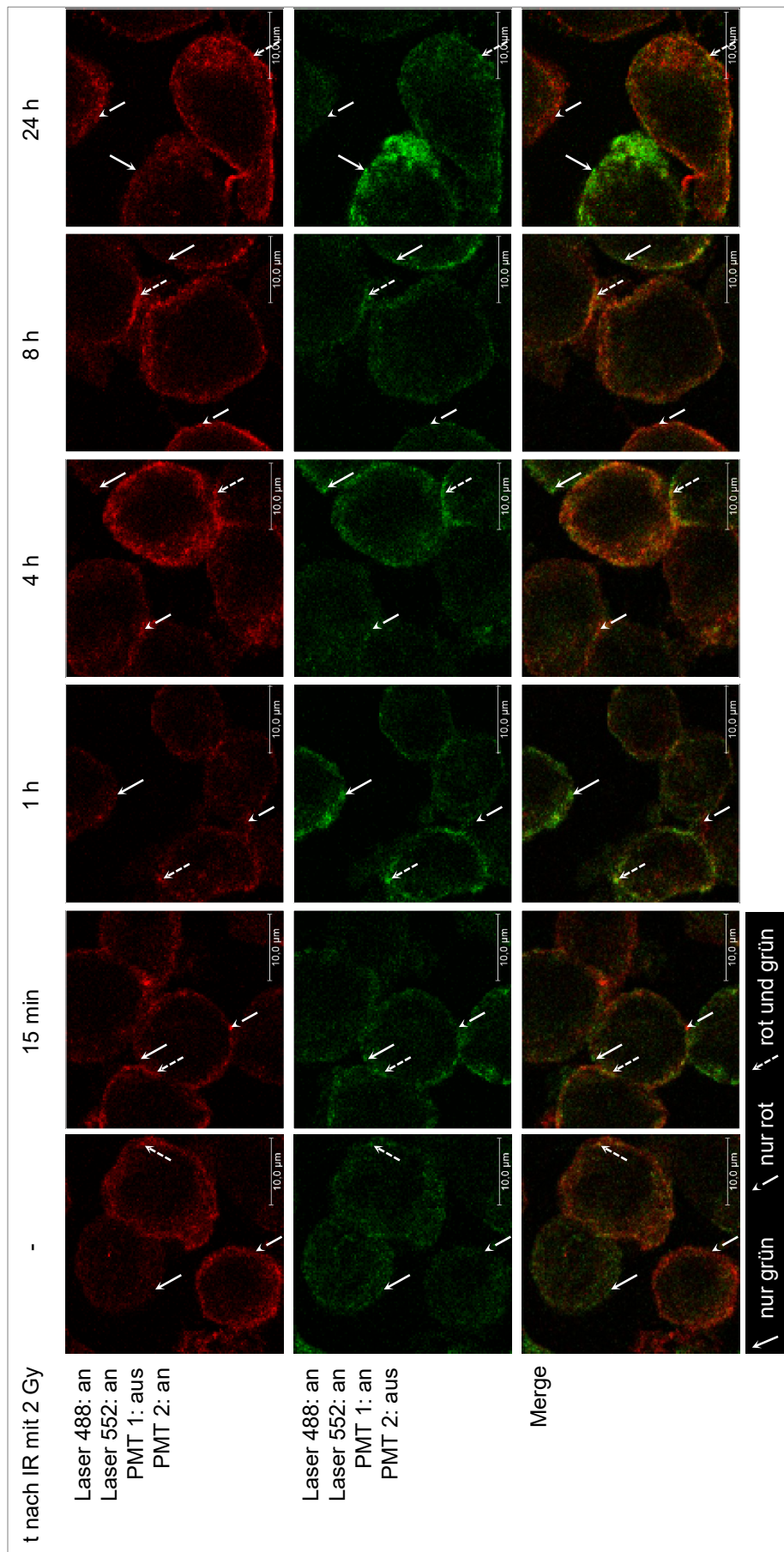


Abb. 26: Lokalisation von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy (B).

Fortsetzung: S. 95.



#### 4.3.3 Statistische Auswertung der Co-Lokalisationsparameter

Zur Bewertung des Grads der Co-Lokalisation wurden pro Kondition 200 Zellen mittels der Plugins Coloc2 und Colocalization Threshold der Software ImageJ ausgewertet. Es wurde stets die gesamte Zelle analysiert und sichergestellt, dass die Signalsättigung weniger als 1 % betrug. Analysiert wurden die Daten zu Manders Co-Lokalisationskoeffizient ( $tM1$ ,  $tM2$ ), Pearsons Koeffizient ( $R$ ) und Lis ICQ. Parameter, die von beiden Plugins bestimmt wurden, ergaben dabei sehr ähnliche Ergebnisse (Angaben in der Reihenfolge Colocalization Threshold bzw. Coloc2) (Abb. 27). Die unbestrahlte Kontrolle wies einen Wert von  $R = 0,36$  bzw.  $0,38$  auf, der nach Bestrahlung über den Auswertzeitraum kontinuierlich abnahm (2 Gy, 24 h:  $R = 0,28$  bzw.  $0,29$ ;  $p$  (Ktrl. vs. 2 Gy 24 h) =  $0,041$  bzw.  $0,080$ ;  $p$  (2 Gy 4 h vs. 2 Gy 24 h):  $0,028$  bzw.  $0,008$ ). Werte, die nicht deutlich bei 1 oder -1 liegen, sind häufig schwer zu interpretieren. Eine mögliche Erklärung für die Wertelage um  $0,3/0,4$  könnte sein, dass die Proportionalität der Intensitäten für den roten und grünen Kanal nicht 1 ist, also eine Kanalintensität im Mittel stärker ist als die andere. Die umfassenden Bilddaten aus Coloc2 unterstützen diese Möglichkeit, da der Intensitätsmittelwert für CAV1 etwas höher liegt als für MDR1 (Daten nicht gezeigt). Hinzu kommt, dass trotz der deutlichen Abnahme von  $R$  mit beiden Plugins, die statistische Signifikanz auf Grund der geringen Versuchszahl und der Datenschwankung moderat ist. Da Pearson  $R$  von der Signalintensität beeinflusst wird, erfolgte mittels  $tM1$  und  $tM2$  eine Auswertung auf Basis einer lokal vorhandenen Intensität (Anteil roter Pixel, die gleichzeitig grün sind, in Bezug auf alle roten Pixel und vice versa), weniger auf Basis der Intensitätsstärke.

Die Auswertung von  $tM1$  bzw.  $tM2$  mit Colocalization Threshold ergab eine Abnahme von  $0,77$  bzw.  $0,80$  (unbestrahlt) auf  $0,70$  bzw.  $0,72$  (2 Gy, 24 h), wobei ausschließlich für  $tM2$  der Zeitpunkt 1 h nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant war ( $p_{tM2} = 0,024$ ). Bezüglich  $tM1$  bzw.  $tM2$  ergab die Auswertung mit Coloc2 eine Abnahme von  $0,77$  bzw.  $0,79$  (unbestrahlt) auf  $0,70$  bzw.  $0,72$  (2 Gy, 24 h), wobei für  $tM1$  und  $tM2$  der Zeitpunkt 1 h nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant war ( $p_{tM1} = 0,042$  bzw.  $p_{tM2} = 0,0005$ ). Somit nahm der Anteil an Pixeln mit Intensität in beiden Kanälen sowohl für den roten (CAV1) als auch grünen (MDR1) Kanal ab.

Die Ermittlung des ICQ, die ausschließlich mittels Coloc2 möglich war, ergab für die unbestrahlte Kontrolle  $0,24$  und 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy  $0,23$ . Dies deutet darauf hin, dass der Anteil positiver Produkte ca.  $0,75$  beträgt. Durch Bestrahlung

ergab sich keine Änderung der Wertelage, also keine Änderung der Synchronität, was bedeutet, dass der Grad der Co-Lokalisation gleich blieb.

Insgesamt lag die Abnahme von Pearsons R im Bereich von ca. 20 %, wobei diese Tendenz nicht allein auf die Intensitätsdifferenz zurück geht und somit eine Zunahme der zufälligen Verteilung von CAV1 und MDR1 angedeutet wird. Die Werte für tM1 und tM2 nahmen um ca. 10 % ab, was bedeutet, dass durch Bestrahlung weniger Pixel mit Intensitäten in beiden Kanälen vorhanden waren, also der Überlappungsgrad von CAV1 und MDR1 sank. Die Ermittlung des ICQ ergab keine Veränderung, was bedeutet, dass weiterhin ein überwiegender Teil der Intensitäten in beiden Kanälen über dem Kanalmittel lag und sich keine Änderung der Co-Lokalisation auf Basis der Synchronität zeigte. Die statistische Auswertung dieser drei unterschiedlichen Parameter deutet insgesamt darauf hin, dass durch die Bestrahlung eine Abnahme der Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 induziert wird, die bereits 1 h nach Bestrahlung eintritt und über mindestens 24 h anhält.

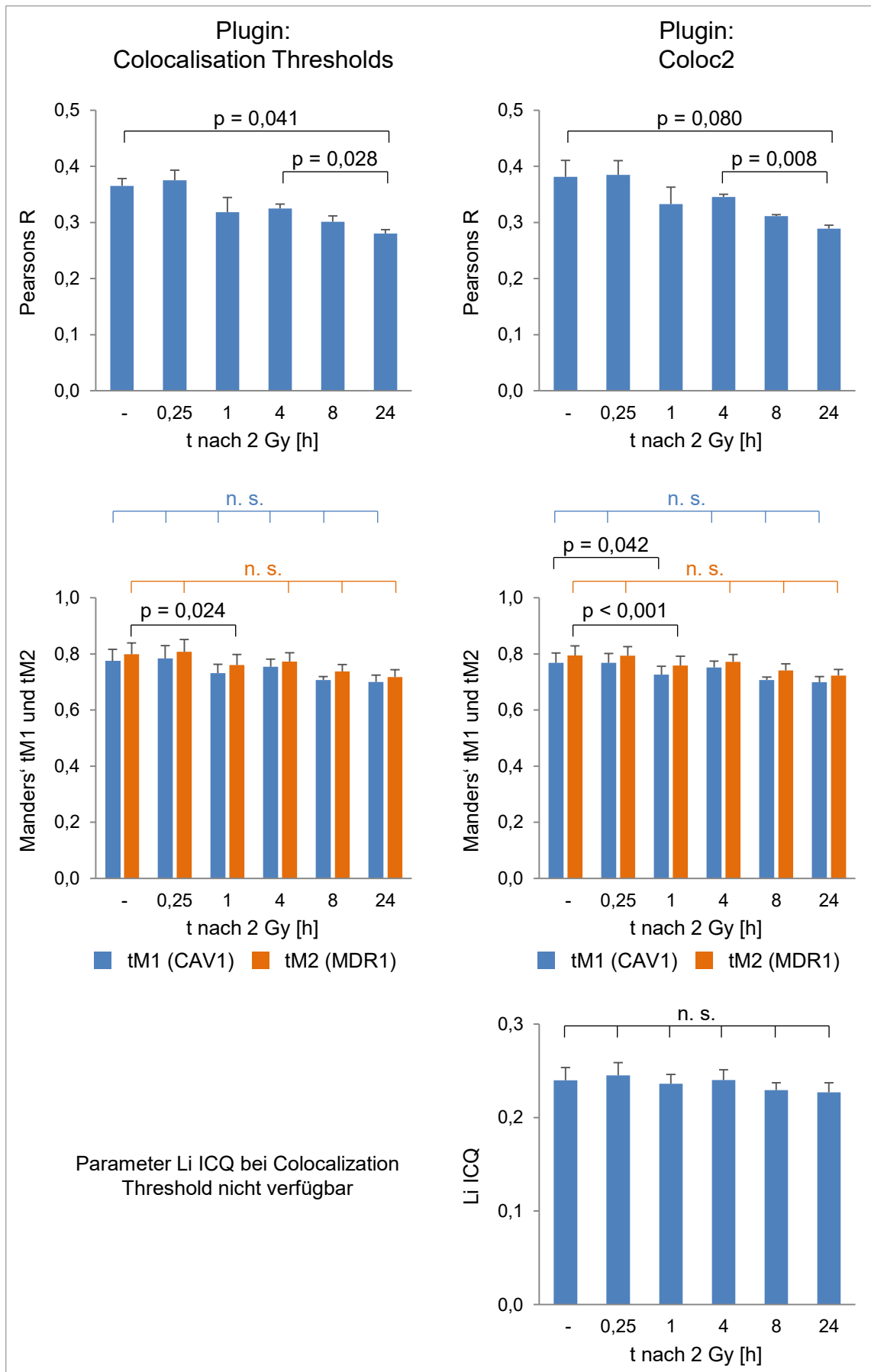


Abb. 27: Statistische Auswertung der Co-Lokalisationsparameter R (Pearson), tM1/tM2 (Manders) und ICQ (Li) mittels der Plugins Colocalization Threshold und Coloc2. Fortsetzung: S. 95.

**BESCHRIFTUNGSTEXT ZU ABBILDUNGEN 24-27****Abb. 24: Nachweis der Antikörper-Spezifität und Etablierung korrekter Systemeinstellungen.**

TK6-CAV1-MDR1 wurden mit unterschiedlichen Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörper gefärbt. Die Detektion erfolgte mit den gleichen Einstellungen, die für die bestrahlten Proben verwendet wurden, wobei unterschiedlichen Kombinationen von Laser und Detektor eingesetzt wurden, um korrekte Systemeinstellungen zu prüfen und die Detektion der falschen Signale auszuschließen (Kondition 1-2), Autofluoreszenz auszuschließen (Kondition 3), Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper auszuschließen (Kondition 4-5) und Eigenfluoreszenz der Sekundärantikörper auszuschließen (Kondition 6-7). Zur Darstellung der Anwesenheit von Zellen im jeweiligen Sichtfeld wurde die Bilddatei der mit einem Stern (\*) markierte Abbildung einer Falschfärbung (cyan) unterzogen und der Intensitätsbereich künstlich erweitert, wodurch schwache Pixel intensiviert wurden (Zuordnung der 255 Graustufen auf einen Bereich von 1-15 Graustufen). Abbildungen stellen ein repräsentatives Sichtfeld in einer repräsentativen Zellebene dar.

**Abb. 25: Lokalisation von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1 nach Bestrahlung mit 2 Gy (A).**

TK6-CAV1-MDR1 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und anschließend beide Proteine in der gleichen Probe gefärbt. CAV1 (rot) und MDR1 (grün) sind in der Membran lokalisiert und tauchen sowohl getrennt als auch gemeinsam lokalisiert auf (Merge: Überlagerung aus rot und grün erscheint gelb und variiert je nach Intensität des roten und grünen Kanals zwischen orange und hellgrün). Die Abbildungen aus Reihe 1-3 stellen ein repräsentatives Sichtfeld in einer repräsentativen Zellebene dar, die Teil eines Bildstapels ist. Die Rekonstruktion dieses 3D-Bildstapels ist als Vorderansicht in Reihe 4 dargestellt. Der räumliche Bezug der Pixel zueinander und die Farbgebung rot/grün blieb dabei erhalten. Das Feld innerhalb des weißen Rahmens wurde in Abb. 26B vergrößert betrachtet.

**Abb. 26: Lokalisation von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1 nach Bestrahlung mit 2 Gy (B).**

TK6-CAV1-MDR1 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und anschließend beide Proteine in der gleichen Probe gefärbt. CAV1 (rot) und MDR1 (grün) sind in der Membran lokalisiert und tauchen sowohl getrennt als auch gemeinsam lokalisiert auf. (Merge: Überlagerung aus rot und grün erscheint gelb). Die Abbildungen aus Reihe 1-3 stellen ein repräsentatives Sichtfeld in einer repräsentativen Zellebene dar. Die Pfeile weisen auf Beispiele auffälliger Membranbereiche hin, die entweder fast ausschließlich grün (MDR1, durchgängiger Pfeil), fast ausschließlich rot (CAV1, grob gestrichelter Pfeil) oder gelb (Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1, fein gestrichelter Pfeil) sind.

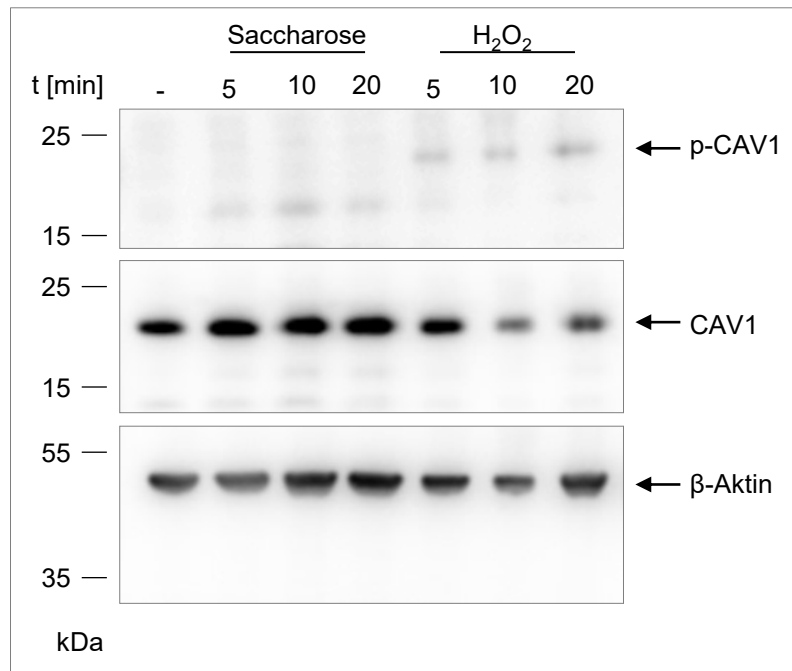
**Abb. 27: Statistische Auswertung der Co-Lokalisationsparameter R (Pearson), tM1/tM2 (Manders) und ICQ (Li) mittels der Plugins Colocalization Threshold und Coloc2.** Bestrahlung mit 2 Gy induzierte die Abnahme von Pearson R und von tM1/tM2 über einen Zeitraum von 24 h, während der ICQ unverändert blieb. Die Berechnungen basieren auf Daten von 200 Zellen pro Kondition. Die ermittelten Werte für Pearson R und Manders tM1/tM2 war durch beide Plugins sehr ähnlich. Die Graphen zeigen Mittelwerte und Standardfehler der 3 unabhängigen Experimente.

## 4.4 Rolle der Phosphorylierung von CAV1 an Tyrosin 14

### 4.4.1 Pilotexperiment: Phosphorylierung von CAV1 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung von CAV1 u. a. durch Saccharose und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert werden kann, und dass in den dabei aktivierten Stresssignalwegen Kinasen wie p38, SFK und JNK phosphoryliert werden. Bevor untersucht wurde, ob auch ionisierende Bestrahlung diese Stresssignalwege induziert, sollte mit einem bekannten Stresssystem die Funktionalität der Phosphorylierungsstelle Tyr14 von CAV1 untersucht werden. Besonders geeignet war dazu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, insbesondere auch auf Grund der Induktion von oxidativem Stress, der auch nach Bestrahlung durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eintritt. TK6-CAV1 wurden für diese initialen Studien mit Saccharose oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und die Phosphorylierung von CAV1 analysiert (Abb. 28). Während die Behandlung von TK6-CAV1 mit 600 mM Saccharose nicht zur Phosphorylierung von CAV1 führte, war eine deutliche p-CAV1 Bande bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Lysaten detektierbar. Daher wurde für weitere Untersuchungen der oxidativen Stressantwort H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingesetzt. Ein Proteinmarker zum Abgleich der korrekten Bandengröße wurde stets mitgeführt und aus Gründen der Übersichtlichkeit bei den folgenden Abbildungen nicht dargestellt.

Im Vergleich zu den folgenden Abbildungen ist das Signal von p-CAV1 im hier dargestellten Pilotexperiment deutlich schwächer. Dies ist darin begründet, dass auf Grund fehlender Erfahrungen mit dem p-CAV1-Antikörper eine sehr kurze Entwicklungszeit (ca. 20 sec) gewählt wurde. Die Behandlungsbedingungen waren hier 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min – 20 min, während in den Folgeexperimenten bei 20-minütiger Behandlung mit 5 mM – 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Entwicklungszeit bei ca. 2 min lag.



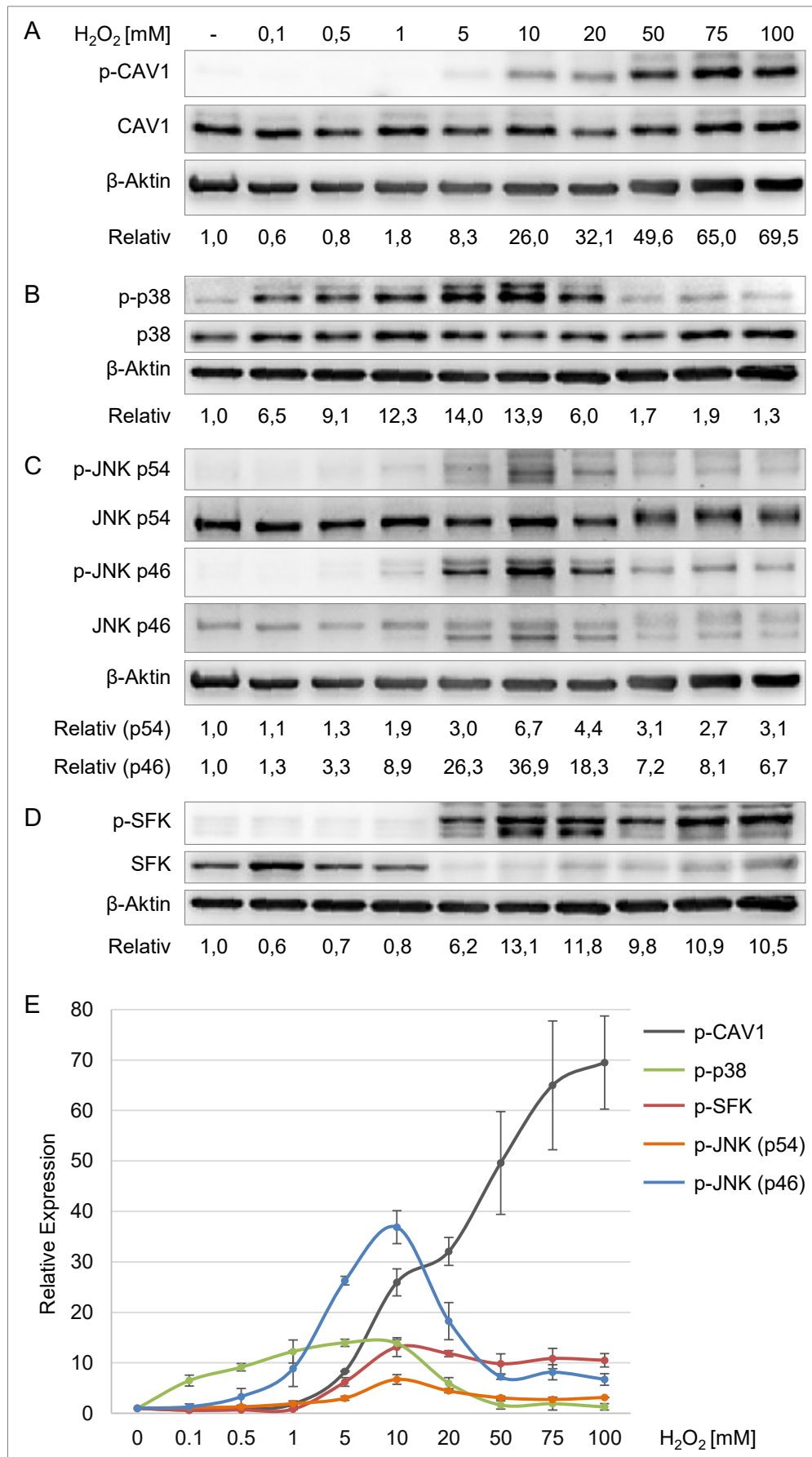
**Abb. 28: Phosphorylierung von CAV1 nach Behandlung mit Saccharose oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** TK6-CAV1 wurden mit 600 mM Saccharose bzw. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die angegebenen Zeitpunkte behandelt und Zelllysate hinsichtlich Phosphorylierung von CAV1 untersucht. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Phosphorylierung von CAV1 wurde nicht durch Saccharose, aber durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert

#### 4.4.2 Phosphorylierung von CAV1 und Kinasen p38, JNK und SFK durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung der Kinasen p38, JNK p54/p46 und SKF auch durch Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wird, wurden TK6-CAV1 für 20 min mit unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen im Bereich von 0,1 mM – 100 mM behandelt und anschließend Zelllysate mittels Western Blot hinsichtlich CAV1-Phosphorylierung und Kinaseaktivierung untersucht (Abb. 29). Die untersuchten Proteine wiesen dabei unterschiedliche Sensitivitäten für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf. Ab einer Konzentration von 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war eine deutliche Phosphorylierung von CAV1 zu sehen, die sich mit zunehmender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration weiter steigerte (Abb. 29A). Die Aktivierung der untersuchten Kinasen verlief dabei je nach Kinase unterschiedlich. Die Phosphorylierung von p38 war bereits bei 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deutlich, erreichte im Bereich von 5 mM – 10 mM ihr Maximum (14-fach im Vergleich zur Kontrolle; p = 0,003) und sank anschließend bei steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen (Abb. 29B). Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung von JNK und SFK erst ab 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deutlich. Beide JNK Isoformen erreichten bei 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ihre maximale Phosphorylierung (p54: 6,7-fach; p = 0,03; p46: 37-fach; p = 0,008) und sanken bei steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration, wobei p54 JNK eine geringere Phosphorylierung aufwies als p46 JNK (Abb. 29C). Die Phosphorylierung der SFK war ebenfalls nach 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> am stärksten (13-fach; p = 0,02) und blieb

bei steigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen auf diesem Niveau (Abb. 29D). Die Dosisantwort der Phosphorylierung von CAV1 und der Kinasen (Abb. 29E) zeigt auf, dass die Kinasen bei niedrigerer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration phosphoryliert waren als CAV1, was für eine Rolle der Kinasen bei der CAV1-Phosphorylierung spricht.

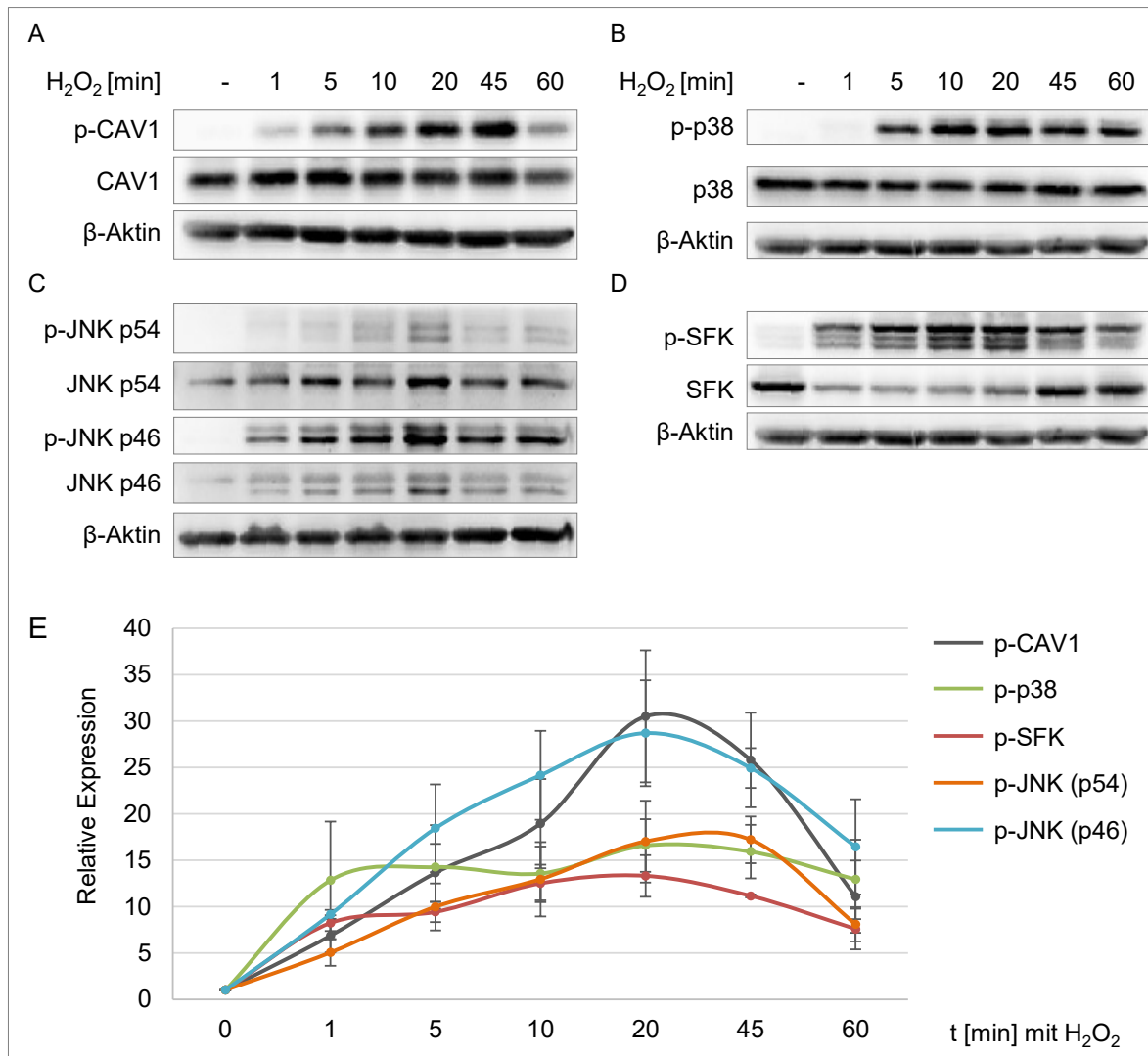
Es war zu beachten, dass SFK Totalprotein ab 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht mehr detektierbar war. SFK Totalprotein wurde mit einem Antikörper, der SFK außerhalb der aktivierenden Phosphorylierungsstelle bindet, detektiert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass es auf Grund der hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration zu einer Konformationsänderung im Kinase-molekül kam und so das Epitop für den Antikörper unzugänglich wurde. Denkbar ist auch, dass es im Epitopbereich zu Redoxprozessen kam und die Antikörperbindung daher nicht möglich war. Dass es sich hierbei um eine transiente Veränderung der Detektierbarkeit handelte, wurde nach Behandlung mit 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  über einen Zeitraum zwischen 1 min und 60 min deutlich (Abb. 30D). Hier ist zu erkennen, dass nach 1 min ein reduziertes Signal für SFK gemessen wurde, das nach 45 min wieder auf Höhe der unbehandelten Kontrolle war. Um eine Datenverzerrung zu vermeiden und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu wahren, wurden alle densitometrischen Quantifizierungen auf  $\beta$ -Aktin als Referenz bezogen. Für CAV1 und die Kinase wurde gezeigt, dass eine starke Induktion der Phosphorylierung bereits nach 1 min bis 5 min  $\text{H}_2\text{O}_2$  Behandlung eintrat, die für JNK nach 20 min ihr Maximum erreichte. Für weitere Studien wurde diese Behandlungszeit verwendet. Die Kinetik zeigt außerdem, dass die Phosphorylierung der Kinasen bereits innerhalb von 10 min bis 20 min ihr Maximum erreichte, während p-CAV1 nach 45 min am höchsten war. Dies unterstützt zusätzlich die Annahme, dass die untersuchten Kinasen eine Rolle bei der CAV1-Phosphorylierung spielen.



**Abb. 29:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert die Phosphorylierung von CAV1 und von den Kinasen p38, JNK p54/46 und SFK. TK6-CAV1 wurden für 20 min mit den angegebenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen behandelt und



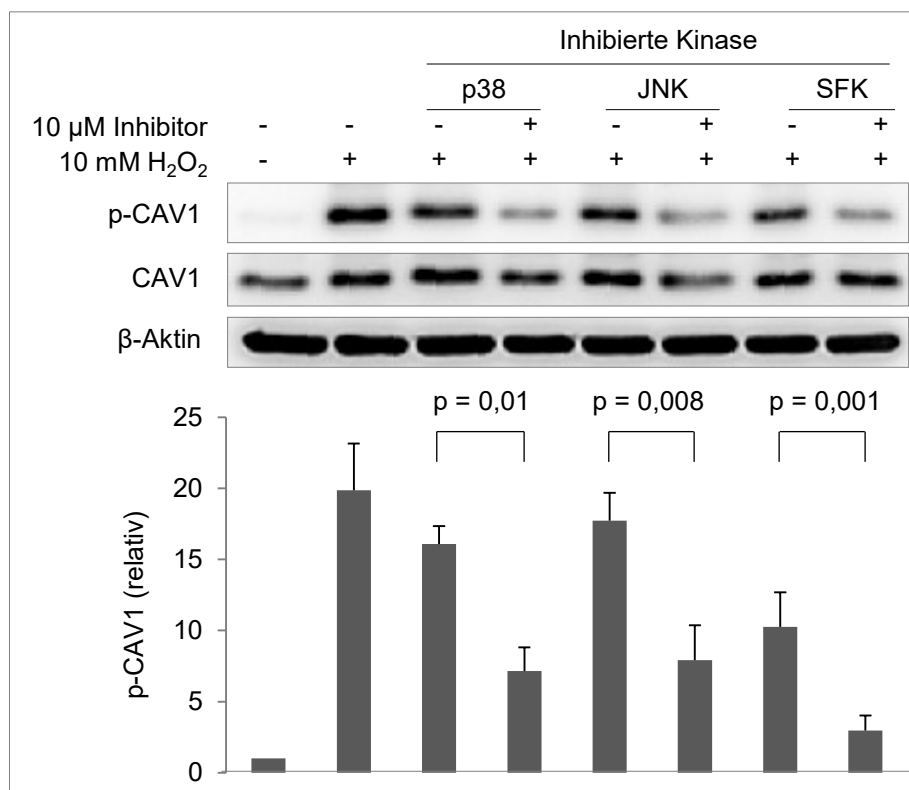
anschließend Zelllysate hinsichtlich p-CAV1 (A), p-p38 (B), p-JNK (C) und p-SFK (D) untersucht. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Die mittlere relative Phosphorylierung wurde densitometrisch analysiert und ist unter dem jeweiligen  $\beta$ -Aktin Blot angegeben.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung. E): Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der Phosphorylierung von CAV1, p38, SFK und JNK p54/46 nach Behandlung mit  $H_2O_2$ . Die Linien verbinden die jeweiligen Mittelwerte des Phospho-Signals; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



**Abb. 30: Zeitverlauf der Phosphorylierung von CAV1 (A), SFK (B), JNK (C) und p38 (D) nach Behandlung mit 10 mM  $H_2O_2$  für die angegebenen Zeiträume.** TK6-CAV1 wurden mit 10 mM  $H_2O_2$  für die angegebenen Zeiten behandelt und anschließend Zelllysate hinsichtlich p-CAV1 (A), p-p38 (B), p-JNK (C) und p-SFK (D) untersucht. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Die mittlere relative Phosphorylierung wurde densitometrisch analysiert.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle.

#### 4.4.3 Minderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Phosphorylierung von CAV1 durch spezifische Inhibition von p38, JNK und SFK

Erste Hinweise dafür, dass die Kinasen p38, SFK und JNK für die Phosphorylierung von CAV1 eine Rolle spielen könnten, waren einerseits die Beobachtungen, dass im untersuchten Konzentrationsbereich alle Kinasen durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung aktiviert wurden, und andererseits, dass die Kinasen in einem ähnlichen Zeitfenster wie CAV1 aktiviert waren. Daher wurde an dieser Stelle untersucht, ob die Phosphorylierung von CAV1 durch die untersuchten Kinasen induziert wird. Dazu wurden spezifische Inhibitoren gegen SFK (SU6656), p38 (SB203580) und JNK (SP600125) eingesetzt und anschließend der Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Phosphorylierung von CAV1 mittels Western Blot analysiert (Abb. 31). Hier konnte gezeigt werden, dass 1 h Inkubation mit je 10 µM Inhibitor die CAV1-Phosphorylierung nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf jeweils ca. 45 % durch p38- und JNK-Inhibitor ( $p = 0,01$  für p38-Inhibition;  $p = 0,008$  für JNK-Inhibition) und auf 27 % durch SFK-Inhibitor ( $p = 0,001$ ) reduzierte.



**Abb. 31: Die Inhibition von p38, JNK und SFK verringerte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Phosphorylierung von CAV1.** TK6-CAV1 wurden für 1 h mit 10 µM spezifischem Inhibitor von p38 (SB203580), JNK (SP600125), SFK (SU6656) oder Vehikel vorbehandelt und anschließend mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 min stimuliert. Dabei nahm die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Phosphorylierung von CAV1 nach p38-Inhibition um 55 %, nach JNK-Inhibition um 58 % und nach SFK-Inhibition um 73 % ab. Der abgebildete Western Blot

ist repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Die mittlere relative Phosphorylierung wurde densitometrisch analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung. Der Graph zeigt Mittelwert und Standardfehler der 4 unabhängigen Experimente.

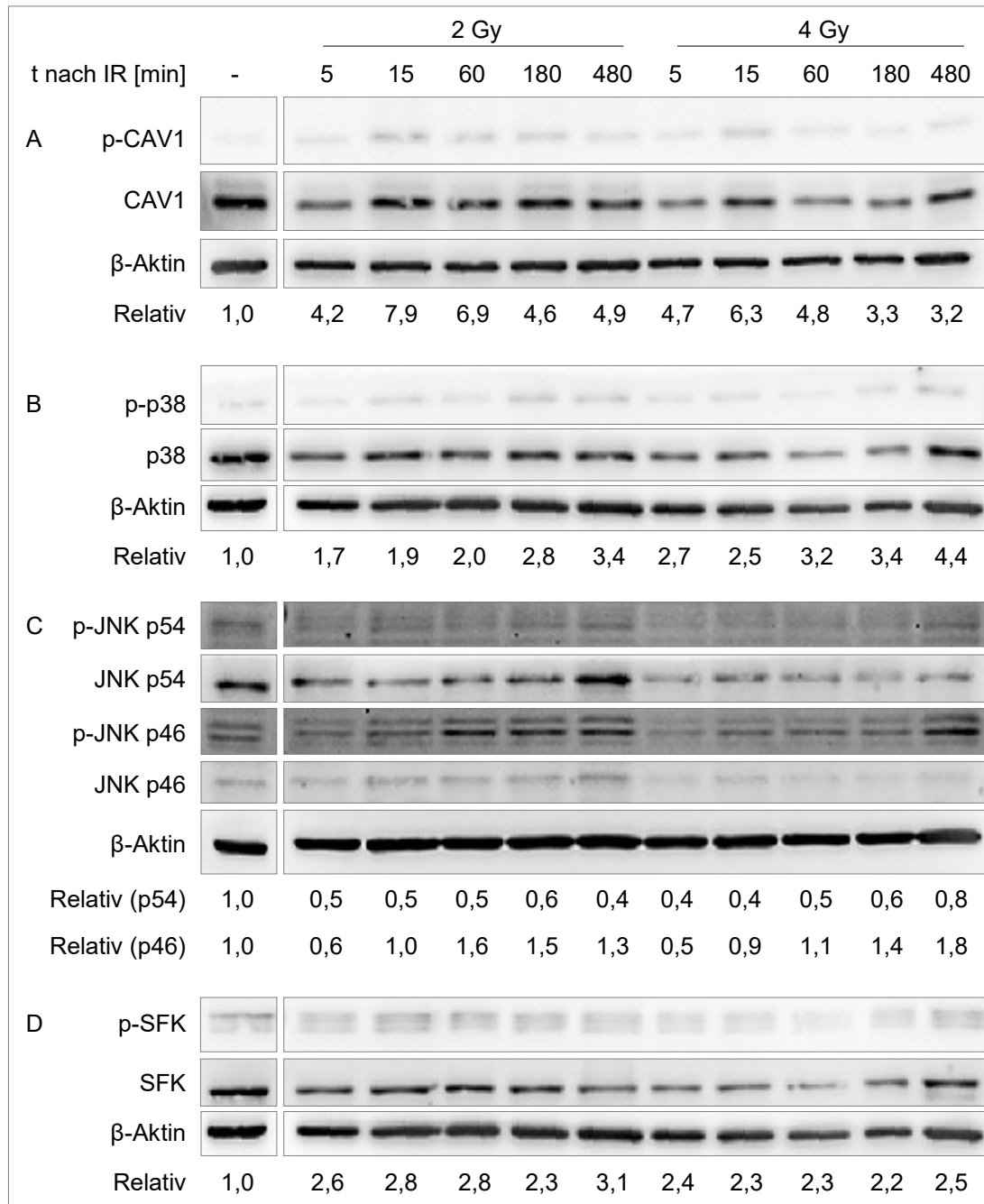
#### 4.4.4 Minderung der bestrahlungsinduzierten Phosphorylierung von CAV1 durch spezifische Inhibition von p38 und SFK

Um zu prüfen ob die Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 durch ionisierende Bestrahlung induziert werden kann, wurden TK6-CAV1 Zellen mit 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt und Zelllysate zwischen 5 min und 8 h nach Bestrahlung analysiert (Abb. 32A). Kontrolle und Proben wurden auf dasselbe Gel geladen; für eine saubere Trennung der Kontrolle von den bestrahlten Proben wurde in die Geltasche eine Leerspur geladen, die für die Abbildung entfernt wurde.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle induzierten beide Bestrahlungsdosen eine maximal 6- bis 8-fache Zunahme der Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 innerhalb von 15 min (2 Gy: 7,9-fach;  $p = 0,01$  // 4 Gy: 6,3-fach;  $p = 0,002$ ), was vergleichbar war mit der Behandlung mit 5 mM  $H_2O_2$  für 20 min (p-CAV1: 8-3-fach;  $p = 0,0003$ ). Bis 8 h nach IR blieb p-CAV1 3- bis 5-fach erhöht (2 Gy: 4,9-fach;  $p = 0,03$  // 4 Gy: 3,2-fach;  $p = 0,02$ ).

Um zu untersuchen, ob bei der Strahlenantwort auf molekularer Ebene ähnliche Signalkinasen aktiviert werden wie durch  $H_2O_2$ , wurden die Zelllysate ebenfalls auf die Aktivierung von JNK, p38 und SFK analysiert (Abb. 32B-D). Hier konnte eine deutliche und für alle Zeitpunkte vergleichbare Phosphorylierung von SFK gezeigt werden (2,3- bis 3,1-fach; alle  $p \leq 0,05$ ), während die Phosphorylierung von p38 zeit- und dosisabhängige zunahm, sodass zum letzten Zeitpunkt (8 h) die höchste Phosphorylierung erreicht war (2 Gy: 3,4-fach;  $p = 0,006$  // 4 Gy: 4,9-fach;  $p = 0,004$ ). Die Phosphorylierung von JNK zeigte einen gänzlich anderen Phosphorylierungsverlauf. Das Signal nahm kurz nach Bestrahlung zunächst um etwa die Hälfte ab (2 Gy, 5 min, p54 JNK: 0,5-fach;  $p = 0,0001$  // 4 Gy, 5 min, p54 JNK: 0,4-fach;  $p = 0,0007$  // 2 Gy, 5 min, p46 JNK: 0,6-fach;  $p = 0,03$  // 4 Gy, 5 min, p46 JNK: 0,5-fach;  $p = 0,005$ ). Im zeitlichen Verlauf stieg die Phosphorylierung von p46 JNK dann leicht über die Kontrolle hinaus (2 Gy, 1 h: 1,6-fach;  $p = 0,04$  // 4 Gy 8 h: 1,8-fach;  $p = 0,01$ ), während p54 JNK weiterhin niedrig blieb (Max. 2 Gy 4 h: 0,6-fach;  $p = 0,007$  // Max 4 Gy 8 h: 0,8-fach;  $p = 0,0007$ ).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass ionisierende Bestrahlung die Phosphorylierung von CAV1 und der Stresskinasen induzierte, wobei sich die Phosphorylierungsintensität der unterschiedlichen Proteine im zeitlichen Verlauf unterschied. Außerdem wurde deutlich, dass ionisierende Bestrahlung eine geringere Phosphorylierung aller Proteine induzierte als die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



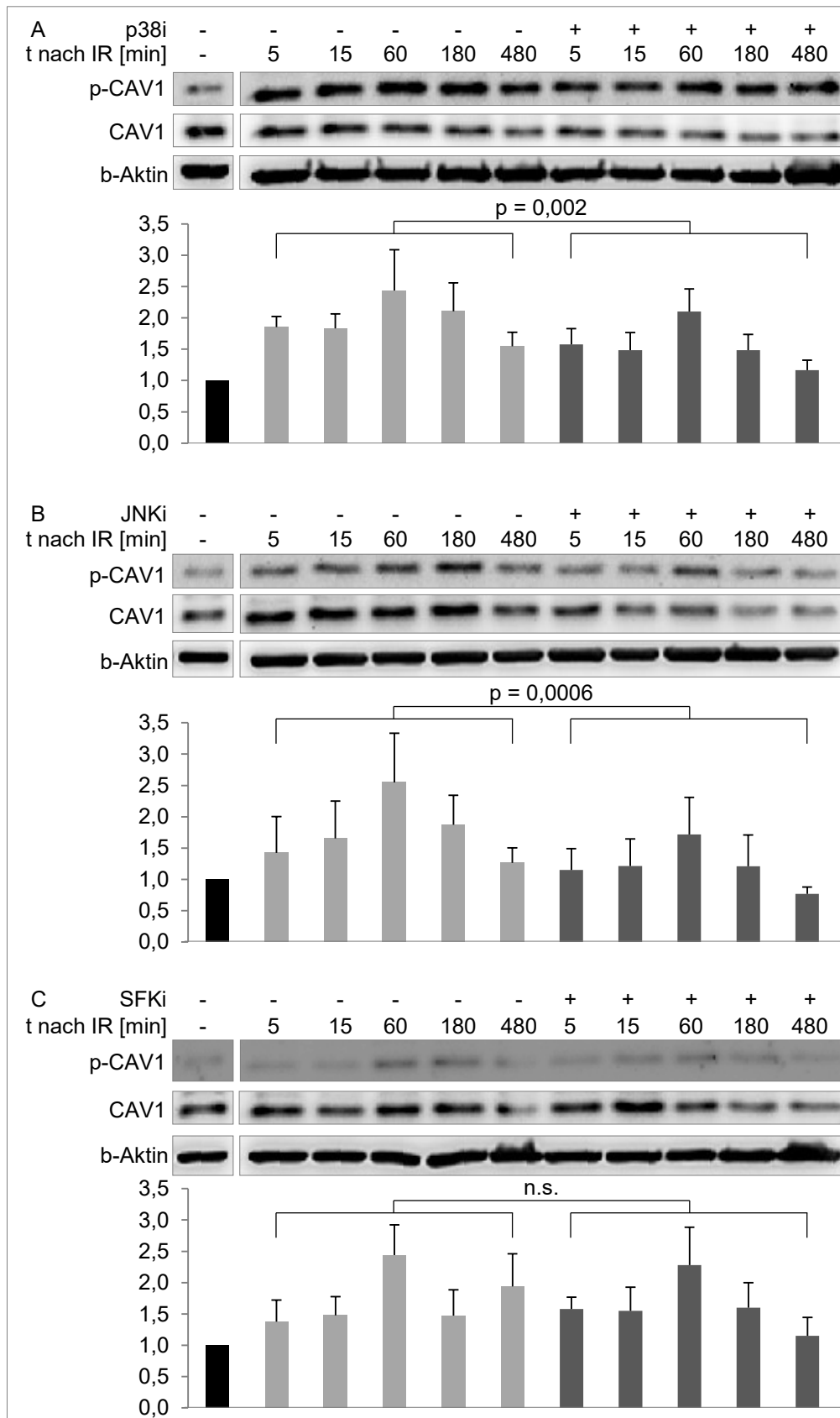
**Abb. 32: Ionisierende Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy steigerte die Phosphorylierung von CAV1, p38, JNK p54/p46 und SFK.** Zelllysate von TK6-CAV1 wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung gesammelt und mittels Western Blot hinsichtlich Phosphorylierung von CAV1 (A), p38 (B), JNK (C) und SFK (D) untersucht. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente. Die mittlere relative Phosphorylierung wurde densitometrisch analysiert (Abb. 33) und ist

unter dem jeweiligen  $\beta$ -Aktin Blot angegeben.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung. Kontrolle und Proben wurden auf dasselbe Gel geladen und durch eine Leerspur getrennt, die für die Abbildung entfernt wurde.

Die Induktion der CAV1 Phosphorylierung nach Behandlung mit  $H_2O_2$  wurde durch die Inhibition der Kinasen p38, JNK und SFK deutlich reduziert. Um die Rolle von p38, SFK und JNK nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden TK6-CAV1 nach 1 h Inkubation mit je 10  $\mu$ M Inhibitor mit 2 Gy bestrahlt und Zelllysate zwischen 5 min und 8 h nach Bestrahlung hinsichtlich Phosphorylierung von CAV1 im Western Blot analysiert (Abb. 33). Anhand der bestrahlten Proben ohne Inhibitor wurde die CAV1-Phosphorylierungskinetik des Vorgängerversuchs bestätigt. Kontrolle und Proben wurden auf dasselbe Gel geladen; für eine saubere Trennung der Kontrolle von den bestrahlten Proben wurde in die Geltasche eine Leerspur geladen, die für die Abbildung entfernt wurde.

Nach p38-Inhibition konnte in den Versuchen für alle Zeitpunkte eine Abnahme von p-CAV1 um ca. 20 % nachgewiesen werden (Min.: 14,8 % - 5 min nach IR; Max.: 29,4 % - 4 h nach IR;  $p_{\text{gesamt}} = 0,002$ ) (Abb. 33A). Auch durch die Inhibition von JNK wurde die Phosphorylierung von CAV1 nach ionisierender Bestrahlung zu den getesteten Zeitpunkten konsistent um 30 % verringert (Min.: 19,2 % - 5 min nach IR; Max.: 39,1 % - 8 h;  $p_{\text{gesamt}} = 0,00006$ ) (Abb. 33B). Die Inhibition von SFK hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von CAV1 nach Bestrahlung (Min.: 40 %; Max.: 115 %; Mittel: 96 %;  $p_{\text{gesamt}} = 0,5$ ) (Abb. 33C).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass im Vergleich zu  $H_2O_2$  durch ionisierende Bestrahlung eine deutlich schwächere Phosphorylierung von CAV1 induziert wurde und dass die Kinasen p38 und JNK für die bestrahlungsinduzierte CAV1-Phosphorylierung eine geringere Bedeutung haben im Vergleich zur CAV1-Phosphorylierung nach  $H_2O_2$ . Die eingesetzten Kinaseinhibitoren bewirkten nur teilweise die Unterdrückung der Phosphorylierung von CAV1 in Antwort auf  $H_2O_2$  und insbesondere nach ionisierender Bestrahlung. Weiterhin konnten wir feststellen, dass SFK nach Bestrahlung keinen Effekt auf die Phosphorylierung von CAV1 hat.



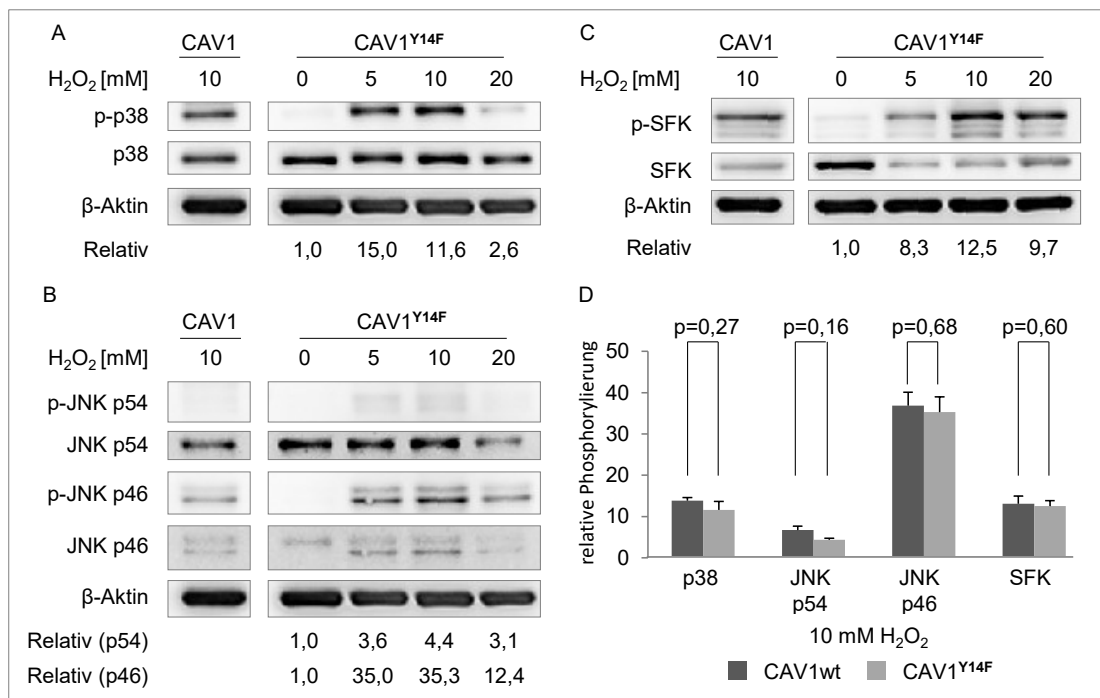
**Abb. 33: Inhibition von p38 und JNK minderte die bestrahlungsinduzierte Phosphorylierung von CAV1.** TK6-CAV1 wurden für 1 h mit 10  $\mu$ M p38 Inhibitor (p38i, SB203580), JNK Inhibitor (JNKi, SP600125), SFK Inhibitor (SFKi, SU6656) oder Vehikel vorbehandelt und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. Zellysate von den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden mittels Western Blot auf

p-CAV1, CAV1 und  $\beta$ -Aktin getestet. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für 6 unabhängige Experimente. Die mittlere relative Phosphorylierung wurde densitometrisch analysiert und ist unter dem jeweiligen  $\beta$ -Aktin Blot angegeben.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung. Kontrolle und Proben wurden auf dasselbe Gel geladen und durch eine Leerspur getrennt, die für die Abbildung entfernt wurde. Die Inhibition von p38 verringerte die Phosphorylierung von CAV1 nach Bestrahlung um 20 %, die Inhibition von JNK um 30 %, während die Inhibition von SFK keinen Einfluss auf die bestrahlungsinduzierte Phosphorylierung von CAV1 hatte. Die Graphen zeigen Mittelwert und Standardfehler der 6 unabhängigen Experimente.

#### 4.4.5 CAV1 beeinflusst nicht die Aktivität der Kinasen SFK, p38 MAPK und JNK

Da unterschiedliche Studien die gegenseitige Beeinflussung von Signalkinasen und CAV1 beschreiben, sollte an dieser Stelle untersucht werden, welcher kausale Zusammenhang zwischen Kinaseaktivierung und Phosphorylierung von CAV1 besteht. Hierzu wurde die Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3). Da für CAV1 und die untersuchten Kinasen im Bereich zwischen 5 mM und 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 20 min eine deutliche Phosphorylierung gezeigt worden war, wurde die Analyse der Phosphorylierung von CAV1, p38, JNK und SFK in TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> auf diesen Konzentrationsbereich begrenzt (Abb. 34).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war nach Behandlung von TK6-CAV1 mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p-CAV1 26-fach ( $p = 0,01$ ) (siehe 4.4.2, Abb. 29A), p-p38 13,9-fach ( $p = 0,003$ ), JNK (p54 und p46) 6,7- bzw. 37-fach ( $p = 0,03$  bzw.  $p = 0,01$ ) und SFK 13-fach erhöht ( $p = 0,02$ ). Für TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> wurde gezeigt, dass durch die Mutation von Tyr14 zu Phe wie erwartet keine Phosphorylierung durch den für p-Tyr14 spezifischen Antikörper detektiert werden konnte. Gesamt-CAV1 wurde mit einem Antikörper, der in einer Region außerhalb der (mutierten) Phosphorylierungsposition bindet, bestimmt. In TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> war die Phosphorylierung aller untersuchten Kinasen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung vergleichbar mit TK6-CAV1 (SFK:  $p = 0,60$ ; p38:  $p = 0,27$ ; JNK p54 und p46:  $p = 0,16$  bzw.  $p = 0,68$ ), sodass geschlossen werden kann, dass die Aktivierung der Kinasen unabhängig von einer Phosphorylierung von CAV1 erfolgte.



**Abb. 34: Die Phosphorylierung der Kinasen p38, JNK p54/p36 und SFK war unabhängig von der Phosphorylierung von CAV1 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung.** TK6 Zellen, die die Tyr14 defiziente CAV1-Mutante (TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>) exprimierten, wurden für 20 min mit den angegebenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen behandelt. Zelllysate wurden anschließend mittels Western Blot hinsichtlich Phosphorylierung von CAV1 (A), p38 (B), JNK (C) und SFK (D) untersucht. Zum Vergleich wurden die CAV1wt exprimierenden TK6-CAV1 gleichermaßen behandelt. E) Vergleich der Kinasephosphorylierung nach Behandlung mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>. Der Graph zeigt Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten. Die mittlere relative Phosphorylierung wurde densitometrisch analysiert und ist unter dem jeweiligen β-Aktin Blot angegeben. β-Aktin diente als Ladekontrolle und Referenzbande zur Quantifizierung.

#### 4.4.6 Funktionelle Studien zur Rolle von Tyr14

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass p38 und JNK Regulatoren der CAV1 Phosphorylierung an Tyr14 nach Bestrahlung sind. Um der funktionellen Rolle der CAV1 Phosphorylierung nachzugehen, wurde die Tyr14 defiziente CAV1 Mutante verwendet, um Proliferation, Zellkernfragmentierung und klonogenes Zellüberleben zu untersuchen.

Proliferation und Repopulierung wurde mit dem Vitalfarbstoff alamarBlue über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy analysiert (Abb. 35). Aufgrund der Vielzahl möglicher statistischer Tests war der Vergleich der Einzelzeitpunkte durch die niedrige Versuchsanzahl und die hohe Schwankung der Daten nur begrenzt aussagekräftig. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung keine Signifikanzen angegeben. Für den Vergleich der Zelllinien wurde der gesamte



Beobachtungszeitraum herangezogen. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und alle weiteren Angaben wurden relativ dazu getroffen.

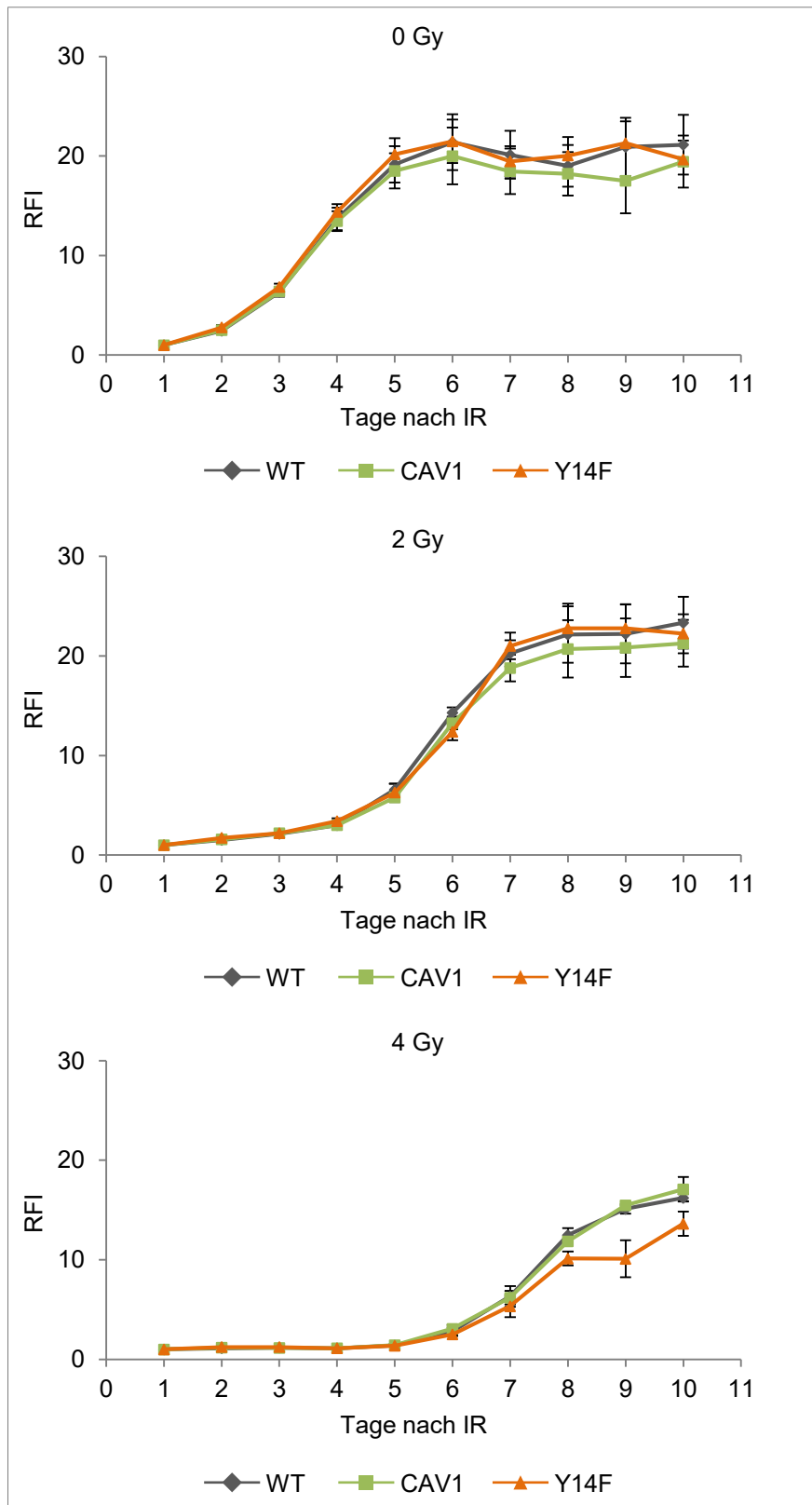
Eine dosisabhängige Minderung der RFI wurde erwartungsgemäß für alle Zelllinien beobachtet. Ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 2 Gy war die RFI von TK6wt und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> vergleichbar, während TK6-CAV1 eine niedrigere RFI über den Versuchszeitraum aufwies (0 Gy: WT vs CAV1: 14,5 vs. 13,6;  $p = 0,002$  // WT vs Y14F: 14,5 vs. 14,7;  $p = 0,65$  // CAV1 vs. Y14F: 13,6 vs. 14,7;  $p = 0,004$ . 2 Gy: WT vs CAV1: 11,7 vs. 10,8;  $p < 0,0001$  // WT vs Y14F: 11,7 vs. 11,6;  $p = 0,80$  // CAV1 vs. Y14F: 10,8 vs. 11,6;  $p = 0,01$ ). Nach Bestrahlung mit 4 Gy war die anhand der RFI bestimmte Proliferation/Repopulierung von TK6wt und TK6-CAV1 ähnlich, während die RFI von TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> niedriger lag (WT vs. CAV1: 5,9 vs. 6,0;  $p = 0,76$  // WT vs. Y14F: 5,9 vs. 4,8;  $p = 0,01$  // CAV1 vs Y14F: 6,0 vs. 4,8;  $p = 0,04$ ). Zusammengefasst war die RFI ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 2 Gy in TK6-CAV1 geringer als in den anderen beiden Zelllinien, während nach Bestrahlung mit 4 Gy die RFI von TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> am niedrigsten war.

Die frühe Proliferation zwischen 24 h und 72 h nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 1 Gy und 6 Gy wurde mittels MTT-Assay bestimmt (Abb. 36). Aufgrund der Vielzahl möglicher statistischer Tests war der Vergleich der Einzelzeitpunkte durch die niedrige Versuchsanzahl und die hohe Schwankung der Daten nur begrenzt aussagekräftig. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung keine Signifikanzen angegeben. Die relative Absorption unbestrahlter Zellen wurde mit 100 % angesetzt und alle weiteren Angaben wurden relativ dazu getroffen. Für den Vergleich der Zelllinien wurde der gesamte Dosisbereich von 1 Gy bis 6 Gy herangezogen. Erwartungsgemäß nahm die Absorption durch Bestrahlung ab, wobei 24 h nach Bestrahlung die Absorption von TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> signifikant höher war als in TK6wt und TK6-CAV1 (WT vs. CAV1: 50,1 vs. 46,6;  $p = 0,2$  // WT vs. Y14F: 50,1 vs. 57,4;  $p = 0,006$  // CAV1 vs. Y14F: 46,6 vs. 57,4;  $p = 0,01$ ). Nach 48 h war die Absorption von TK6-CAV1 signifikant niedriger als von TK6wt und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> (WT vs. CAV1: 35,0 vs. 26,3;  $p < 0,00001$ ; WT vs. Y14F: 35,0 vs. 36,9;  $p = 0,4$  // CAV1 vs. Y14F: 26,3 vs. 36,9;  $p = 0,002$ ). Diese Beobachtung war als Tendenz auch 72 h nach Bestrahlung zu beobachten, allerdings waren die Unterschiede zwischen TK6-CAV1 und den anderen beiden Zelllinien nicht signifikant (WT vs. CAV1: 51,4 vs. 46,7;  $p = 0,057$ ; WT vs. Y14F: 51,4 vs. 54,5;  $p = 0,4$  // CAV1 vs. Y14F: 46,7 vs. 54,5;  $p = 0,08$ ). Insgesamt wurde über den Versuchszeitraum von 72 h beobachtet, dass zunächst TK-CAV1 im Vergleich zu TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>

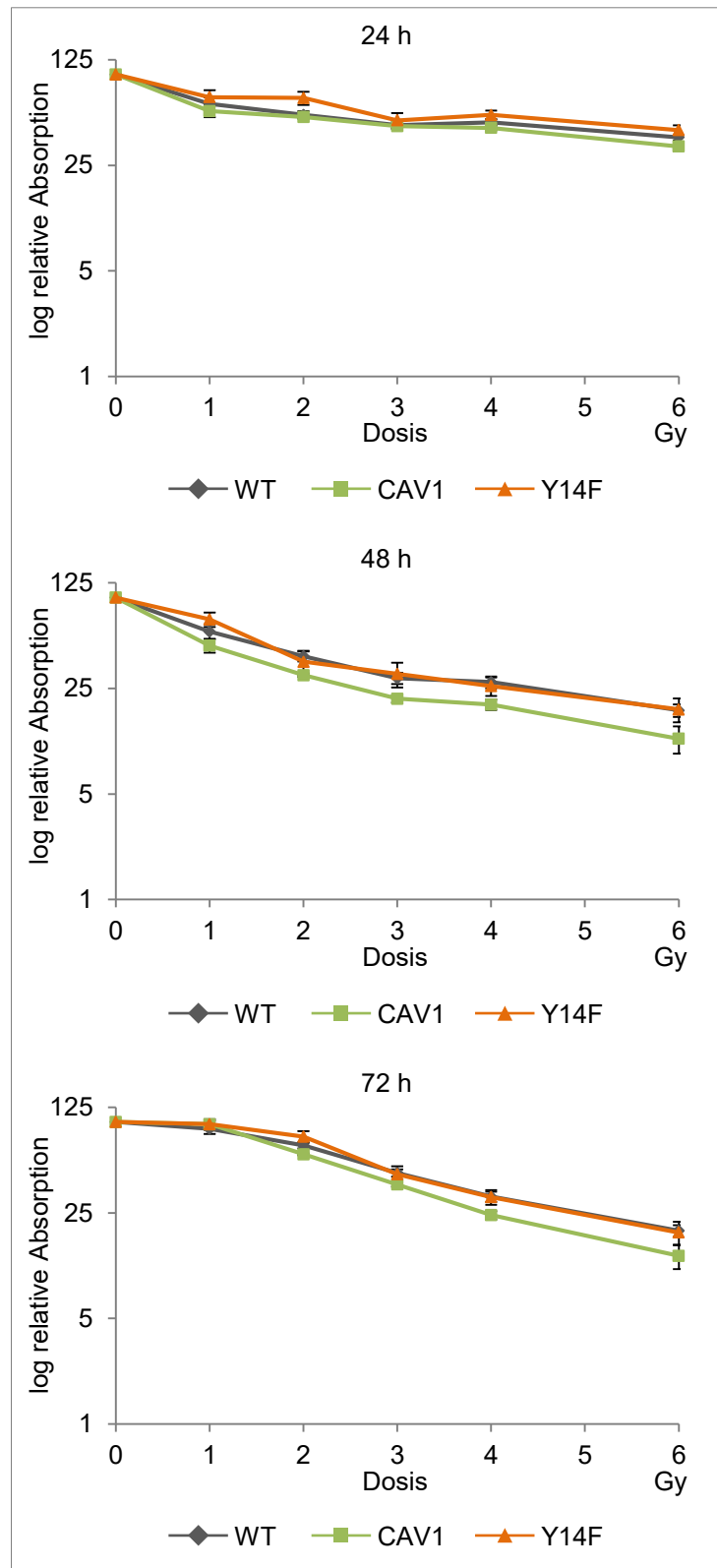
das schlechtere Überleben nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy aufwiesen, was gegen die Hypothese eines besseren Überlebens von CAV1-positiven Zellen auf Grund der Phosphorylierungsposition Tyr14 spricht. Die Daten des MTT-Assays decken sich allerdings nicht vollständig mit den Ergebnissen des alamarBlue-Assays. Im alamarBlue-Assay wurde zwar für 10 Tage ohne und nach Bestrahlung mit 2 Gy eine niedrigere RFI für TK6-CAV1 gefunden, allerdings war nach 4 Gy die Absorption von TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> am niedrigsten.

Um festzustellen, ob Tyr14 relevant für die bestrahlungsinduzierte Apoptose ist, wurden TK6 Zellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und nach Färbung der Zellen mit Hoechst 33342 wurde der Anteil fraktionierter Zellkerne bestimmt (Abb. 37). Erwartungsgemäß stieg der Anteil apoptotischer Zellen nach Bestrahlung an (24 h: 2- bis 4-fach; 48 h: 6- bis 8-fach). Im Zelllinienvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien.

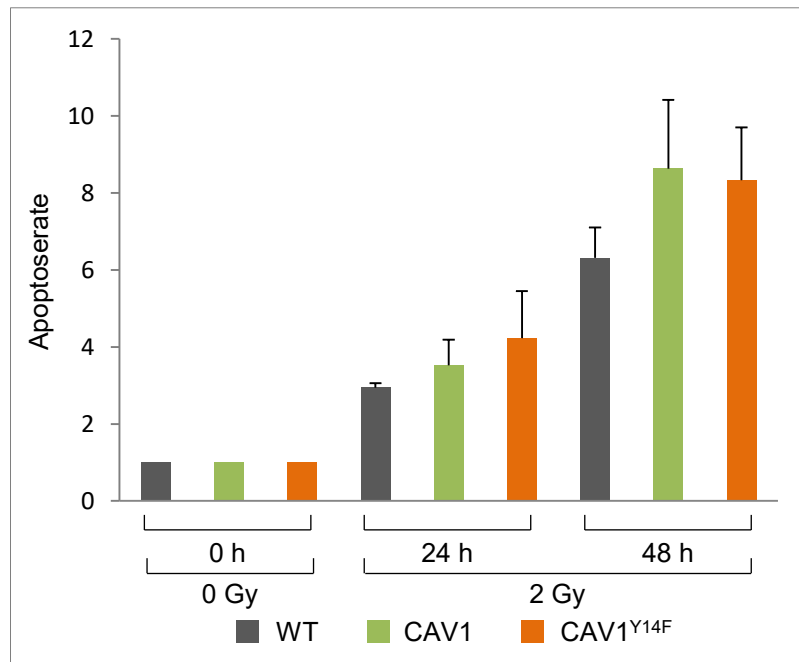
Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy wurde mittels Koloniebildungstest im 96-*well* Plattenformat analysiert. An Tag 14 nach Bestrahlung wurden Vertiefungen ohne Kolonie gezählt und die Überlebensfraktion berechnet. Unabhängig von der verwendeten Bestrahlungsdosis wurde kein Unterschied im klonogenen Zellüberleben zwischen den Zelllinien TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> gefunden (Abb. 38).



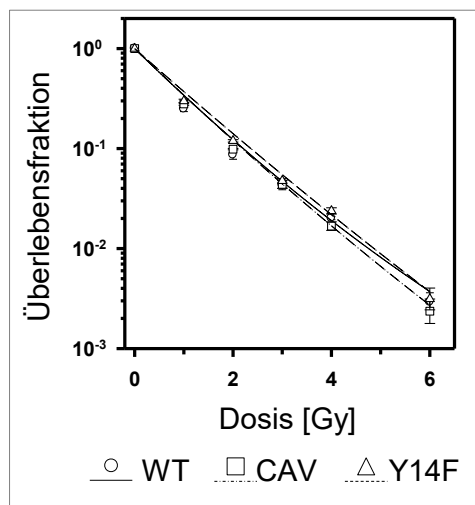
**Abb. 35: Messung von Zellproliferation und Repopulierung über einen Zeitraum von 10 Tagen in TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy.** TK6 Zellen wurden direkt nach Aussaat bestrahlt. Die Inkubation mit alamarBlue für 24 h wurde für jeden Messtag durchgeführt und die Fluoreszenz direkt nach Zugabe und 24 h nach Zugabe ermittelt. Messtag 1 diente der Normalisierung. Die Kurven zeigen Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten.



**Abb. 36: Analyse des Zellüberlebens von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy – 6 Gy.** Direkt nach Aussaat wurden die TK6 Zellen bestrahlt. Nach Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h wurden die Zellen mit MTT für 4 h inkubiert und anschließend lysiert. Die Absorption wurde am folgenden Morgen gemessen. Die Kurven zeigen Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten.



**Abb. 37: Hoechst-Färbung der Zellkerne von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> Zellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.** Die relativen Apoptoseraten wurden 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy durch Zählung von unfragmentierten und fragmentierten Zellkernen bestimmt. Säulen stellen Mittelwerte dar; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. n = 3.



**Abb. 38: Berechnung der Überlebensfraktion von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 1 Gy und 6 Gy.** TK6 Zellen wurden direkt nach Aussaat bestrahlt und 14 Tage später die Anzahl wells ohne Zellkolonie bestimmt. Die Kurven zeigen Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten.

## 5 DISKUSSION

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 lymphoblastoiden TK6-Zellmodell fortgesetzt, indem untersucht wurde, ob die gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 im Vergleich zur jeweiligen einzelnen Überexpression eine Verbesserung des Zellüberlebens nach Bestrahlung bewirkt. Dazu wurden Proliferation, Apoptose und klonogenes Überleben betrachtet. 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.

### 5.1 Etablierung der Zellmodelle

#### 5.1.1 TK6-MDR1-EGFP, TK6-CAV1-RFP und TK6-MDR1-EGFP-CAV1-RFP

Die Zelllinie TK6-MDR1-EGFP wurde erfolgreich etabliert und sollte mit CAV1-RFP transduziert werden zur Etablierung von TK6-MDR1-EGFP-CAV1-RFP. Ein Nachteil der Kombination MDR1-EGFP ist, dass die Kontrolle der Funktionalität von MDR1 mit dem grün leuchtenden Farbstoff Rhodamin123 auf Grund der Expression von EGFP nicht möglich ist. Die Verwendung einer im gelben Kanal leuchtenden Alternative war nicht erfolgreich, da sich grüner und gelber Kanal nicht vollständig voneinander abgrenzen ließen (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde in der Zelllinie TK6-MDR1-EGFP eine rote Fluoreszenz beobachtet, sodass von der Verwendung von TK6-MDR1-EGFP-CAV1-RFP abgesehen wurde, da keine visuelle Unterscheidung der Transgene möglich gewesen wäre. Um dennoch die Lokalisation von CAV1 und MDR1 bei gleichzeitiger Überexpression zu untersuchen, wurde die Zelllinie TK6-CAV1 mit MDR1 transduziert, um TK6-CAV1-MDR1 herzustellen. Ein klarer Vorteil dieser Zelllinie ist, dass weder CAV1 noch MDR1 mit einem potentiell störenden Fluoreszenz-Tag versehen sind <sup>198</sup>.

### 5.1.2 TK6-CAV1-MDR1

Nach Transduktion von TK6-CAV1 mit MDR1 zu TK6-CAV1-MDR1 wurde die Expression von CAV1 und MDR1 mittels Western Blot nachgewiesen. TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 wurden vor Einsatz mit Vincristin selektiert, um eine zu mind. 95 % MDR1-positive Zellpopulation zu erhalten. So war gewährleistet, dass in den Zelllinien TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 durch die Vergleichbarkeit der Expression von CAV1 und MDR1 auch die darauf basierenden Daten vergleichbar waren. Die vergleichbare Funktionalität von MDR1 wurde mittels Rhodamin123-Assay bestätigt.

### 5.1.3 TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>

Die Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> wurde durch Transduktion von TK6wt mit einer an Tyr14 mutierten, nicht phosphorylierbaren Variante von CAV1 hergestellt. Die Zwischenstufe TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP diente der unkomplizierten Unterscheidung transduzierter und nicht transduzierter Zellen und erforderte eine hohe EGFP-Reinheit, denn alle nach Sortierung vorhandenen EGFP-negativen, d. h. CAV1<sup>Y14F</sup> negativen, Zellen würden nach Exzision von EGFP einen Anteil der Endpopulation darstellen, ohne tatsächlich transduziert zu sein. Die FACS-Daten zeigten, dass in der sortierten TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>-IRES-EGFP-Population 0,6 % der Zellen untransduziert waren, und dass der Anteil EGFP-negativer Zellen nach EGFP-Exzision 39,7 % betrug. Demnach stieg der Anteil initial untransduzierter TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> auf 1,5 % an, was im Akzeptanzbereich (> 95 % Populationsreinheit) lag. Das Ausbleiben der Reaktivität des Tyr14-spezifischen phospho-CAV1-Antikörpers nach Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte die erfolgreiche Eliminierung der Phosphorylierungsstelle Tyr14.

## 5.2 Bedeutung der gleichzeitigen Expression von CAV1 und MDR1 für die Strahlenantwort

### 5.2.1 Proliferations- und Apoptosestudien

In Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe war die Überexpression von MDR1 im TK6 Zellmodell mit einer Verbesserung des klonogenen Überlebens assoziiert, und CAV1 steigerte die Proliferation/Repopulierung nach Bestrahlung<sup>68-70</sup>. Auf dieser Grundlage erschien die gleichzeitige Expression von CAV1 und MDR1 als geeignete Kombination um eine weitere Verbesserung des Zellüberlebens nach Bestrahlung zu erreichen unter Voraussetzung additiver oder synergistischer Effekte auf Basis einer Interaktion und/oder gegenseitigen Beeinflussung von CAV1 und MDR1.

Die Spaltung von Caspasen als Mechanismus der Apoptoseinduktion wird auch durch Bestrahlung ausgelöst. Obwohl sie bisher vornehmlich durch den intrinsischen Weg und Caspase 9 beschrieben wurde, zeigten unterschiedliche Studien u. a. in HeLa- und H460-Zellen die Relevanz des extrinsischen Wegs und der Spaltung von Caspase 8 nach Bestrahlung auf <sup>35, 36, 38, 199</sup>. In dieser Arbeit wurde folglich auch die Strahlenantwort hinsichtlich der Spaltung von Caspase 8 in TK6 Zellen bei gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 untersucht und mit den jeweiligen Einzelexpressions-Zelllinien verglichen.

#### *Strahlenantwort von TK6-MDR1*

Im Langzeit-Proliferationsassay mit alamarBlue wiesen TK6-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy das höchste Überleben auf, während die Proliferationsrate von TK6-CAV1 signifikant niedriger lag. In Übereinstimmung wurde im Kurzzeit-Proliferationsassay mit MTT in TK6-MDR1 bis 48 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy ein leichter Proliferationsvorteil im Vergleich zu TK6wt beobachtet, während TK6-CAV1 eine geringere Proliferation aufwies. Bezüglich der Zellkernfragmentierung als Apoptosenachweis zeigte sich die schwache Tendenz einer geringeren Apoptoserate von TK6wt und TK-MDR1 im Vergleich zu TK6-CAV1. Insgesamt konnte die radioprotektive Wirkung von MDR1 im Sinne eines Proliferationsvorteils bestätigt werden, der jedoch ohne Auswirkung auf die Apoptoserate und klonogenes Überleben blieb.

Da trotz des Proliferationsvorteils von TK6-MDR1 bzw. Proliferationsnachteils in TK6-CAV1 hinsichtlich der Apoptoserate kein signifikanter Unterschied nachweisbar war, war die Erwartung an einen deutlichen Effekt von CAV1 und MDR1 auf die Spaltung von Caspase 8 gering, schloss deren Beteiligung in der Strahlenantwort jedoch nicht aus. Zunächst wurde für TK6wt und ihre Derivate TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 die Spaltung von Caspase 8 nach Bestrahlung bestätigt. In Übereinstimmung mit den Daten zur Proliferation wurde in dieser Arbeit für TK6-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy eine im Vergleich zu TK6wt niedrigere Spaltung von Caspase 8 beobachtet. Außerdem wurde anhand des Spaltprodukts p41/43 in der Zelllinie mit kombinierter Expression von CAV1 und MDR1 weniger Caspase 8 Spaltung beobachtet als in TK6wt und TK6-CAV1. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich p41/43 waren gering, der Unterschied zwischen TK6-CAV1 und TK6-MDR1 jedoch war signifikant. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf einen Effekt von MDR1 auf die Apoptoseresistenz hin und unterstützt die Hypothese eines Schutzes vor bestrahlungsinduzierter Apoptose, vermittelt durch eine geringere Spaltung von Caspase 8.



Daten bezüglich der Spaltung von BID, einem Substrat von Caspase 8, und die Relevanz der Expression von CAV1 und MDR1 für die Spaltung von BID, stehen derzeit noch aus.

Studien innerhalb der Arbeitsgruppe bezüglich der durch MDR1-vermittelten Radioprotektion zeigten, dass der PI3K-AKT-Überlebenssignalweg keine Rolle für die Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von MDR spielt, und dass die beobachtete Herunterregulation des anti-apoptotischen BCL-2 nach Bestrahlung nicht von MDR1 moduliert wurde<sup>190</sup>. Für die durch MDR1 vermittelte Apoptoseresistenz gegenüber Chemotherapeutika wurde ein ATPase-unabhängiger Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Aktivierung von Caspase 3 und 7 und eine gesteigerte Freisetzung von Cytochrom c vordergründig waren<sup>79</sup>. Als Alternative wurde ein ATP-abhängiger Mechanismus aufgezeigt, bei dem MDR1 unter ATP-Bindung die FAS-abhängige Aktivierung der Caspase 8 inhibierte<sup>78</sup>. Eine FAS-abhängige Apoptose nach Bestrahlung wurde auch in HeLa-Zellen beobachtet, wobei die spezifische Inhibition von JNK die FAS-Transkription reduzierte und so die Apoptosekaskade blockierte<sup>36</sup>. Eine ähnliche Relevanz der Stresskinasen fand man u. a. in U937 Zellen, bei denen die bestrahlungsinduzierte Apoptose über die Aktivierung von p38 und JNK verlief<sup>200-202</sup>. So wurde beobachtet, dass p-JNK und p-p38 das pro-apoptotische BAX aktivieren und so seine Translokation in die Mitochondrien hervorrufen konnten, wodurch die Apoptosekaskade in Gang gesetzt wurde<sup>203</sup>. Bezüglich Apoptose ist neben BAX auch p53 ein Zielprotein von p-JNK<sup>36, 204</sup>. Insbesondere in TK6-Zellen wird bestrahlungsinduzierte Apoptose durch p53 vermittelt<sup>79, 205, 206</sup>. Interessant wäre zu klären, ob die spezifische Inhibition der untersuchten Kinasen in bestrahlten TK6 einen Einfluss auf die Apoptosekaskade hat, und ob diese Kinaseinhibition für Unterschiede bezüglich der Apoptoseantwort zwischen den TK6-Derivaten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, relevant wäre.

Eine Inhibition der FAS-abhängigen Aktivierung von Caspase 8 wäre auch durch eine sich auf den DISC auswirkende Konformationsänderung von MDR1 denkbar. Eine Mediatorfunktion könnte von Ezrin ausgehen, das sowohl mit FAS als auch mit MDR1 assoziiert ist und einen Bestandteil des DISC darstellt<sup>207, 208</sup>. Weiterhin könnte MDR1, das den Transport von *lipid raft* Komponenten (Sphingolipide, Cholesterol) und die Internalisierung von FAS-Clustern in *lipid rafts* reguliert, Apoptosesignale unterhalb der *lipid raft*/DISC-Bildung stören<sup>209-211</sup>. Denkbar ist auch, dass MDR1 eine

radioprotektive Funktion durch eine direkte Interaktion mit CAV1 ausübt, möglicherweise auch in Abhängigkeit von der Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14<sup>172, 212</sup>.

#### *Strahlenantwort von TK6-CAV1*

CAV1 wurde in der vorliegenden Arbeit tendenziell als pro-apoptotischer Faktor identifiziert, der die Zellen gegenüber ionisierender Strahlung sensibilisierte und so eine Minderung der Proliferationsfähigkeit und eine marginale Steigerung der Apoptoserate induzierte. Auch in publizierten Arbeiten wird eine pro-apoptotische Rolle von CAV1 in Normalzellen diskutiert<sup>94, 95, 213, 214</sup>. Widersprüche der hier erhobenen Daten der Zelllinie TK6-CAV1 zu Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe<sup>70, 180</sup> werden separat in Abschnitt 5.2.3 diskutiert.

In Einklang mit den Daten zur Proliferation nach Bestrahlung (siehe 4.2.1 und 4.2.2) wurde eine tendenziell höhere Spaltung von Caspase 8 in TK6-CAV1 als in TK6wt beobachtet, was vom erwarteten Ergebnis abweicht und in Abschnitt 5.2.3 diskutiert wird. Die Expression von CAV1 schien die Spaltung von Caspase 8 zu begünstigen und so möglicherweise zu einer niedrigeren Proliferationsrate beizutragen. Eine weitere Beobachtung war, dass bei TK6-CAV1 bereits ab 36 h nach Bestrahlung die Menge der Caspase 8 Spaltung mehr als die Hälfte der maximal erreichten Spaltung von Caspase 8 betrug. Zusätzlich erreichten TK6-CAV1 die maximal festgestellte Rate an gespaltener Caspase 8 72 h nach Bestrahlung, während es bei den anderen Zelllinien nach 60 h war. Dies zeigt, dass bei TK6-CAV1 das Apoptose-Signal frühzeitiger ausgelöst wird und länger anhält, sodass weniger Zellen in diesem Zeitraum überleben. Dies könnte einen Beitrag zur leicht erhöhten Apoptoserate leisten, die in TK6-CAV1 mittels Kernfärbung gezeigt wurde. Eine Caspase 8 abhängige Apoptose nach Bestrahlung wurde auch in Pankreastumorzellen beobachtet, wobei CAV1 die Rolle eines Schutzfaktors vor Caspase-Aktivierung nach Bestrahlung einnahm. Interessant war, dass sich dabei die Caspase-Aktivierung nicht auf das Gesamtüberleben oder das klonogene Überleben auswirkte<sup>149</sup>. Dass Apoptose-Signalwege nicht unbedingt das Zellüberleben nach Bestrahlung beeinflussen, zeigt auch die vorliegende Arbeit.

Die Interaktion von CAV1 mit FAS unterstützt die pro-apoptotische Rolle von CAV1. So zeigten Zhang et al. in A549 Zellen, dass das Antioxidant Resveratrol eine Komplexbildung von FAS und CAV1 ausgelöst hatte, und dass der *knockdown* von CAV1 mit einer Abnahme der Spaltung von Caspase 8 und Caspase 3 nach Resveratrol-Behandlung verbunden war. FAS könnte ein interessanter Link zwischen den potentiell interagierenden Proteinen CAV1 und MDR1 sein. Trotz der Apoptoseunterdrückung

wurde keine Zunahme der Proliferation durch den *knockdown* von CAV1 beobachtet, was wiederum zeigt, dass eine Änderung des Apoptose-Signalwegs allein nicht für die Modulation der Zellproliferation entscheidend war <sup>212</sup>.

In mit Hyperoxie stimulierten Beas2B-Zellen wurde FLOT-2 als Gegenspieler von CAV1 bei der Apoptoseinduktion identifiziert. FLOT-2 verhinderte in Folge der Stimulation die DISC-Bildung und FAS/CAV1-Komplexbildung und somit das Apoptose-Signaling. Oxidativer Stress induzierte eine Abnahme von FLOT-2, wodurch die Apoptosekaskade initiiert wurde. Ein vorgeschlagener Mechanismus war, dass die Verteilung von CAV1 und FLOT-2 in den unterschiedlichen Membransubstrukturen (z. B. planare/caveoläre *lipid rafts*) einen Beitrag zur Apoptoseregulation leisten könnte <sup>97</sup>.

Weitere Studien an der Zelllinie zeigten, dass unter Hypoxie der Autophagie-Marker LC3B involviert war, der mit FAS unter CAV1-Beteiligung interagierte und so die Apoptosekaskade regulierte. Für die gemeinsame Interaktion war die Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 essentiell <sup>215</sup>, was in einer anderen Studie anhand der reduzierten Spaltung von t-BID und Steigerung des Zellüberlebens nach Expression der CAV1-Mutante Y14F bestätigt wurde <sup>216</sup>. Die Relevanz der Tyr14 Phosphorylierung von CAV1 für Apoptose wurde auch in MCF-7 Zellen gezeigt, in denen nach apoptotischer Stimulation mit Paclitaxel u. a. weniger Apoptose in den Tyr14-defizienten MCF-7-CAV1<sup>Y14F</sup> Zellen als in MCF-7-CAV1wt Kontrollzellen gezeigt wurde <sup>217</sup>. Kürzlich wurde Lysin 176 als weitere Position von CAV1 identifiziert, für die eine Rolle beim Zellüberleben gefunden wurde: Die Mutation von Lysin zu Arginin reduzierte die Oligomerisierung von CAV1 und förderte durch direkte Interaktion die MDR1-Transportaktivität, sodass die CAV1<sup>L176A</sup>-Zellen toleranter gegenüber Doxorubicin, Cisplatin und Docetaxel waren <sup>218</sup>. Eine interessante, bisher ungeklärte Fragestellung wäre der Effekt dieser Mutation in bestrahlten TK6-CAV1<sup>L176A</sup> Zellen.

#### *Strahlenantwort in TK6-CAV1-MDR1*

Insgesamt wurde in dieser Arbeit vorwiegend eine pro-apoptotische Wirkung von CAV1 und eine radioprotektive Tendenz im Sinne eines Proliferationsvorteils durch MDR1 beobachtet. Die Kombinationszelllinie TK6-CAV1-MDR1 wies eine mit TK6wt vergleichbare Caspase 8 Spaltung auf, die höher als in TK6-MDR1 und niedriger als in TK6-CAV1 war. Denkbar ist, dass das Wechselspiel der Signalwege, die durch CAV1 und MDR1 ausgelöst werden, sich gegenseitig beeinflussen, sodass MDR1 den pro-apoptotischen Effekt von CAV1 in Richtung anti-apoptotisch verschiebt. Dies würde auch in Einklang mit den Daten zur Proliferationsfähigkeit und Apoptoserate

stehen, die zwar statistisch nicht signifikant war, jedoch eine Tendenz zur gesteigerten Apoptose von TK6-CAV1 andeuten, die von TK6-CAV1-MDR1 zu TK6-MDR1 abnahm.

Abweichend von den beschriebenen Beobachtungen wies die Kombinationszelllinie TK6-CAV1-MDR1 bezüglich des p18-Spaltfragments die höchste Spaltung auf. Die absoluten Messsignale waren jedoch sehr niedrig, wodurch das Signal nur unzureichend vom Hintergrund trennbar war und die berechnete relative Expression mit einer größeren Unsicherheit behaftet ist. Daher stützt sich die Diskussion auf die robusteren Daten der Bildung des p41/43 Spaltfragments. Eine Alternative zur semi-quantitativen Analyse von Western Blots sind funktionsbasierte Assays, bei denen die Bildung eines Spaltprodukts über Fluoreszenz gemessen wird und die sowohl Vorteile (hohe Sensitivität, quantitative Aussage) als auch Nachteile (Kosten) mit sich bringen.

Insgesamt war der postulierte pro-apoptotische Effekt von CAV1 in dieser Arbeit nicht so ausgeprägt, dass eine synergistische oder additive Wirkung von CAV1 und MDR1 zusammen zu einer Verbesserung der Radioprotektion führte. Auf Grund der pro-apoptotischen Wirkung von CAV1 erscheint eine Steigerung der Radioprotektion durch gleichzeitige Überexpression mit MDR1 nicht aussichtsreich. Eine Klärung der neu gefundenen Rolle von CAV1 bei der Strahlensensibilisierung ist der erforderliche nächste Schritt, um weitere Studien zur Radioprotektion zu betreiben.

### 5.2.2 Alternative Zelltodwege zur bestrahlungsinduzierten Apoptose

Neben Apoptose induziert Bestrahlung auch andere Formen des Zelltods, wie mitotische Katastrophe, Seneszenz, Nekrose oder Autophagie. Möglicherweise ist die beobachtete Änderung der Proliferationsrate nach Bestrahlung zumindest teilweise auf einen der alternativen Zelltodwege zurückzuführen<sup>219</sup>. Hierfür spricht, dass auch in TK6 häufig ein Effekt auf Proliferation und Apoptose-Signalwege gezeigt werden konnte, ohne dass dies bedeutsame Auswirkungen auf das Maß fragmentierter Zellkerne oder klonogenes Überleben hatte. So führte die Überexpression der Redox-Systemkomponente MnSOD zur Minderung der Apoptose nach Bestrahlung, ohne dass das klonogene Überleben anstieg<sup>220</sup>. Der radioprotektive Effekt war dabei abhängig von der verwendeten Zelllinie: während die Transduktion von HeLa-RC Zellen mit MnSOD und Cu-Zn-SOD keine Auswirkung auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung hatte<sup>221</sup>, wurde ein radioprotektiver Effekt in humanen primären Lungenfibroblasten nach Bestrahlung nachgewiesen<sup>66</sup>.

Weiterhin kann Bestrahlung den apoptotischen Zelltod während der Interphase induzieren, vor allem in Zellen hematopoetischen Ursprungs. Zellen mit G1- oder G2-

Arrest können über mitotische Katastrophe sterben, wenn sie ohne DNA-Reparatur im Zellzyklus voranschreiten. Der vorzeitige Wiedereintritt in den Zellzyklus ist eine Voraussetzung für die mitotische Katastrophe, die zum Zelltod führt oder als Vorstufe von Apoptose auftritt<sup>23, 24</sup>. Als Resultat mitotischer Katastrophe entstehen Riesenzellen, die bis zu 200-mal größer sein können als ursprünglich<sup>23</sup>. Eine geringe Zunahme des Zellvolumens nach Bestrahlung von TK6-CAV1-MDR1 wurde auch in dieser Arbeit am Rande beobachtet, allerdings nicht intensiv analysiert. Möglicherweise unterscheiden sich TK6-CAV1 und TK6-MDR1 hinsichtlich mitotischer Katastrophe, was die unterschiedlichen Proliferationsraten nach Bestrahlung erklären könnte. Beispielsweise induzierte ionisierende Bestrahlung in 92-1 Zellen den direkten Übergang von der G2- zur G1-Phase ohne Mitose, was Seneszenz induzierte<sup>222</sup> und ebenfalls zur Minderung der Proliferation beitragen könnte. In CAV1-exprimierenden Fibroblasten wurde Seneszenz durch Stimulation mit oxidativem Stress in einem p53-abhängigen Prozess induziert<sup>223</sup>. Studien zur Erforschung dieser Zelltodwege nach Bestrahlung und einer möglichen Unterscheidung von TK6-CAV1 und TK6-MDR hinsichtlich der Zelltodpräferenz sind erforderlich, um ein differenziertes Bild der bestrahlungsinduzierten Zelltodmechanismen zu erhalten.

### 5.2.3 Fehlende Reproduzierbarkeit zu ehemaligen Studien

Die Erkenntnisse dieser Arbeit deuten in Teilen in eine andere Richtung als Daten, die vor mehreren Jahren im Rahmen von Forschungsarbeiten und einer Dissertation erhoben wurden<sup>68-70, 180</sup>. Vor allem aus Zeitgründen konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, warum der damals beobachtete Proliferationsvorteil (TK6-CAV1) bzw. das klonogene Überleben (TK6-MDR1) nach Bestrahlung in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt wurden. Da beide Zelllinien (TK6-CAV1 und TK6-MDR1) betroffen sind, könnte eine gemeinsame Ursache zugrunde liegen. Eine plausible Erklärung wäre, dass sich die Expressionsstärke von CAV1 und/oder MDR1 über die Jahre verändert hat und/oder von den Kulturbedingungen abhängig ist. Denkbar ist auch, dass die verwendeten Testmethoden nicht so robust gegenüber geringfügigen Änderungen der experimentellen Bedingungen sind.

Weiterhin könnten Änderungen bei der Herstellung/Zusammensetzung kommerziell bezogener Zellkulturmedien/-seren bestehen, die über Zellsignalmodulation zur Abnahme von Unterschieden zwischen den Zelllinien beitragen. Dies lässt sich jedoch nicht belegen, da Rezepturen und Herstellungsverfahren nicht zugänglich sind, zumal Seren bezüglich der Zusammensetzung ihrer über 1000 Komponenten (u. a. Hormon-

Enzym-, Wachstumsfaktor- und Nährstoffgehalt) undefiniert sind. Auch die Passagenzahl (Anzahl an Zellteilungen) kann Einfluss auf zelluläre Prozesse nehmen<sup>224-227</sup>. Der Etablierung neuer Zelllinien ist dabei inhärent, dass die Basiszelllinie stets eine niedrigere Passagenzahl aufweist als eine darauf basierend modifizierte Zelllinie. Ob in den hier untersuchten Zelllinien solche Effekte von Bedeutung sind, ist allerdings unklar und bedarf gezielter Untersuchungen.

Zusätzlich wurden einige Tage nach Bestrahlung unbekannte Strukturen in der Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 beobachtet, die dosisabhängig zunahmten. Trotz umfassender Analysen bleibt es Spekulation, worum genau es sich bei diesen Strukturen handelte. Eine Neuetablierung der Zelllinie war aus Zeitgründen nicht möglich. Da, abgesehen vom Koloniebildungstest, die funktionellen Studien mit niedrigen Zellzahlen, einer geringen Bestrahlungsdosis und/oder innerhalb eines kurzen Beobachtungszeitraums durchgeführt wurden, ist eine Datenbeeinflussung weitgehend ausgeschlossen.

### 5.3 Co-Lokalisation

Zahlreiche Studien wiesen auf eine gegenseitige Beeinflussung von CAV1 und MDR1 hin und deuteten an, dass die Basis der Interaktion eine gemeinsame Lokalisation in der Membran darstellt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dies auch in TK6 Zellen, die gleichzeitig CAV1 und MDR1 überexprimieren, der Fall ist, und ob Bestrahlung einen Effekt auf die Lokalisation beider Proteine hat. Die Lokalisation der Zielproteine wurde über einen Zeitraum von 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy beobachtet und es wurden drei Co-Lokalisationsparameter ausgewertet: Pearsons R, Manders' tM1/tM2 und Lis ICQ. Nach Bestrahlung nahmen die R-Werte um ca. 22 % kontinuierlich ab, von ca. 0,36 (Kontrolle) zu 0,28 (2 Gy, 24 h), was eine Abnahme der Korrelation beider Intensitäten bedeutet. Die Interpretation von Werten zwischen 0 (keine Korrelation) und 1 (perfekte Korrelation) gestaltet sich oft schwierig und ist zumindest teilweise auf einen Unterschied der mittleren Kanalintensitäten von rotem (CAV1) und grünem (MDR1) Kanal zurückzuführen. Mittels tM1 (rot, CAV1) und tM2 (grün, MDR1) wurde der Intensitätsanteil an der Gesamtintensität für den jeweiligen Kanal ermittelt, bei dem auch eine Intensität für den anderen Kanal vorhanden ist. Dieses Vorgehen ist für unterschiedliche mittlere Kanalintensitäten weniger anfällig und zeigte, dass tM1 und tM2 nach Bestrahlung um ca. 9 % sanken, von ca. 0,77 auf 0,70 (tM1) bzw. von 0,79 auf 0,72 (tM2). Diese Abnahme bedeutet, dass für beide Kanäle der Anteil an Pixeln sinkt, für den auch im jeweils anderen Kanal ein Signal vorhanden ist, also eine

Abnahme der Co-Lokalisation. Bezüglich ICQ änderte Bestrahlung die Wertelage um 0,25 nicht, d. h. dass keine Änderung der Synchronität der Kanalintensitäten stattfand und der Co-Lokalisationsgrad konstant blieb.

Die Daten funktioneller Untersuchungen zur gleichzeitigen Überexpression deuten ansatzweise darauf hin, dass die zusätzliche Expression von MDR1 in TK6-CAV1 eine Beeinflussung der Proliferation und Apoptose bewirkte. Da die Effekte von CAV1 und MDR1 zwar konsistent, aber in ihrer Ausprägung begrenzt waren, wurden nur marginale Effekte der Bestrahlung auf die Lokalisation von CAV1 und MDR1 erwartet. Insgesamt deuten die Co-Lokalisationsdaten eine Abnahme an, was dazu führen könnte, dass CAV1 besser zugänglich für eine Bindung an FAS ist und so die Apoptosekaskade stärker aktiviert wird. Eine weitere Ergründung der Co-Lokalisation sollte in größeren Zellen angestrebt werden, in denen die Kompartiment-spezifische Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 untersucht werden könnte. Umverteilungsprozesse der Proteine, wie beispielsweise von CAV1 nach Cholesterol-Oxidation <sup>228</sup>, könnten so besser berücksichtigt werden.

Probenaufbereitung und Datenerhebung für Co-Lokalisationsstudien kann auf sehr vielfältige Weise erfolgen. In CH<sup>R</sup>B30 Zellen wurde geschlussfolgert, dass auf Grund der fehlenden Gelbfärbung im Überlagerungsbild keine Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 stattfände <sup>229</sup>, obwohl einige Zellbereiche orange bis hellgrün gefärbt waren (was auf unterschiedliche Intensitäten der Farbkanäle hindeutet) und daher der Ausschluss einer Co-Lokalisation nicht zutreffend ist. Es gab außerdem keine Angaben zur Anzahl untersuchter Zellen oder eine statistische Analyse der Kanalintensitäten.

Bei der Präparation, einem entscheidenden Faktor für Interaktionsstudien an Membranstrukturen <sup>230</sup>, wird oftmals nicht zwischen planaren *lipid rafts* und Caveolae unterschieden. Somit bleibt unklar, welchen Anteil Caveolae an der Gesamtheit der *lipid rafts* haben, und welche Membranstruktur mehrheitlich zu den Ergebnissen beiträgt. Beispielsweise wurde in BBCEC Zellen sowohl ein caveolärer als auch ein nicht-caveolärer Membranpool identifiziert, die beide CAV1 und MDR1 exprimierten, wobei MDR1 mehrheitlich in caveolären Strukturen nachgewiesen wurde <sup>161</sup>. Zu beachten bleibt, dass eine gemeinsame Lokalisation beider Proteine in einer gemeinsamen Membranfraktion zwar auf eine mögliche Interaktion hinweist, aber nicht zwingend eine physikalische Interaktion und gegenseitige Beeinflussung bedeutet.

Die funktionelle Bedeutung der Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 ergibt in der Literatur bisher ein heterogenes Bild: Während in den *multidrug*-resistenten Zelllinien

SGC7901/Adr und MCF7/Adr die Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 durch die durch Doxorubicin aktivierte SRC-Kinase von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der MDR1-Transportfunktion war <sup>171</sup>, wiesen Erkenntnisse aus Rattenhirnepithelzellen auf eine reduzierte Interaktion von CAV1 und MDR1 nach Mutation von CAV1 an Tyr14 hin, die gleichzeitig mit einer gesteigerten Transportaktivität von MDR1 verbunden war <sup>172</sup>. Tierversuche zur durch  $\beta$ -Carrageenan induzierten Schmerz- und Inflammationsantwort zeigten anhand von mikroskopischen Co-Lokalisationsdaten eine Zunahme der Interaktion von MDR1 mit Tyr14-phosphoryliertem CAV1 <sup>231</sup>. Die Überexpression von CAV1 minderte den *multidrug*-resistenten Phänotyp und reduzierte die Transporteraktivität des MDR1-Proteins in für Doxorubicin resistenten Hs578T/Dox Zellen <sup>167-169</sup>. Interessant wäre zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit gezeigte zeitabhängige Abnahme der Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 nach Bestrahlung auch anhand von Immunpräzipitation und/oder Transportfunktionsassays bestätigt werden könnte. Beide Methoden würden eine direkte Interaktion nachweisen und wären somit der Analyse von Proteinexpression präparierter Membranfraktionen vorzuziehen.

Ein anderer Ansatz zur Bewertung mikroskopischer Co-Lokalisationsdaten wäre eine objektbasierte Analyse <sup>192</sup>. Nach Objektbegrenzung erfolgt die Ermittlung geometrischer Objektmittelpunkt oder Intensitätsschwerpunkt der Objekte. Der Co-Lokalisationsgrad wird anhand des Vergleichs der Kanalintensitäten dieser Schwerpunkte ermittelt. Allein die Auswahl aller relevanten Objekte, gefolgt von der Bewertung der Co-Lokalisation anhand Abstand oder Überlappung der Intensitätsschwerpunkte unterschiedlicher Kanäle, sind hochanspruchsvolle, zeitaufwendige Prozesse, die eine professionelle Bearbeitung erfordern.

#### 5.4 Bedeutung der Phosphorylierung von CAV1 an Tyrosin 14 nach Bestrahlung

In unterschiedlichen Zelllinien war die Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 relevant für die Interaktion mit diversen Signalmolekülen und auch mit MDR1. Verschiedene externe Stimuli können diese Phosphorylierung induzieren, wodurch diverse Zellfunktionen moduliert werden können. Für Bestrahlung allerdings sind die Induktion und die Bedeutung der Phosphorylierung von CAV1 bisher weniger gut aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde daher die durch Kinasen induzierte Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14



nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Bestrahlung, sowie die Funktion von Tyr14 hinsichtlich Proliferation und Apoptose nach Bestrahlung untersucht.

Zunächst wurde für das TK6-CAV1 Zellmodell die Funktionalität der Phosphorylierungsstelle Tyr14 geprüft. Während Saccharose keinen Effekt hatte, wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als potenter Stimulus für die Phosphorylierung von CAV1 bestätigt, wobei eine zeitabhängige Zunahme von p-CAV1 beobachtet wurde. Eine Zelltyp-spezifische Sensitivität für verschiedene Stressauslöser ist wahrscheinlich, da in NIH/3T3-Fibroblasten auch die Behandlung mit Saccharose die Phosphorylierung von CAV1 induzierte <sup>118</sup>.

In der lymphoblastoiden Zelllinie TK6-CAV1 wurde die Aktivierung zentraler stress-assoziiierter Kinasen p38, SFK und JNK nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung bestätigt, wobei die Phosphorylierung von CAV1 abhängig von p38, JNK und SFK war. Die Phosphorylierung von CAV1 und der untersuchten Signalkinasen im Zuge der oxidativen Stressantwort wurde auch in anderen Zelllinien, u. a. RLMVEC, H9c2, RPTC, PAEC und JB6 C1 41, beschrieben <sup>144, 232-234</sup>. Eine ähnliche Abhängigkeit der Phosphorylierung von CAV1 von der Aktivierung dieser Kinasen wurde in NIH/3T3, RLMVEC und WI-38 Zellen beobachtet <sup>118, 144, 235</sup>. In dieser Arbeit war jedoch keiner der verwendeten Kinaseinhibitoren in der Lage, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Phosphorylierung von CAV1 vollständig zu unterdrücken, was auch in NIH/3T3- bzw. RLMVEC-Zellen nach Vorbehandlung mit einem p38- bzw. SFK-Inhibitor beobachtet wurde <sup>118, 144</sup>, und was auf Redundanzen der Kinase-Signalwege hindeutet. Wahrscheinlich ist auch, dass Kinasen, die in dieser oder den referenzierten Arbeiten nicht untersucht wurden, eine Phosphorylierung von CAV1 hervorrufen können. Beispielsweise war in mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten RLMVEC, NIH/3T3 und Fibroblasten c-Abl für die Phosphorylierung von CAV1 erforderlich <sup>144, 146, 236</sup>. Andererseits waren SFK, p38 oder JNK nicht relevant für die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Phosphorylierung von CAV1 in Fibroblasten und Endothelzellen, was darauf hindeutet, dass abhängig von Zelltyp und Behandlungskonditionen unterschiedliche Kinasen für die Phosphorylierung von CAV1 relevant sind <sup>114, 145</sup>. Die vorliegende Arbeit unterstützt diese Sichtweise, da in TK6 die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Phosphorylierung von CAV1 abhängig von p38, JNK und SFK war, während SFK nicht bedeutsam für die bestrahlungsinduzierte Phosphorylierung von CAV1 waren, obwohl Dittmann et al. eine Abhängigkeit der CAV1 Phosphorylierung von SRC nach 4 Gy Bestrahlung in A549- und FaDu-Zellen fanden <sup>237</sup>. Studien mit HeLa-, HDMEC-, MCF7- und A594-Zellen ergaben auch eine Aktivierung der in TK6-CAV1 untersuchten Kinasen nach Bestrahlung <sup>36, 237-241</sup>. Obwohl in dieser Arbeit nur eine geringe Zunahme der

JNK-Aktivität nach Bestrahlung beobachtet wurde, hatte die JNK-Inhibition einen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung von CAV1 nach Bestrahlung, was durch *Cross-Talk* von JNK mit einer/mehreren anderen Kinase(n) erklärbar wäre.

Obgleich externe Stimuli wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Phosphorylierung von CAV1 durch p38, JNK und SFK induzieren<sup>118, 213, 242, 243</sup>, scheint CAV1 selbst auch in der Lage, die Aktivität der Kinasen zu modulieren<sup>115, 119, 244, 245</sup>, was auf eine bidirektionale Beziehung schließen lässt. In dieser Arbeit wurde eine vergleichbare Expression der aktivierten Kinasen in mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten TK6-CAV1 und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> beobachtet, weshalb die Phosphorylierung von CAV nicht relevant für die Aktivität der Kinasen im TK6 Zellmodell war, und eine unidirektionale Beziehung zwischen den Kinasen und CAV1 vorliegt.

Die Bestrahlung von TK6-CAV1 mit 2 Gy und 4 Gy Röntgenstrahlung induzierte eine vergleichbar hohe Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 wie die Behandlung der Zellen mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zellbestrahlung mit Röntgenstrahlung ruft ca. 40 DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) und 1000 Einzelstrangbrüche (ESB) pro Gy hervor<sup>246</sup>. In einer Studie wurde gezeigt, dass 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etwa gleich viele ESB verursachte wie 40 Gy. Demnach würden 2,5 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausreichen, um gleich viele ESB wie 4 Gy Röntgenstrahlung zu verursachen, während 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. 0,5 Gy etwa 10 DSB induzierte<sup>247</sup>. Wenn nur ESB für die Aktivierung der Signaltransduktion nach Bestrahlung verantwortlich wären, dann wären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen im µM-Bereich ausreichend. Da in dieser Arbeit jedoch bis zu 1000-fach höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen für eine deutliche Signalaktivierung erforderlich waren, ist wahrscheinlicher, dass DSB als Auslöser relevant sind. Da ESB nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung außerdem zufällig in den zwei Zuckerphosphatsträngen der DNA auftreten, ist eine hohe Anzahl von ESB nötig, damit zwei zufällige ESB auf den gegenüberliegenden Strängen einen DSB hervorrufen, sodass nur eine hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der Lage wäre, um ähnlich viele DSB hervorzurufen wie 1 Gy<sup>247</sup>, denn von Röntgenstrahlung induzierte DSB sind das Resultat eines Bruchs beider Stränge durch ein singuläres Event<sup>248</sup>.

In Brustkrebszellen fand man nach Bestrahlung eine Zunahme von CAV1, die mit gesteigerter DNA-Reparatur assoziiert war, wobei insbesondere die DSB-Reparatursysteme homologe Rekombination und nicht-homologe Endverknüpfung aktiviert waren<sup>249</sup>. In ähnlicher Weise korrelierte der *knockdown* von CAV1 mit einer Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche in bestrahlten Pankreaskarzinomzellen<sup>149</sup>. In Bronchialkarzinomzellen vermittelte SRC über CAV1 die Internalisierung von EGFR nach Bestrahlung, sodass EGFR im Zellkern über die Bindung von DNA-abhängigen

Proteinkinasen die DSB-Reparatur auslösen konnte<sup>250</sup>. Denkbar ist, dass die Reparatur-relevanten Signalkaskaden über die Phosphorylierung von CAV1 moduliert werden, auch wenn dies nicht Gegenstand der referenzierten Studien war. Da es sich bei den Studien um Krebszellen handelte, könnte der onkogene Transformationsgrad ein weiterer Faktor bei der Modulation der Strahlenantwort hinsichtlich DNA-Reparatur sein. Möglicherweise wirkt in p53-positiven Zellen, wie es TK6-CAV1 sind, CAV1 eher pro-apoptotisch über eine Inhibition der DNA-Reparaturwege.

Insgesamt deuten aktuelle Daten darauf hin, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ionisierende Bestrahlung spezifischen Signalmechanismen induzieren und modulieren, was auch auf die Phosphorylierung von CAV1 zutreffen scheint. So war die Phosphorylierung von CAV1 nach Bestrahlung deutlich niedriger als nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und auch der relative Effekt der p38- und JNK-Inhibition nach Bestrahlung war geringer. Außerdem wurden in HL60-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy vergleichbare Level apoptotischer Zellen wie nach Behandlung mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet, während die Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 8, wie auch die Spaltung von BID, bei den zwei Behandlungsmodalitäten unterschiedlich stark war<sup>251</sup>. Die Unterschiede in Qualität, Intensität und Dauer der Signalaktivierung können dann zu verschiedenen Zellantworten führen. So wurde nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Bestrahlung ein ähnliches Zellüberleben bei 75 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 2 Gy bzw. 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 4 Gy gefunden, während die Rate fehlerhafter Mitosen bei 600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 4 Gy ähnlich war<sup>252</sup>.

In einigen Studien wurden der Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 verschiedene biologische Funktionen zugeordnet. Neben der Steigerung der Proliferation in Rhabdomyosarkomzellen<sup>253</sup>, wurde die Beteiligung von CAV1 Tyr14 bei Zellmigration, Caveolae-Bildung und Apoptose demonstriert und war für Transportprozesse über die Zellmembran von Endothelzellen erforderlich<sup>144, 216, 254, 255</sup>. Die Rolle der Tyr14 Phosphorylierung im Kontext ionisierender Bestrahlung wurde bisher jedoch nicht untersucht. Die hier durchgeführten Studien zur funktionellen Bedeutung der bestrahlungs-induzierten Phosphorylierung von CAV1 zeigten, dass TK6-CAV1 im Vergleich zu TK6wt und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> bis 72 h nach Bestrahlung eine stärkere Proliferationsinhibition aufwies, was auf eine Rolle von Tyr14 bei der Modulation der Proliferationsantwort nach Bestrahlung hindeutet. Die Repopulierung von TK6-CAV1 nach 0 Gy und 2 Gy war signifikant niedriger als in TK6wt und TK6-CAV1<sup>Y14F</sup>, während nach Bestrahlung mit 4 Gy die mutierte Zelllinie TK6-CAV1<sup>Y14F</sup> die stärkste Proliferations-/Repopulierungsinhibition aufwies. Für die Apoptoserate und das klonogene Überleben nach

Bestrahlung wurde kein Unterschied zwischen den Zelllinien gefunden. Die Diskrepanz der Daten von Apoptose- und Proliferationsverhalten könnte darauf zurückzuführen sein, dass beide Prozesse unterschiedliche, unabhängige Signalwege beanspruchen. So könnte die frühe Proliferation nach Bestrahlung, gemessen mittels MTT, von Tyr14 beeinflusst sein, während Tyr14 für Apoptose, gemessen mittels Höchst-Färbung (das proliferierende Zellen nicht berücksichtigt), nicht relevant ist. Weiterhin ist Apoptose nicht der einzige von Bestrahlung induzierte Zelltodweg, der die Proliferationsrate mindern kann. Senescente Zellen beispielsweise zeigen keine Apoptosekennzeichen, und teilen sich nicht<sup>24</sup>. In humanen und murinen primären Fibroblasten wurde die von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Seneszenz der Expression von CAV1 zugeschrieben, und in der WI-38-Zelllinie reduzierte die Mutation von Tyr14 Seneszenz<sup>235, 256</sup>.

Die Effekte von CAV1 auf Proliferation und Zellüberleben erscheinen komplex und involvieren in normalen und in Tumorzellen sowohl das Überleben als auch Apoptose-fördernden Signalwege<sup>139, 257</sup>. Das Level der CAV1-Expression ist dabei von hoher Relevanz für die Zellantwort bezüglich Proliferation und Apoptose. Außerdem basiert die Funktion von CAV1 zu einem großen Teil auf der Ausbildung von Caveolae, die zusätzlich die Expression von Cavin-1 erfordern kann<sup>258</sup>. Obwohl für lymphozytäre 2B2318 T-Hybridomzellen die Caveolae-Bildung allein durch die Überexpression von CAV1 ausgelöst wurde<sup>259</sup>, ist möglicherweise die Überexpression von CAV1 in TK6 allein nicht ausreichend, damit es seine Rolle bei Zellvorgängen wie Apoptose, Seneszenz und Differenzierung vollständig entfaltet. Daneben können auch Zelltyp, onkogener Transformationsgrad, Zellkulturbedingungen und Behandlungsschema zu den beschriebenen ambivalenten Funktionen von CAV1 beitragen, das in unterschiedlichen Krebsarten hoch- oder herunterreguliert ist, abhängig ist vom jeweiligen experimentellen Hintergrund, als pro- als auch anti-apoptosicher Faktor angesehen wird und sowohl als Radioprotektor als auch Radiosensibilisierer beschrieben wurde<sup>138</sup>. Diese Faktoren könnten zu einem gewissen Grad für die unterschiedlichen Rollen von CAV1 bei der Strahlenantwort von TK6-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien beitragen. Die vorliegende Arbeit verbessert das Verständnis zur Bedeutung der Phosphorylierung von CAV1 und der Aktivierung von Signalkinasen im Rahmen der Strahlenantwort und zeigt auf, dass die Tyr14-Phosphorylierung keine generelle Voraussetzung für die Modulation von Proliferation, Apoptose oder klonogenem Überleben nach Bestrahlung ist. Weitere Studien sind daher erforderlich, um die Rolle der Phosphorylierung von CAV1 während der biologischen Strahlenantwort zu präzisieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

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 wa-

ren. 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<sup>Y14F</sup> untersucht. Die Phosphorylierung nach oxidativem Stress ( $H_2O_2$ ) bzw. Bestrahlung von CAV1 wurde durch Inhibition der Signalkinasen p38 und JNK um ca. 55 % ( $H_2O_2$ ) bzw. ca. 25 % gemindert ( $p \leq 0,01$ ), während Kinasen der SRC-Familie nur für die durch  $H_2O_2$  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  $H_2O_2$  ( $p < 0,03$ ). 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<sup>Y14F</sup>. Hinsichtlich Kernfragmentierungsrate und Koloniebildung ergaben sich jedoch keine Unterschiede im Zelllinienvergleich. Wahrscheinlich sind unterschiedliche Zellsignalwege relevant für den  $H_2O_2$ - bzw. bestrahlungsinduzierten Zelltod, und möglicherweise werden unterschiedliche Zelltodmechanismen aktiviert, sodass eine multimodale Rolle von CAV1 und der Phosphorylierung an Tyr14 ausgeht.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Die therapeutische Breite in der Strahlentherapie.....	5
Abb. 2: Schema des intrinsischen und extrinsischen Wegs der Apoptose. ....	10
Abb. 3: Retroviraler Lebenszyklus.....	16
Abb. 4: Modell des MDR1-Proteins. ....	18
Abb. 5: Struktur von Caveolae und CAV1. ....	19
Abb. 6: Prinzip der Mutagenese-PCR.....	46
Abb. 7: Strategie zur Klonierung von pHR'SIN-MDR1-EGFP und Darstellung von pHR'SIN-CAV1-RFP. ....	57
Abb. 8: Etablierung der Zelllinie TK6-MDR1-EGFP.....	58
Abb. 9: Vergleich der roten und grünen Fluoreszenz in TK6wt, TK6-CAV1-RFP und TK6-MDR1-EGFP.....	59
Abb. 10: Strategie zur Klonierung von pHR'SIN-CAV1-2A-MDR1.....	60
Abb. 11: Etablierung der Zelllinie TK6-CAV1-MDR1. ....	61
Abb. 12: Strategie zur Klonierung von pHR'SIN-CAV1 <sup>Y14F</sup> .....	63
Abb. 13: Kontrolle der erfolgreichen Mutation von CAV1 an Tyr14. ....	64
Abb. 14: Zellproliferation und Repopulierung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6- MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy über einen Zeitraum von 10 Tagen.....	68
Abb. 15: Analyse des Zellüberlebens von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy.....	72
Abb. 16: Hoechst-Färbung der Zellkerne von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 Zellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.....	73
Abb. 17: Berechnung der Überlebensfraktion von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6- MDR1 nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 1 Gy und 6 Gy.....	74
Abb. 18: Lichtmikroskopische Untersuchung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 7 Tage nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 Gy und 6 Gy.....	77
Abb. 19: Lichtmikroskopische Untersuchung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 14 Tage nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 Gy und 6 Gy.....	78

---

Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung DAPI gefärbter Zellkerne von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 14 Tage nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 2 Gy und 6 Gy. ....	79
Abb. 21: Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mit 2 Gy. ....	84
Abb. 22: Densitometrische Quantifizierung der Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.....	85
Abb. 23: Densitometrische Quantifizierung der Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 36 h und 72 h nach Bestrahlung mit 2 Gy.....	86
Abb. 24: Nachweis der Antikörper-Spezifität und Etablierung korrekter Systemeinstellungen mit TK6-CAV1-MDR1.....	88
Abb. 25: Lokalisation von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy (A).....	90
Abb. 26: Lokalisation von CAV1 und MDR1 in TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy (B).....	91
Abb. 27: Statistische Auswertung der Co-Lokalisationsparameter R (Pearson), tM1/tM2 (Manders) und ICQ (Li) mittels der Plugins Colocalization Threshold und Coloc2.....	94
Abb. 28: Phosphorylierung von CAV1 nach Behandlung mit Saccharose oder H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	97
Abb. 29: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induziert die Phosphorylierung von CAV1 und von den Kinasen p38, JNK p54/46 und SFK. ....	99
Abb. 30: Zeitverlauf der Phosphorylierung von CAV1 (A), SFK (B), JNK (C) und p38 (D) nach Behandlung mit 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> für die angegebenen Zeiträume.....	100
Abb. 31: Die Inhibition von p38, JNK und SFK verringerte die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzierte Phosphorylierung von CAV1.....	101
Abb. 32: Ionisierende Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy steigerte die Phosphorylierung von CAV1, p38, JNK p54/p46 und SFK. ....	103
Abb. 33: Inhibition von p38 und JNK minderte die bestrahlungsinduzierte Phosphorylierung von CAV1.....	105



---

Abb. 34: Die Phosphorylierung der Kinasen p38, JNK p54/p36 und SFK war unabhängig von der Phosphorylierung von CAV1 nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung.....	107
Abb. 35: Messung von Zellproliferation und Repopulierung über einen Zeitraum von 10 Tagen in TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1 <sup>Y14F</sup> nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy.....	110
Abb. 36: Analyse des Zellüberlebens von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1 <sup>Y14F</sup> 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy – 6 Gy. ....	111
Abb. 37: Hoechst-Färbung der Zellkerne von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1 <sup>Y14F</sup> Zellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy. ....	112
Abb. 38: Berechnung der Überlebensfraktion von TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1 <sup>Y14F</sup> nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 1 Gy und 6 Gy. ....	112

## 8 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1: Färbeplan für das Rhodamin123-Assay.....	41
Tabelle 2: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel.....	44
Tabelle 3: Zellkonzentrationen für die verwendeten Bestrahlungsdosen.....	51
Tabelle 4: Übersicht über Co-Lokalisationsparameter und deren Eigenschaften. ...	56
Tabelle 5: Zellproliferation und Repopulierung von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy über einen Zeitraum von 10 Tagen.....	67
Tabelle 6: Analyse des Zellüberlebens von TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy.....	71
Tabelle 7: Spaltung von Caspase 8 in TK6wt, TK6-CAV1, TK6-MDR1 und TK6-CAV1-MDR1 zwischen 2 h und 84 h nach Bestrahlung mit 2 Gy. ....	83

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. International Agency for Research on Cancer: (Ed.) *World Cancer Report 2014*, Lyon, France, World Health Organization, 2014.
2. Martincorena, I, Campbell, PJ: Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349: 1483-1489, 2015.
3. Cancer Research UK: *What is cancer?* 2015. Online: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>, Stand: 10. Dezember 2015.
4. Baskar, R, Dai, J, Wenlong, N, Yeo, R, Yeoh, KW: Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*. 2014/01/01 ed., 2014 pp 24.
5. Holthusen, H: Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzenanwendung zur Verhütung von Schaden. *Strahlentherapie*, 57: 254-269, 1936.
6. Rong, Y, Welsh, J: Basics of particle therapy II biologic and dosimetric aspects of clinical hadron therapy. *American journal of clinical oncology*, 33: 646-649, 2010.
7. Levin, WP, Kooy, H, Loeffler, JS, DeLaney, TF: Proton beam therapy. *British journal of cancer*, 93: 849-854, 2005.
8. Mohseni-Meybodi, A, Mozdarani, H, Mozdarani, S: DNA damage and repair of leukocytes from Fanconi anaemia patients, carriers and healthy individuals as measured by the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 24: 67-73, 2009.
9. Shahidi, M, Mozdarani, H, Mueller, WU: Radiosensitivity and repair kinetics of gamma-irradiated leukocytes from sporadic prostate cancer patients and healthy individuals assessed by alkaline comet assay. *Iranian biomedical journal*, 14: 67-75, 2010.
10. Parshad, R, Sanford, KK, Jones, GM: Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 5612-5616, 1983.
11. Singh, A, Singh, H: Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Progress in biophysics and molecular biology*, 39: 69-107, 1982.
12. Azzam, EI, Jay-Gerin, JP, Pain, D: Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, 327: 48-60, 2012.
13. Reisz, JA, Bansal, N, Qian, J, Zhao, W, Furdul, CM: Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*, 21: 260-292, 2014.
14. Somosy, Z, Horvath, G, Telbisz, A, Rez, G, Palfia, Z: Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 33: 167-178, 2002.
15. Shao, L, Luo, Y, Zhou, D: Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*, 20: 1447-1462, 2014.

16. Straub, JM, New, J, Hamilton, CD, Lominska, C, Shnayder, Y, Thomas, SM: Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141: 1985-1994, 2015.
17. Lavin, MF, Kozlov, S, Gatei, M, Kijas, AW: ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules*, 5: 2877-2902, 2015.
18. Pawelczak, KS, Bennett, SM, Turchi, JJ: Coordination of DNA-PK activation and nuclease processing of DNA termini in NHEJ. *Antioxid Redox Signal*, 14: 2531-2543, 2011.
19. Zhou, BB, Elledge, SJ: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439, 2000.
20. Marcoux, S, Le, ON, Langlois-Pelletier, C, Laverdiere, C, Hatami, A, Robaey, P, Beausejour, CM: Expression of the senescence marker p16INK4a in skin biopsies of acute lymphoblastic leukemia survivors: a pilot study. *Radiation oncology (London, England)*, 8: 252, 2013.
21. Siddiqui, MS, Francois, M, Fenech, MF, Leifert, WR: Persistent gammaH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutation research Reviews in mutation research*, 766: 1-19, 2015.
22. Eriksson, D, Stigbrand, T: Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 31: 363-372, 2010.
23. Vakifahmetoglu, H, Olsson, M, Zhivotovsky, B: Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation*, 15: 1153-1162, 2008.
24. Kim, BM, Hong, Y, Lee, S, Liu, P, Lim, JH, Lee, YH, Lee, TH, Chang, KT, Hong, Y: Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 16: 26880-26913, 2015.
25. McIlwain, DR, Berger, T, Mak, TW: Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5: a008656, 2013.
26. Matt, S, Hofmann, TG: The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73: 2829-2850, 2016.
27. Garcia-Saez, AJ: The secrets of the Bcl-2 family. *Cell death and differentiation*, 19: 1733-1740, 2012.
28. Vavrova, J, Rezacova, M: Importance of proapoptotic protein PUMA in cell radioresistance. *Folia biologica*, 60: 53-56, 2014.
29. Zimmerman, MA, Huang, Q, Li, F, Liu, X, Li, CY: Cell death-stimulated cell proliferation: a tissue regeneration mechanism usurped by tumors during radiotherapy. *Seminars in radiation oncology*, 23: 288-295, 2013.
30. Vucic, D, Dixit, VM, Wertz, IE: Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12: 439-452, 2011.
31. Green, DR, Llambi, F: Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015/12/03 ed., 2015.

32. Linam, J, Yang, LX: Recent developments in radiosensitization. *Anticancer research*, 35: 2479-2485, 2015.
33. Sheard, MA: Ionizing radiation as a response-enhancing agent for CD95-mediated apoptosis. *International journal of cancer Journal internationale du cancer*, 96: 213-220, 2001.
34. Afshar, G, Jelluma, N, Yang, X, Basila, D, Arvold, ND, Karlsson, A, Yount, GL, Dansen, TB, Koller, E, Haas-Kogan, DA: Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer research*, 66: 4223-4232, 2006.
35. Belka, C, Rudner, J, Wesselborg, S, Stepczynska, A, Marini, P, Lepple-Wienhues, A, Faltin, H, Bamberg, M, Budach, W, Schulze-Osthoff, K: Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene*, 19: 1181-1190, 2000.
36. Kim, MJ, Lee, KH, Lee, SJ: Ionizing radiation utilizes c-Jun N-terminal kinase for amplification of mitochondrial apoptotic cell death in human cervical cancer cells. *The FEBS journal*, 275: 2096-2108, 2008.
37. Belka, C, Heinrich, V, Marini, P, Faltin, H, Schulze-Osthoff, K, Bamberg, M, Budach, W: Ionizing radiation and the activation of caspase-8 in highly apoptosis-sensitive lymphoma cells. *International journal of radiation biology*, 75: 1257-1264, 1999.
38. McLaughlin, KA, Nemeth, Z, Bradley, CA, Humphreys, L, Stasik, I, Fenning, C, Majkut, J, Higgins, C, Crawford, N, Holohan, C, Johnston, PG, Harrison, T, Hanna, GG, Butterworth, KT, Prise, KM, Longley, DB: FLIP: A Targetable Mediator of Resistance to Radiation in Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 15: 2432-2441, 2016.
39. Citrin, DE, Mitchell, JB: Altering the response to radiation: sensitizers and protectors. *Seminars in oncology*, 41: 848-859, 2014.
40. Everett, WH, Curiel, DT: Gene therapy for radioprotection. *Cancer gene therapy*, 22: 172-180, 2015.
41. Wardman, P: Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 19: 397-417, 2007.
42. Maier, P, Hartmann, L, Wenz, F, Herskind, C: Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International journal of molecular sciences*. 2016/01/20 ed., 2016.
43. Maier, P, Wenz, F, Herskind, C: Radioprotection of normal tissue cells. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*, 190: 745-752, 2014.
44. Johnke, RM, Sattler, JA, Allison, RR: Radioprotective agents for radiation therapy: future trends. *Future oncology (London, England)*, 10: 2345-2357, 2014.
45. Koukourakis, MI, Kyrias, G, Kakolyris, S, Kouroussis, C, Frangiadaki, C, Giatromanolaki, A, Retalis, G, Georgoulas, V: Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. *J Clin Oncol*, 18: 2226-2233, 2000.

46. Brizel, DM, Wasserman, TH, Henke, M, Strnad, V, Rudat, V, Monnier, A, Eschwege, F, Zhang, J, Russell, L, Oster, W, Sauer, R: Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 18: 3339-3345, 2000.
47. Utley, JF, Phillips, TL, Kane, LJ: Protection of normal tissues by WR2721 during fractionated irradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 1: 699-703, 1976.
48. Kouvaris, JR, Kouloulis, VE, Vlahos, LJ: Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The oncologist*, 12: 738-747, 2007.
49. Yuhas, JM: Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer research*, 40: 1519-1524, 1980.
50. Giatromanolaki, A, Sivridis, E, Maltezos, E, Koukourakis, MI: Down-regulation of intestinal-type alkaline phosphatase in the tumor vasculature and stroma provides a strong basis for explaining amifostine selectivity. *Seminars in oncology*, 29: 14-21, 2002.
51. Blijlevens, N, Sonis, S: Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18: 817-826, 2007.
52. Vadhan-Raj, S, Goldberg, JD, Perales, MA, Berger, DP, van den Brink, MR: Clinical applications of palifermin: amelioration of oral mucositis and other potential indications. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17: 1371-1384, 2013.
53. Spielberger, R, Stiff, P, Bensinger, W, Gentile, T, Weisdorf, D, Kewalramani, T, Shea, T, Yanovich, S, Hansen, K, Noga, S, McCarty, J, LeMaistre, CF, Sung, EC, Blazar, BR, Elhardt, D, Chen, MG, Emmanouilides, C: Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *The New England journal of medicine*, 351: 2590-2598, 2004.
54. Citrin, D, Cotrim, AP, Hyodo, F, Baum, BJ, Krishna, MC, Mitchell, JB: Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *The oncologist*, 15: 360-371, 2010.
55. The Journal of Gene Medicine: *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. 2015. Online: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>, Stand: 20. November 2015.
56. Maier, P, von Kalle, C, Laufs, S: Retroviral vectors for gene therapy. *Future microbiology*, 5: 1507-1523, 2010.
57. Chira, S, Jackson, CS, Oprea, I, Ozturk, F, Pepper, MS, Diaconu, I, Braicu, C, Raduly, LZ, Calin, GA, Berindan-Neagoe, I: Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*, 6: 30675-30703, 2015.
58. Zufferey, R, Dull, T, Mandel, RJ, Bukovsky, A, Quiroz, D, Naldini, L, Trono, D: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology*, 72: 9873-9880, 1998.
59. Kushwah, R, Oliver, JR, Duan, R, Zhang, L, Keshavjee, S, Hu, J: Induction of immunological tolerance to adenoviral vectors by using a novel dendritic cell-based strategy. *Journal of virology*, 86: 3422-3435, 2012.

60. Fernandes, P, Peixoto, C, Santiago, VM, Kremer, EJ, Coroadinha, AS, Alves, PM: Bioprocess development for canine adenovirus type 2 vectors. *Gene therapy*, 20: 353-360, 2013.
61. Burns, JC, Friedmann, T, Driever, W, Burrascano, M, Yee, JK: Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 8033-8037, 1993.
62. van der Loo, JC, Wright, JF: Progress and challenges in viral vector manufacturing. *Human molecular genetics*, 25: R42-52, 2016.
63. Blaese, RM, Culver, KW, Miller, AD, Carter, CS, Fleisher, T, Clerici, M, Shearer, G, Chang, L, Chiang, Y, Tolstoshev, P, Greenblatt, JJ, Rosenberg, SA, Klein, H, Berger, M, Mullen, CA, Ramsey, WJ, Muul, L, Morgan, RA, Anderson, WF: T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270: 475-480, 1995.
64. Stoye, JP: Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nature reviews Microbiology*, 10: 395-406, 2012.
65. Olive, PL, Durand, RE: Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro? *International journal of radiation biology*, 71: 695-707, 1997.
66. Veldwijk, MR, Herskind, C, Sellner, L, Radujkovic, A, Laufs, S, Fruehauf, S, Zeller, WJ, Wenz, F: Normal-tissue radioprotection by overexpression of the copper-zinc and manganese superoxide dismutase genes. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*, 185: 517-523, 2009.
67. Yang, C, Chen, HX, Zhou, Y, Liu, MX, Wang, Y, Wang, JX, Ren, SP, Han, Y, Wu, BY: Manganese superoxide dismutase gene therapy protects against irradiation- induced intestinal injury. *Current gene therapy*, 13: 305-314, 2013.
68. Maier, P, Herskind, C, Fleckenstein, K, Spier, I, Laufs, S, Zeller, WJ, Fruehauf, S, Wenz, F: MDR1 gene transfer using a lentiviral SIN vector confers radioprotection to human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Radiation research*, 169: 301-310, 2008.
69. Maier, P, Fleckenstein, K, Li, L, Laufs, S, Zeller, WJ, Baum, C, Fruehauf, S, Herskind, C, Wenz, F: Overexpression of MDR1 using a retroviral vector differentially regulates genes involved in detoxification and apoptosis and confers radioprotection. *Radiation research*, 166: 463-473, 2006.
70. Barzan, D, Maier, P, Zeller, WJ, Wenz, F, Herskind, C: Overexpression of caveolin-1 in lymphoblastoid TK6 cells enhances proliferation after irradiation with clinically relevant doses. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*, 186: 99-106, 2010.
71. Silva, R, Vilas-Boas, V, Carmo, H, Dinis-Oliveira, RJ, Carvalho, F, de Lourdes Bastos, M, Remiao, F: Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & therapeutics*, 149: 1-123, 2015.
72. Mealey, KL, Fidel, J: P-glycoprotein mediated drug interactions in animals and humans with cancer. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 29: 1-6, 2015.
73. Dean, M, Annilo, T: Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics*, 6: 123-142, 2005.

74. Johnstone, RW, Cretney, E, Smyth, MJ: P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood*, 93: 1075-1085, 1999.
75. Robinson, LJ, Roberts, WK, Ling, TT, Lamming, D, Sternberg, SS, Roepe, PD: Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry*, 36: 11169-11178, 1997.
76. Ruth, AC, Roninson, IB: Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer research*, 60: 2576-2578, 2000.
77. Smyth, MJ, Krasovskis, E, Sutton, VR, Johnstone, RW: The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 7024-7029, 1998.
78. Ruefli, AA, Tainton, KM, Darcy, PK, Smyth, MJ, Johnstone, RW: P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation. *Cell death and differentiation*, 9: 1266-1272, 2002.
79. Tainton, KM, Smyth, MJ, Jackson, JT, Tanner, JE, Cerruti, L, Jane, SM, Darcy, PK, Johnstone, RW: Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux. *Cell death and differentiation*, 11: 1028-1037, 2004.
80. Mollinedo, F, Gajate, C: Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Advances in biological regulation*, 57: 130-146, 2015.
81. Sotgia, F, Martinez-Outschoorn, UE, Howell, A, Pestell, RG, Pavlides, S, Lisanti, MP: Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annual review of pathology*, 7: 423-467, 2012.
82. Richter, T, Floetenmeyer, M, Ferguson, C, Galea, J, Goh, J, Lindsay, MR, Morgan, GP, Marsh, BJ, Parton, RG: High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9: 893-909, 2008.
83. Parton, RG, del Pozo, MA: Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14: 98-112, 2013.
84. Ariotti, N, Rae, J, Leneva, N, Ferguson, C, Loo, D, Okano, S, Hill, MM, Walser, P, Collins, BM, Parton, RG: Molecular Characterization of Caveolin-induced Membrane Curvature. *The Journal of biological chemistry*, 290: 24875-24890, 2015.
85. Monier, S, Dietzen, DJ, Hastings, WR, Lublin, DM, Kurzchalia, TV: Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS letters*, 388: 143-149, 1996.
86. Monier, S, Parton, RG, Vogel, F, Behlke, J, Henske, A, Kurzchalia, TV: VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Molecular biology of the cell*, 6: 911-927, 1995.
87. Baker, N, Tuan, RS: The less-often-traveled surface of stem cells: caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration. *Stem cell research & therapy*, 4: 90, 2013.



88. Fridolfsson, HN, Roth, DM, Insel, PA, Patel, HH: Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014/05/27 ed., May 22, 2014.
89. Navarro, A, Anand-Apte, B, Parat, MO: A role for caveolae in cell migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18: 1801-1811, 2004.
90. Yang, B, Radcliff, C, Hughes, D, Kelemen, S, Rizzo, V: p190 RhoGTPase-activating protein links the beta1 integrin/caveolin-1 mechanosignaling complex to RhoA and actin remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31: 376-383, 2011.
91. Smart, EJ, Ying, Y, Donzell, WC, Anderson, RG: A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, 271: 29427-29435, 1996.
92. Sinha, B, Koster, D, Ruez, R, Gonnord, P, Bastiani, M, Abankwa, D, Stan, RV, Butler-Browne, G, Védie, B, Johannes, L, Morone, N, Parton, RG, Raposo, G, Sens, P, Lamaze, C, Nassoy, P: Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144: 402-413, 2011.
93. Williams, TM, Lisanti, MP: The caveolin proteins. *Genome biology*, 5: 214, 2004.
94. Zundel, W, Swiersz, LM, Giaccia, A: Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Molecular and cellular biology*, 20: 1507-1514, 2000.
95. Liu, J, Lee, P, Galbiati, F, Kitsis, RN, Lisanti, MP: Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *American journal of physiology Cell physiology*, 280: C823-835, 2001.
96. Timme, TL, Goltsov, A, Tahir, S, Li, L, Wang, J, Ren, C, Johnston, RN, Thompson, TC: Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene*, 19: 3256-3265, 2000.
97. Wei, S, Moon, HG, Zheng, Y, Liang, X, An, CH, Jin, Y: Flotillin-2 modulates fas signaling mediated apoptosis after hyperoxia in lung epithelial cells. *PloS one*, 8: e77519, 2013.
98. Park, DS, Cohen, AW, Frank, PG, Razani, B, Lee, H, Williams, TM, Chandra, M, Shirani, J, De Souza, AP, Tang, B, Jelicks, LA, Factor, SM, Weiss, LM, Tanowitz, HB, Lisanti, MP: Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry*, 42: 15124-15131, 2003.
99. Mercier, I, Jasmin, JF, Pavlides, S, Minetti, C, Flomenberg, N, Pestell, RG, Frank, PG, Sotgia, F, Lisanti, MP: Clinical and translational implications of the caveolin gene family: lessons from mouse models and human genetic disorders. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89: 614-623, 2009.
100. Li, S, Okamoto, T, Chun, M, Sargiacomo, M, Casanova, JE, Hansen, SH, Nishimoto, I, Lisanti, MP: Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *The Journal of biological chemistry*, 270: 15693-15701, 1995.
101. Razandi, M, Alton, G, Pedram, A, Ghonshani, S, Webb, P, Levin, ER: Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Molecular and cellular biology*, 23: 1633-1646, 2003.

102. Hong, YH, Kim, JY, Lee, JH, Chae, HG, Jang, SS, Jeon, JH, Kim, CH, Kim, J, Kim, SJ: Agonist-induced internalization of mGluR1alpha is mediated by caveolin. *Journal of neurochemistry*, 111: 61-71, 2009.
103. Song, KS, Li, S, Okamoto, T, Quilliam, LA, Sargiacomo, M, Lisanti, MP: Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *The Journal of biological chemistry*, 271: 9690-9697, 1996.
104. Grande-Garcia, A, Echarri, A, de Rooij, J, Alderson, NB, Waterman-Storer, CM, Valdivielso, JM, del Pozo, MA: Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *The Journal of cell biology*, 177: 683-694, 2007.
105. Peng, F, Wu, D, Ingram, AJ, Zhang, B, Gao, B, Krepinsky, JC: RhoA activation in mesangial cells by mechanical strain depends on caveolae and caveolin-1 interaction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18: 189-198, 2007.
106. Toya, Y, Schwencke, C, Couet, J, Lisanti, MP, Ishikawa, Y: Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides. *Endocrinology*, 139: 2025-2031, 1998.
107. Allen, JA, Yu, JZ, Dave, RH, Bhatnagar, A, Roth, BL, Rasenick, MM: Caveolin-1 and lipid microdomains regulate Gs trafficking and attenuate Gs/adenylyl cyclase signaling. *Molecular pharmacology*, 76: 1082-1093, 2009.
108. Couet, J, Sargiacomo, M, Lisanti, MP: Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *The Journal of biological chemistry*, 272: 30429-30438, 1997.
109. Yamamoto, M, Toya, Y, Jensen, RA, Ishikawa, Y: Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Experimental cell research*, 247: 380-388, 1999.
110. Labrecque, L, Royal, I, Surprenant, DS, Patterson, C, Gingras, D, Beliveau, R: Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Molecular biology of the cell*, 14: 334-347, 2003.
111. Ju, H, Zou, R, Venema, VJ, Venema, RC: Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *The Journal of biological chemistry*, 272: 18522-18525, 1997.
112. Razani, B, Lisanti, MP: Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *American journal of physiology Cell physiology*, 281: C1241-1250, 2001.
113. Razani, B, Rubin, CS, Lisanti, MP: Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *The Journal of biological chemistry*, 274: 26353-26360, 1999.
114. Chen, DB, Li, SM, Qian, XX, Moon, C, Zheng, J: Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells. *Biology of reproduction*, 73: 761-772, 2005.
115. Li, S, Couet, J, Lisanti, MP: Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding

- negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*, 271: 29182-29190, 1996.
116. Engelman, JA, Chu, C, Lin, A, Jo, H, Ikezu, T, Okamoto, T, Kohtz, DS, Lisanti, MP: Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS letters*, 428: 205-211, 1998.
117. Galbiati, F, Volonte, D, Engelman, JA, Watanabe, G, Burk, R, Pestell, RG, Lisanti, MP: Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *The EMBO journal*, 17: 6633-6648, 1998.
118. Volonte, D, Galbiati, F, Pestell, RG, Lisanti, MP: Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *The Journal of biological chemistry*, 276: 8094-8103, 2001.
119. Boscher, C, Nabi, I: CAVEOLIN-1: Role in Cell Signaling. In: *Caveolins and Caveolae*. edited by JASMIN, J.-F., FRANK, P., LISANTI, M., Springer US, 2012, pp 29-50.
120. Martinez-Outschoorn, UE, Sotgia, F, Lisanti, MP: Caveolae and signalling in cancer. *Nature reviews Cancer*, 15: 225-237, 2015.
121. Engelman, JA, Zhang, XL, Lisanti, MP: Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS letters*, 436: 403-410, 1998.
122. Engelman, JA, Zhang, XL, Lisanti, MP: Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS letters*, 448: 221-230, 1999.
123. Hurlstone, AF, Reid, G, Reeves, JR, Fraser, J, Strathdee, G, Rahilly, M, Parkinson, EK, Black, DM: Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene*, 18: 1881-1890, 1999.
124. Lee, SW, Reimer, CL, Oh, P, Campbell, DB, Schnitzer, JE: Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*, 16: 1391-1397, 1998.
125. Racine, C, Belanger, M, Hirabayashi, H, Boucher, M, Chakir, J, Couet, J: Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 255: 580-586, 1999.
126. Engelman, JA, Wykoff, CC, Yasuhara, S, Song, KS, Okamoto, T, Lisanti, MP: Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *The Journal of biological chemistry*, 272: 16374-16381, 1997.
127. Koleske, AJ, Baltimore, D, Lisanti, MP: Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 1381-1385, 1995.
128. Capozza, F, Williams, TM, Schubert, W, McClain, S, Bouzahzah, B, Sotgia, F, Lisanti, MP: Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal

- hyperplasia and tumor formation. *The American journal of pathology*, 162: 2029-2039, 2003.
129. Fiucci, G, Ravid, D, Reich, R, Liscovitch, M: Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene*, 21: 2365-2375, 2002.
130. Zhang, W, Razani, B, Altschuler, Y, Bouzahzah, B, Mostov, KE, Pestell, RG, Lisanti, MP: Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *The Journal of biological chemistry*, 275: 20717-20725, 2000.
131. Razani, B, Altschuler, Y, Zhu, L, Pestell, RG, Mostov, KE, Lisanti, MP: Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry*, 39: 13916-13924, 2000.
132. Thompson, TC, Timme, TL, Li, L, Goltsov, A: Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 4: 233-237, 1999.
133. Yang, G, Truong, LD, Wheeler, TM, Thompson, TC: Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer research*, 59: 5719-5723, 1999.
134. Luan, TY, Zhu, TN, Cui, YJ, Zhang, G, Song, XJ, Gao, DM, Zhang, YM, Zhao, QL, Liu, S, Su, TY, Zhao, RJ: Expression of caveolin-1 is correlated with lung adenocarcinoma proliferation, migration, and invasion. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32: 207, 2015.
135. Sugie, S, Mukai, S, Yamasaki, K, Kamibeppu, T, Tsukino, H, Kamoto, T: Significant Association of Caveolin-1 and Caveolin-2 with Prostate Cancer Progression. *Cancer genomics & proteomics*, 12: 391-396, 2015.
136. Barresi, V, Cerasoli, S, Paioli, G, Vitarelli, E, Giuffre, G, Guiducci, G, Tuccari, G, Barresi, G: Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinico-pathological correlations. *Acta neuropathologica*, 112: 617-626, 2006.
137. Ho, CC, Huang, PH, Huang, HY, Chen, YH, Yang, PC, Hsu, SM: Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *The American journal of pathology*, 161: 1647-1656, 2002.
138. Burgermeister, E, Liscovitch, M, Rocken, C, Schmid, RM, Ebert, MP: Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer letters*, 268: 187-201, 2008.
139. Shatz, M, Liscovitch, M: Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *International journal of radiation biology*, 84: 177-189, 2008.
140. Glenney, JR, Jr.: Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *The Journal of biological chemistry*, 264: 20163-20166, 1989.
141. Glenney, JR, Jr., Soppet, D: Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 10517-10521, 1992.

142. Mastick, CC, Brady, MJ, Saltiel, AR: Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *The Journal of cell biology*, 129: 1523-1531, 1995.
143. Park, JH, Han, HJ: Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK. *American journal of physiology Cell physiology*, 297: C935-944, 2009.
144. Sun, Y, Hu, G, Zhang, X, Minshall, RD: Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. *Circulation research*, 105: 676-685, supplementary 685-699, 2009.
145. Sanguinetti, AR, Cao, H, Mastick, CC: Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *The Biochemical journal*, 376: 159-168, 2003.
146. Sanguinetti, AR, Mastick, CC: c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cellular signalling*, 15: 289-298, 2003.
147. Klein, D, Schmitz, T, Verhelst, V, Panic, A, Schenck, M, Reis, H, Drab, M, Sak, A, Herskind, C, Maier, P, Jendrossek, V: Endothelial Caveolin-1 regulates the radiation response of epithelial prostate tumors. *Oncogenesis*, 4: e148, 2015.
148. Cordes, N, Frick, S, Brunner, TB, Pilarsky, C, Grutzmann, R, Sipos, B, Kloppel, G, McKenna, WG, Bernhard, EJ: Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene*, 26: 6851-6862, 2007.
149. Hehlhans, S, Eke, I, Storch, K, Haase, M, Baretton, GB, Cordes, N: Caveolin-1 mediated radioresistance of 3D grown pancreatic cancer cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 92: 362-370, 2009.
150. Li, J, Hassan, GS, Williams, TM, Minetti, C, Pestell, RG, Tanowitz, HB, Frank, PG, Sotgia, F, Lisanti, MP: Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation. *Cell Cycle*, 4: 1817-1825, 2005.
151. Duregon, E, Senetta, R, Pittaro, A, Verdun di Cantogno, L, Stella, G, De Blasi, P, Zorzetto, M, Mantovani, C, Papotti, M, Cassoni, P: CAVEOLIN-1 expression in brain metastasis from lung cancer predicts worse outcome and radioresistance, irrespective of tumor histotype. *Oncotarget*, 6: 29626-29636, 2015.
152. Zou, W, Ma, X, Hua, W, Chen, B, Cai, G: Caveolin-1 mediates chemoresistance in cisplatin-resistant ovarian cancer cells by targeting apoptosis through the Notch-1/Akt/NF-kappaB pathway. *Oncology reports*, 34: 3256-3263, 2015.
153. Wang, Z, Wang, N, Li, W, Liu, P, Chen, Q, Situ, H, Zhong, S, Guo, L, Lin, Y, Shen, J, Chen, J: Caveolin-1 mediates chemoresistance in breast cancer stem cells via beta-catenin/ABCG2 signaling pathway. *Carcinogenesis*, 35: 2346-2356, 2014.
154. Wang, Z, Wang, N, Liu, P, Peng, F, Tang, H, Chen, Q, Xu, R, Dai, Y, Lin, Y, Xie, X, Peng, C, Situ, H: Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. *Oncotarget*, 6: 37135-37150, 2015.
155. Pang, A, Au, WY, Kwong, YL: Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow. *Leukemia research*, 28: 973-977, 2004.

156. Lavie, Y, Fiucci, G, Liscovitch, M: Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 273: 32380-32383, 1998.
157. Yang, CP, Galbiati, F, Volonte, D, Horwitz, SB, Lisanti, MP: Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells. *FEBS letters*, 439: 368-372, 1998.
158. Belanger, MM, Gaudreau, M, Roussel, E, Couet, J: Role of caveolin-1 in etoposide resistance development in A549 lung cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 3: 954-959, 2004.
159. Belanger, MM, Roussel, E, Couet, J: Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 14: 281-287, 2003.
160. Demeule, M, Jodoin, J, Gingras, D, Beliveau, R: P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS letters*, 466: 219-224, 2000.
161. Jodoin, J, Demeule, M, Fenart, L, Cecchelli, R, Farmer, S, Linton, KJ, Higgins, CF, Beliveau, R: P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *Journal of neurochemistry*, 87: 1010-1023, 2003.
162. Virgintino, D, Robertson, D, Errede, M, Benagiano, V, Girolamo, F, Maiorano, E, Roncali, L, Bertossi, M: Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 50: 1671-1676, 2002.
163. Troost, J, Lindenmaier, H, Haefeli, WE, Weiss, J: Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Molecular pharmacology*, 66: 1332-1339, 2004.
164. Barakat, S, Gayet, L, Dayan, G, Labialle, S, Lazar, A, Oleinikov, V, Coleman, AW, Baggetto, LG: Multidrug-resistant cancer cells contain two populations of P-glycoprotein with differently stimulated P-gp ATPase activities: evidence from atomic force microscopy and biochemical analysis. *The Biochemical journal*, 388: 563-571, 2005.
165. Ismail, MG, Hausler, S, Stuermer, CA, Guyot, C, Meier, PJ, Roth, J, Stieger, B: ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 49: 1673-1682, 2009.
166. Tome, ME, Schaefer, CP, Jacobs, LM, Zhang, Y, Herndon, JM, Matty, FO, Davis, TP: Identification of P-glycoprotein co-fractionating proteins and specific binding partners in rat brain microvessels. *Journal of neurochemistry*, 134: 200-210, 2015.
167. Cai, C, Chen, J: Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 111: 522-529, 2004.
168. Zhu, H, Cai, C, Chen, J: Suppression of P-glycoprotein gene expression in Hs578T/Dox by the overexpression of caveolin-1. *FEBS letters*, 576: 369-374, 2004.
169. Cai, C, Zhu, H, Chen, J: Overexpression of caveolin-1 increases plasma membrane fluidity and reduces P-glycoprotein function in Hs578T/Dox. *Biochemical and biophysical research communications*, 320: 868-874, 2004.

170. Barakat, S, Turcotte, S, Demeule, M, Lachambre, MP, Regina, A, Baggetto, LG, Beliveau, R: Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by P-glycoprotein/caveolin-1 interaction. *Biochemical and biophysical research communications*, 372: 440-446, 2008.
171. Zhang, Y, Qu, X, Teng, Y, Li, Z, Xu, L, Liu, J, Ma, Y, Fan, Y, Li, C, Liu, S, Wang, Z, Hu, X, Zhang, J, Liu, Y: Cbl-b inhibits P-gp transporter function by preventing its translocation into caveolae in multiple drug-resistant gastric and breast cancers. *Oncotarget*, 6: 6737-6748, 2015.
172. Barakat, S, Demeule, M, Pilorget, A, Regina, A, Gingras, D, Baggetto, LG, Beliveau, R: Modulation of p-glycoprotein function by caveolin-1 phosphorylation. *Journal of neurochemistry*, 101: 1-8, 2007.
173. Levy, JA, Virolainen, M, Defendi, V: Human lymphoblastoid lines from lymph node and spleen. *Cancer*, 22: 517-524, 1968.
174. Skopek, TR, Liber, HL, Penman, BW, Thilly, WG: Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the thymidine kinase locus: possibility for a rapid human cell mutation assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 84: 411-416, 1978.
175. Liber, HL, Yandell, DW, Little, JB: A comparison of mutation induction at the tk and hprt loci in human lymphoblastoid cells; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal tk locus. *Mutation research*, 216: 9-17, 1989.
176. Yandell, DW, Little, JB: Chromosome 14 marker appearance in a human B lymphoblastoid cell line of nonmalignant origin. *Cancer genetics and cytogenetics*, 20: 231-239, 1986.
177. Yu, Y, Li, CY, Little, JB: Abrogation of p53 function by HPV16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells. *Oncogene*, 14: 1661-1667, 1997.
178. Xia, F, Wang, X, Wang, YH, Tsang, NM, Yandell, DW, Kelsey, KT, Liber, HL: Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer research*, 55: 12-15, 1995.
179. Yu, Y, Little, JB: p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines. *Cancer research*, 58: 4277-4281, 1998.
180. Barzan, D: *Wirkung der Caveolin-1 Überexpression auf die Strahlenantwort von TK6-Zellen*. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, 2011.
181. Heckmann, D: *Untersuchungen über die Bedeutung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 für die durch SDF-1alpha induzierte Genexpression, Proliferation, Migration, Invasion und Chemosensitivität kolorektaler Tumorzellen*. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, 2012.
182. Zufferey, R, Nagy, D, Mandel, RJ, Naldini, L, Trono, D: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology*, 15: 871-875, 1997.

183. Demaison, C, Parsley, K, Brouns, G, Scherr, M, Battmer, K, Kinnon, C, Grez, M, Thrasher, AJ: High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Human gene therapy*, 13: 803-813, 2002.
184. Ory, DS, Neugeboren, BA, Mulligan, RC: A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 11400-11406, 1996.
185. Graham, FL, Smiley, J, Russell, WC, Nairn, R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36: 59-74, 1977.
186. Rasheed, S, Nelson-Rees, WA, Toth, EM, Arnstein, P, Gardner, MB: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33: 1027-1033, 1974.
187. Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
188. Burnette, WN: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112: 195-203, 1981.
189. Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, Erlich, H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1: 263-273, 1986.
190. Herskind, C, Ganasinski, C, Wang, M, Maier, P, Wenz, F: Protection against radiation-induced apoptosis by overexpression of multidrug resistance 1 (MDR1) does not involve upstream elements of the mitochondrial pathway (unpublished). 2009.
191. Furth, EE, Thilly, WG, Penman, BW, Liber, HL, Rand, WM: Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Analytical biochemistry*, 110: 1-8, 1981.
192. Bolte, S, Cordelieres, FP: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224: 213-232, 2006.
193. Dunn, KW, Kamocka, MM, McDonald, JH: A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American journal of physiology Cell physiology*, 300: C723-742, 2011.
194. Costes, SV, Daelemans, D, Cho, EH, Dobbin, Z, Pavlakis, G, Lockett, S: Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal*, 86: 3993-4003, 2004.
195. Pearson, K: Mathematical Contributions to the Theory of Evolution. III. Regression, Heredity, and Panmixia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*, 187: 253-318, 1896.
196. Manders, EM, Stap, J, Brakenhoff, GJ, van Driel, R, Aten, JA: Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *Journal of cell science*, 103 ( Pt 3): 857-862, 1992.



- 
197. Li, Q, Lau, A, Morris, TJ, Guo, L, Fordyce, CB, Stanley, EF: A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24: 4070-4081, 2004.
198. Han, B, Tiwari, A, Kenworthy, AK: Tagging strategies strongly affect the fate of overexpressed caveolin-1. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16: 417-438, 2015.
199. Chen, T, Chen, M, Chen, J: Ionizing radiation potentiates dihydroartemisinin-induced apoptosis of A549 cells via a caspase-8-dependent pathway. *PloS one*, 8: e59827, 2013.
200. Li, P, Zhao, QL, Wu, LH, Jawaid, P, Jiao, YF, Kadowaki, M, Kondo, T: Isofraxidin, a potent reactive oxygen species (ROS) scavenger, protects human leukemia cells from radiation-induced apoptosis via ROS/mitochondria pathway in p53-independent manner. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 19: 1043-1053, 2014.
201. Wu, LH, Li, P, Zhao, QL, Piao, JL, Jiao, YF, Kadowaki, M, Kondo, T: Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 19: 1654-1663, 2014.
202. Verheij, M, Ruiter, GA, Zerp, SF, van Blitterswijk, WJ, Fuks, Z, Haimovitz-Friedman, A, Bartelink, H: The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 47: 225-232, 1998.
203. Kim, BJ, Ryu, SW, Song, BJ: JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry*, 281: 21256-21265, 2006.
204. Herr, I, Debatin, KM: Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98: 2603-2614, 2001.
205. Schafer, J, Bachtler, J, Engling, A, Little, JB, Weber, KJ, Wenz, F: Suppression of apoptosis and clonogenic survival in irradiated human lymphoblasts with different TP53 status. *Radiation research*, 158: 699-706, 2002.
206. Geiger, C, Weber, KJ, Wenz, F: Radiation induced chromosome aberrations and clonogenic survival in human lymphoblastoid cell lines with different p53 status. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*, 175: 289-292, 1999.
207. Parlato, S, Giammarioli, AM, Logozzi, M, Lozupone, F, Matarrese, P, Luciani, F, Falchi, M, Malorni, W, Fais, S: CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *The EMBO journal*, 19: 5123-5134, 2000.
208. Luciani, F, Molinari, A, Lozupone, F, Calcabrini, A, Lugini, L, Stringaro, A, Puddu, P, Arancia, G, Cianfriglia, M, Fais, S: P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin. *Blood*, 99: 641-648, 2002.
209. Higgins, CF: Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell*, 79: 393-395, 1994.

210. Luker, GD, Nilsson, KR, Covey, DF, Piwnica-Worms, D: Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *The Journal of biological chemistry*, 274: 6979-6991, 1999.
211. van Helvoort, A, Smith, AJ, Sprong, H, Fritzsche, I, Schinkel, AH, Borst, P, van Meer, G: MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, 87: 507-517, 1996.
212. Zhang, J, Ma, K, Qi, T, Wei, X, Zhang, Q, Li, G, Chiu, JF: P62 regulates resveratrol-mediated Fas/Cav-1 complex formation and transition from autophagy to apoptosis. *Oncotarget*, 6: 789-801, 2015.
213. Wehinger, S, Ortiz, R, Diaz, MI, Aguirre, A, Valenzuela, M, Llanos, P, Mc Master, C, Leyton, L, Quest, AF: Phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14 induced by ROS enhances palmitate-induced death of beta-pancreatic cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1852: 693-708, 2015.
214. Gargalovic, P, Dory, L: Cellular apoptosis is associated with increased caveolin-1 expression in macrophages. *Journal of lipid research*, 44: 1622-1632, 2003.
215. Tanaka, A, Jin, Y, Lee, SJ, Zhang, M, Kim, HP, Stolz, DB, Ryter, SW, Choi, AM: Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 46: 507-514, 2012.
216. Zhang, M, Lee, SJ, An, C, Xu, JF, Joshi, B, Nabi, IR, Choi, AM, Jin, Y: Caveolin-1 mediates Fas-BID signaling in hyperoxia-induced apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 50: 1252-1262, 2011.
217. Shajahan, AN, Wang, A, Decker, M, Minshall, RD, Liu, MC, Clarke, R: Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 282: 5934-5943, 2007.
218. Lee, CY, Lai, TY, Tsai, MK, Ou-Yang, P, Tsai, CY, Wu, SW, Hsu, LC, Chen, JS: The influence of a caveolin-1 mutant on the function of P-glycoprotein. *Scientific reports*, 6: 20486, 2016.
219. Wang, X, Ryter, SW, Dai, C, Tang, ZL, Watkins, SC, Yin, XM, Song, R, Choi, AM: Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *The Journal of biological chemistry*, 278: 29184-29191, 2003.
220. Veldwijk, MR, Trah, J, Wang, M, Maier, P, Fruehauf, S, Zeller, WJ, Herskind, C, Wenz, F: Overexpression of manganese superoxide dismutase does not increase clonogenic cell survival despite effect on apoptosis in irradiated lymphoblastoid cells. *Radiation research*, 176: 725-731, 2011.
221. Veldwijk, MR, Herskind, C, Laufs, S, Zeller, WJ, Fruehauf, S, Wenz, F: Recombinant adeno-associated virus 2-mediated transfer of the human superoxide-dismutase gene does not confer radioresistance on HeLa cervical carcinoma cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 72: 341-350, 2004.
222. Ye, C, Zhang, X, Wan, J, Chang, L, Hu, W, Bing, Z, Zhang, S, Li, J, He, J, Wang, J, Zhou, G: Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2 arrested cells into G1 phase. *Cell Cycle*, 12: 1424-1432, 2013.

223. Volonte, D, Kahkonen, B, Shapiro, S, Di, Y, Galbiati, F: Caveolin-1 expression is required for the development of pulmonary emphysema through activation of the ATM-p53-p21 pathway. *The Journal of biological chemistry*, 284: 5462-5466, 2009.
224. Lin, HK, Hu, YC, Yang, L, Altuwajri, S, Chen, YT, Kang, HY, Chang, C: Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers. *The Journal of biological chemistry*, 278: 50902-50907, 2003.
225. Chang-Liu, CM, Woloschak, GE: Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer letters*, 113: 77-86, 1997.
226. Witek, P, Korga, A, Burdan, F, Ostrowska, M, Nosowska, B, Iwan, M, Dudka, J: The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results [Epub ahead of print]. *Cytotechnology*. 2016/03/08 ed., 2016.
227. Nam, BM, Kim, BY, Jo, YH, Lee, S, Nemeno, JG, Yang, W, Lee, KM, Kim, H, Jang, IJ, Takebe, T, Lee, JI: Effect of cryopreservation and cell passage number on cell preparations destined for autologous chondrocyte transplantation. *Transplantation proceedings*, 46: 1145-1149, 2014.
228. Smart, EJ, Ying, YS, Conrad, PA, Anderson, RG: Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *The Journal of cell biology*, 127: 1185-1197, 1994.
229. Radeva, G, Perabo, J, Sharom, FJ: P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *The FEBS journal*, 272: 4924-4937, 2005.
230. Pike, LJ: Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research*, 44: 655-667, 2003.
231. McCaffrey, G, Staatz, WD, Sanchez-Covarrubias, L, Finch, JD, Demarco, K, Laracuente, ML, Ronaldson, PT, Davis, TP: P-glycoprotein trafficking at the blood-brain barrier altered by peripheral inflammatory hyperalgesia. *Journal of neurochemistry*, 122: 962-975, 2012.
232. Man, W, Ming, D, Fang, D, Chao, L, Jing, C: Dimethyl sulfoxide attenuates hydrogen peroxide-induced injury in cardiomyocytes via heme oxygenase-1. *Journal of cellular biochemistry*, 115: 1159-1165, 2014.
233. Zhuang, S, Yan, Y, Han, J, Schnellmann, RG: p38 kinase-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor is required for dedifferentiation of renal epithelial cells after oxidant injury. *The Journal of biological chemistry*, 280: 21036-21042, 2005.
234. Chen, K, Vita, JA, Berk, BC, Keaney, JF, Jr.: c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of biological chemistry*, 276: 16045-16050, 2001.
235. Volonte, D, Zou, H, Bartholomew, JN, Liu, Z, Morel, PA, Galbiati, F: Oxidative Stress-Induced Inhibition of Sirt1 by Caveolin-1 Promotes p53-Dependent Premature Senescence and Stimulates the Secretion of IL-6. *The Journal of biological chemistry*. 2014/12/17 ed., December 15, 2014.

236. Mastick, CC, Sanguinetti, AR, Kneseck, JH, Mastick, GS, Newcomb, LF: Caveolin-1 and a 29-kDa caveolin-associated protein are phosphorylated on tyrosine in cells expressing a temperature-sensitive v-Abl kinase. *Experimental cell research*, 266: 142-154, 2001.
237. Dittmann, K, Mayer, C, Kehlbach, R, Rodemann, HP: Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Molecular cancer*, 7: 69, 2008.
238. Kim, MJ, Byun, JY, Yun, CH, Park, IC, Lee, KH, Lee, SJ: c-Src-p38 mitogen-activated protein kinase signaling is required for Akt activation in response to ionizing radiation. *Molecular cancer research : MCR*, 6: 1872-1880, 2008.
239. Kim, RK, Cui, YH, Yoo, KC, Kim, IG, Lee, M, Choi, YH, Suh, Y, Lee, SJ: Radiation promotes malignant phenotypes through SRC in breast cancer cells. *Cancer science*, 106: 78-85, 2015.
240. Kumar, P, Miller, AI, Pulverini, PJ: p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway. *The Journal of biological chemistry*, 279: 43352-43360, 2004.
241. Shin, YS, Hwang, HS, Kang, SU, Chang, JW, Oh, YT, Kim, CH: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates radiation-induced ototoxicity in zebrafish and cochlea-derived cell lines. *Neurotoxicology*, 40: 111-122, 2014.
242. Moon, HG, Qin, Z, Quan, T, Xie, L, Dela Cruz, CS, Jin, Y: Matrix protein CCN1 induced by bacterial DNA and CpG ODN limits lung inflammation and contributes to innate immune homeostasis. *Mucosal immunology*, 8: 243-253, 2015.
243. Tivey, HS, Rokicki, MJ, Barnacle, JR, Rogers, MJ, Bagley, MC, Kipling, D, Davis, T: Small molecule inhibition of p38 MAP kinase extends the replicative life span of human ATR-Seckel syndrome fibroblasts. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2013/02/13 ed., February 11, 2013 pp 1001-1009.
244. Chatterjee, M, Ben-Josef, E, Thomas, DG, Morgan, MA, Zalupski, MM, Khan, G, Andrew Robinson, C, Griffith, KA, Chen, CS, Ludwig, T, Bekaii-Saab, T, Chakravarti, A, Williams, TM: Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. *Scientific reports*, 5: 10867, 2015.
245. Gottlieb-Abraham, E, Shvartsman, DE, Donaldson, JC, Ehrlich, M, Gutman, O, Martin, GS, Henis, YI: Src-mediated caveolin-1 phosphorylation affects the targeting of active Src to specific membrane sites. *Molecular biology of the cell*, 24: 3881-3895, 2013.
246. Hall, EJ, Giaccia, AJ: *Radiobiology for the Radiologist*, Philadelphia, PA, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
247. Lobrich, M, Shibata, A, Beucher, A, Fisher, A, Ensminger, M, Goodarzi, AA, Barton, O, Jeggo, PA: gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9: 662-669, 2010.
248. Herskind, C, Wenz, F: Radiobiological aspects of intraoperative tumour-bed irradiation with low-energy X-rays (LEX-IORT). *Transl Cancer Res*, 3: 3-17, 2014.

249. Zhu, H, Yue, J, Pan, Z, Wu, H, Cheng, Y, Lu, H, Ren, X, Yao, M, Shen, Z, Yang, JM: Involvement of Caveolin-1 in repair of DNA damage through both homologous recombination and non-homologous end joining. *PloS one*, 5: e12055, 2010.
250. Dittmann, K, Mayer, C, Kehlbach, R, Rothmund, MC, Peter Rodemann, H: Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 92: 379-382, 2009.
251. Hosokawa, Y, Sakakura, Y, Tanaka, L, Okumura, K, Yajima, T, Kaneko, M: Radiation-induced apoptosis is independent of caspase-8 but dependent on cytochrome c and the caspase-9 cascade in human leukemia HL60 cells. *Journal of radiation research*, 46: 293-303, 2005.
252. Mondello, C, Guasconi, V, Giulotto, E, Nuzzo, F: Gamma-ray and hydrogen peroxide induction of gene amplification in hamster cells deficient in DNA double strand break repair. *DNA repair*, 1: 483-493, 2002.
253. Faggi, F, Mitola, S, Sorci, G, Riuzzi, F, Donato, R, Codenotti, S, Poliani, PL, Cominelli, M, Vescovi, R, Rossi, S, Calza, S, Colombi, M, Penna, F, Costelli, P, Perini, I, Sampaolesi, M, Monti, E, Fanzani, A: Phosphocaveolin-1 enforces tumor growth and chemoresistance in rhabdomyosarcoma. *PloS one*, 9: e84618, 2014.
254. Orlichenko, L, Huang, B, Krueger, E, McNiven, MA: Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 281: 4570-4579, 2006.
255. Shatz, M, Lustig, G, Reich, R, Liscovitch, M: Caveolin-1 mutants P132L and Y14F are dominant negative regulators of invasion, migration and aggregation in H1299 lung cancer cells. *Experimental cell research*, 316: 1748-1762, 2010.
256. Volonte, D, Zhang, K, Lisanti, MP, Galbiati, F: Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 13: 2502-2517, 2002.
257. Quest, AF, Lobos-Gonzalez, L, Nunez, S, Sanhueza, C, Fernandez, JG, Aguirre, A, Rodriguez, D, Leyton, L, Torres, V: The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Current molecular medicine*, 13: 266-281, 2013.
258. Hill, MM, Bastiani, M, Luetterforst, R, Kirkham, M, Kirkham, A, Nixon, SJ, Walser, P, Abankwa, D, Oorschot, VM, Martin, S, Hancock, JF, Parton, RG: PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*, 132: 113-124, 2008.
259. Fra, AM, Williamson, E, Simons, K, Parton, RG: De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 8655-8659, 1995.

## 10 LEBENSLAUF

### PERSONALIEN

Name, Vorname: Nehring, Juliane  
Geburtsname: Bradl, Juliane  
Geburtsdatum: 26.05.1988  
Geburtsort: Dresden

### SCHULISCHER WERDEGANG

08/1994 – 06/1998 96. Grundschule, Dresden  
08/2004 – 07/2005 Pensacola Catholic High School, Pensacola, Florida,  
USA  
Bildungsaufenthalt, Abschluss der 11. Klasse  
08/1998 – 07/2007 Hans-Erlwein-Gymnasium, Dresden  
30.06.2007 Allgemeine Hochschulreife; Note 1,3

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10/2007 – 09/2012 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Studium Humanbiologie Diplom  
24.09.2009 Vordiplom; Note 1,8  
2011 – 2012 Diplomarbeit  
„Charakterisierung von Androgenrezeptor-Isoformen in  
Prostatakarzinomzellen“; Note: 1,3  
19.09.2012 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Studium Humanbiologie Diplom

## 11 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Frederik Wenz für die Überlassung dieses Forschungsprojekts und die exzellente Möglichkeit zur Promotion in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie.

Herrn PD Dr. Carsten Herskind danke ich für die ausgezeichnete Betreuung, die intensiven wissenschaftlichen Diskussion, seine geduldige Ausdauer und seine fortwährende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Patrick Maier gilt meine Dankbarkeit für sein Angebot, unter seiner Supervision zu promovieren. Insbesondere schätze ich seinen konstruktiven Rat, seine kreativen Vorschläge und seine motivierende Einstellung.

Für kontinuierliche Hilfsbereitschaft und ideenreiche Diskussionen bin ich Herrn Prof. Dr. Marlon Veldwijk dankbar.

Dem Forschungsteam der Strahlentherapie, Miriam Bierbaum, Kaga Gomarteli, Adriana Grbeniček, Hui-Hui Ma, Marianne Hahn, Ali Karakoyun, Linda Hartmann, Anne Kirchner, Jens Kübler, Dominik Rath, Caroline Steenken, Junqi Liu, Xiaolei Liu und Yun Liu danke ich für die positive Stimmung im Arbeitsalltag.

Dem Team der Klinik für Strahlentherapie danke ich für die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit. Stefanie Uhlig danke ich für das Sortieren der Zellen; Dr. Julia Bucher bin ich dankbar für ihr Engagement beim Vermitteln konfokalmikroskopischer Grundlagen.

Allen anderen, nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Zentrums für medizinische Forschung danke ich für die stets freundliche Zusammenarbeit.

Meiner Familie bin ich dankbar für ihren Rückhalt durch alle Höhen und Tiefen. Meinem Lebenspartner Oliver gilt meine tiefe Dankbarkeit für seine bedingungslose Liebe, seinen Ansporn und seine unerschöpfliche Geduld und Zuversicht.