

***Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus
des Radioprotektors O-Phospho L-Tyrosin:
Wechselwirkungen von Phosphotyrosin mit
Aktivierungsprozessen des
Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Zoologie

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

vorgelegt von

Gabriele Wanner

aus Böblingen

2008

Die vorliegende Arbeit wurde am 02. September 2008 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. rer. nat. H.-Peter Rodemann
2. berichtende Person:	Prof. Dr. rer. nat. Harald Rösner

Eingereicht am: 28. Juni 2008

Mündliche Prüfung am: 25. September 2008

Vorwort

An dem Gelingen und der Vollendung dieser Arbeit trugen all diejenigen Menschen bei, die mich auf dem Weg dorthin motiviert und unterstützt haben.

Ihnen gilt dieser Dank:

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Rodemann für die interessante Fragestellung und die damit verbundene Betreuung meiner Arbeit. Sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die Bereitstellung eines außergewöhnlichen wissenschaftlichen Umfeldes trugen einen maßgeblichen Teil zur Realisierung dieses Projekts bei.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Rösner für die von ihm übernommene Gesamtbetreuung an der Universität Hohenheim und seinem stets kritischen Interesse an meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dittmann für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine Fähigkeit in allem etwas Gutes zu sehen.

Allen Mitarbeitern der Sektion für Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Tübingen möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit im Labor danken. Im Speziellen geht mein Dank an dieser Stelle an Claus Mayer; für seine Hilfestellung und seinen unermüdlichen Humor.

Mein innigster Dank gilt Martin Köhn, der mir immer zur Seite stand und eine stete Quelle der Motivation für mich war. Im selben Maße geht mein Dank an meine Eltern, ohne deren Verständnis und Unterstützung diese Arbeit nicht zustande hätte kommen können.

Der höchste Lohn für unsere Bemühungen ist nicht das was wir dafür bekommen, sondern das was wir daraus werden.

John Ruskin

Inhalt

1. Einleitung.....	3
1.1. Bedeutung und Nutzen von Radioprotektoren.....	4
1.1.1. Die Rolle von Phosphotyrosin in der Onkologie.....	7
1.2. Stellenwert des nukleären EGFR in der strahlen- und pTyr-induzierten Signalvermittlung.....	8
1.3. Zielsetzung.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Materialien.....	16
2.1.1. Zellen und Zellkulturmedium.....	16
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.3. Chemikalien.....	17
2.1.4. Geräte.....	17
2.1.5. Lösungen und Puffer.....	17
2.1.6. Inhibitoren/Analogon und siRNA.....	19
2.1.7. Primäre Antikörper.....	19
2.1.8. Sekundäre Antikörper.....	20
2.1.9. Kits.....	20
2.2. Methoden.....	20
2.2.1. Zellkultur.....	20
2.2.2. Bestrahlung.....	21
2.2.3. Koloniebildungstest.....	21
2.2.4. γ H2AX-Assay.....	21
2.2.5. Proteinaufarbeitung & Kernextraktion.....	22
2.2.6. Western Blot.....	22
2.2.7. In vitro Kinase-Aktivitäts-Test.....	23
2.2.8. Immunpräzipitation.....	23
2.2.9. Behandlung mit Inhibitoren und Phosphotyrosin.....	24
2.2.10. Transfektion mit spezifischer siRNA.....	24
2.2.11. PIP2-Quantifizierung.....	24
2.2.12. Präparaton von DNS-Protein-Komplexen (<i>Crosslinking</i>).....	25
2.2.13. Densitometrische Auswertung und Statistik.....	25
3. Ergebnisse.....	26
3.1. Radioprotektiver Effekt einer pTyr-Behandlung.....	26
3.1.1. Klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung.....	26
3.1.2. Einfluss von pTyr auf die Reparatur von residualen DNS-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung.....	28
3.2. Interaktion zwischen Phosphotyrosin und dem EGFR.....	29
3.2.1. Phosphotyrosin-vermittelte Akkumulation des EGFR im Zellkern.....	30
3.2.2. Strahlungseffekte auf den nukleären EGFR nach Phosphotyrosin-Vorbehandlung.....	31
3.2.3. Nukleäre Akkumulation des EGFR ist essentiell für die radioprotektive Aktivität von pTyr.....	33

3.3.	Wechselwirkung zwischen Phosphotyrosin und dem Ah-Rezeptor	34
3.3.1.	Die Hemmung der AhR-Proteinexpression beeinflusst die pTyr-stimulierte EGFR Akkumulation im Zellkern.....	36
3.4.	Effekt von Phosphotyrosin auf den Caveolin1-getriebenen EGFR Transport in den Zellkern.....	37
3.5.	pTyr moduliert das Phosphorylierungsmuster am EGFR.....	39
3.5.1.	Tyrosinphosphorylierung am EGFR nach pTyr und/oder ionisierender Strahlung	39
3.5.2.	pTyr-induzierte Phosphorylierung am Threoninrest 654 des EGFR.....	40
3.6.	Einfluss der Proteinkinase C ϵ auf die nukleäre Akkumulation des EGFR.....	42
3.6.1.	Identifikation der durch Phosphotyrosin-stimulierten PKC-Isoform.....	43
3.6.2.	Aktivierung der PKC ϵ durch Phosphotyrosin und durch ionisierende Strahlung.	44
3.6.3.	Einfluss der PKC ϵ -Hemmung auf nukleäre EGFR Akkumulation und Phosphotyrosin-vermittelte DNS-Reparatur.....	46
3.7.	Wechselbeziehung zwischen Diacylglycerol, der Diacylglycerol Kinase θ und dem nukleären EGFR.....	50
3.7.1.	Effekte einer Beeinflussung der Interaktion zwischen EGFR und DGK θ mittels Inhibitorbehandlung und siRNA Transfektion.....	51
3.7.2.	Einfluss von PIP2 und dessen Spaltprodukt Diacylglycerol auf den Aktivierungsstatus der PKC ϵ und die Akkumulation des EGFR im Zellkern.....	55
3.8.	Auswirkungen einer pTyr-Behandlung auf den Protein-DNS-Bindungsmechanismus nach Bestrahlung.....	57
3.8.1.	Eine pTyr-Behandlung beeinflusst nicht die Bindung des EGFR und der DNA-PK an die DNS.....	58
3.8.2.	Ionisierende Bestrahlung induziert Bindung des EGFR und der aktivierten DNA-PK an die DNS.....	58
3.8.3.	Eine pTyr-Vorbehandlung stimuliert die Bindung von Reparaturproteinen an die DNS nach Bestrahlung.....	59
4.	Diskussion.....	60
4.1.	pTyr verbessert das Überleben nach Bestrahlung durch Beeinflussung der DNS- Reparatur in wildtyp-TP53 Zelllinien.....	60
4.2.	pTyr-induzierte nukleäre EGFR-Akkumulation ist essentiell für seine radioprotektive Aktivität.....	61
4.3.	EGFR-assoziierte Signaltransduktion nach pTyr-Behandlung.....	63
4.4.	Abschließende Besprechung / Schlußfolgerungen	70
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Summary.....	74
7.	Abkürzungen.....	76
8.	Literaturverzeichnis.....	79
9.	Curriculum vitae.....	90

Einleitung

Ein Großteil der über 400.000 neu erfassten Krebserkrankungen pro Jahr in Deutschland werden mittlerweile mit Kombinationstherapien erfolgreich behandelt. Hierbei spielt neben dem operativen Eingriff und der chemo- und antihormontherapeutischen Behandlung die Strahlentherapie eine wichtige Rolle. Etwa 50% aller Patienten erhalten mittlerweile, je nach Indikation, eine spezifisch auf den Tumor und dessen Lage im Körper abgestimmte Bestrahlung, die in den meisten Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der Heilungs- und Überlebensraten beiträgt [1].

Ziel einer Strahlentherapie ist es das betroffene Areal möglichst präzise mit der ermittelten Dosis an Strahlung zu behandeln und somit den Tumor zu zerstören, ihn schrumpfen zu lassen oder nach einem chirurgischen Eingriff letzte Tumorzellen zu entfernen. Durch die Ausrichtung von energiereicher Strahlung (elektromagnetische oder Teilchenstrahlung,) auf örtlich begrenzte Tumorbereiche wird an die durchstrahlten Körperbereiche Energie abgegeben, was zur Veränderung von Zellbestandteilen führt. Eine entscheidende Wirkung der Strahlung auf die Zelle ist die Schädigung des Erbgutes durch Erzeugung von Brüchen in der DNS, was zum Verlust der Integrität der DNS und somit zum Absterben der Zelle führt. Strahlung bewirkt jedoch zusätzlich noch eine Vielzahl an Reaktionen, wie die Aktivierung spezifischer Reparaturprozesse, die Modulation des Migrationsverhaltens und die Anpassung des Differenzierungszustand der Zelle an die Situation. Zudem entstehen freie Radikale, die für die Zelle hoch toxisch sind und Wechselwirkungen mit Signalkomponenten eingehen. Auch kann Bestrahlung eine Zelle dazu führen in den programmierten Selbstmord, die Apoptose, zu gehen [2]. Diese Prozesse zeigen deutlich, dass neben der erwünschten DNS-Schädigungen im Tumorgewebe eine Vielzahl komplexer Signalvorgänge nach Bestrahlung in Gang gesetzt werden. Ein besserer Einblick in die Mechanismen dieser Signalimpulse könnte helfen ein größeres Verständnis für die Wirkung von Strahlung auf lebendes Gewebe zu erlangen.

Im Gegensatz zur Chemo- und Antihormontherapie, die systemisch auf den Körper einwirken, ist die therapeutische Bestrahlung von Tumoren auf ein sehr eingegrenztes Gebiet beschränkt. Ein limitierender Faktor bei der Wahl der Gesamtdosis für das jeweilige Tumorareal ist das umliegende Normalgewebe. Dieses befindet sich durch seine unmittelbare Lage um den Tumor noch im Strahlenfeld und wird trotz modernster Bestrahlungsplanung zwangsweise mitgeschädigt. Diese Schädigung von gesundem Gewebe resultiert in Nebenwirkungen, die sich

Einleitung

je nach Gewebe drastisch auswirken können. Jedes Organ besitzt eine eigene Dosis toleranz ab der Nebenwirkungen zu erwarten sind. In den letzten 30 Jahren wurde die Eingrenzung der zu bestrahlenden Tumorareale deutlich verbessert, was dazu führt, dass die heutige Hochpräzisionsbestrahlung deutlich geringere Nebenwirkung für das tumorumgebende Normalgewebe aufweist. Eine optimale Strahlendosis erreicht > 90% Tumornekrose und < 5% schwere Nebenwirkungen [3].

Die meisten der akuten Nebenwirkungen, wie Rötungen, thermische Effekte und vorübergehende Entzündungsreaktionen klingen nach Abschluss der Therapie wieder vollständig ab. Spätfolgen einer Strahlentherapie können sich aber binnen Monaten oder Jahren manifestieren und entstehen durch Zelluntergang, Atrophie, Schädigungen der versorgenden Blutgefäße oder neurologischen Schädigungen. Auf Schädigung des Gewebes durch Bestrahlung reagiert der Körper mit Heilungs- und Vernarbungsprozessen. Dieser Effekt kann durch die Stimulation von Differenzierungsprozessen von Fibroblasten mittels Bestrahlung erklärt werden, was in Geweben wie der Lunge zur Ausprägung von Fibrosen führen kann [4][5][6]. Darüber hinaus ist die Entstehung eines sogenannten sekundär Tumors im Bestrahlungsfeld eine mögliche Folgeerscheinung der Strahlentherapie.

Eine bessere Einsicht in die Prozesse, die in einer Zelle nach Bestrahlung ablaufen, könnte also helfen, Fragen über die individuelle Strahlensensibilität oder- resistenz einzelner Patienten zu beantworten und des Weiteren die Entwicklung spezifischer Normalgewebeprotektoren und radiosensitivierender Substanzen vorantreiben und somit der Strahlentherapie bzw. den Patienten entscheidende Vorteile bringen.

1.1. Bedeutung und Nutzen von Radioprotektoren

Normalgewebeprotektoren zeigen für die Strahlentherapie zwei entscheidende Vorteile auf: Zum einen die Senkung der Nebenwirkungsrate und zum anderen die Dosis eskalation bei verbesserter Strahlentoleranz des umliegenden Normalgewebes. In beiden Fällen führt eine Behandlung mit radioprotektiven Substanzen vor der Bestrahlung zu einer erhöhten Tumorkontrolle und einer Verminderung von akuten und/oder späten Schädigungen des umliegenden Normalgewebes.

Die in der Medizin verwendete Photonenstrahlung (Röntgenstrahlung/ionisierende Strahlung) entfaltet ihre Wirkung auf Zellen zu zwei Dritteln über Radikale und Peroxide, die durch Radiolyse des Wassers entstehen und zu einem Drittel über direkte, mechanische Schädigungen von Zellorganellen und der DNS [7]. Aus diesem Grund lag es schon sehr früh nahe gesundes

Gewebe mit Radikalfängern zu schützen. Substanzen wie Thiole [8], zu denen auch der einzig klinisch zugelassene Radioprotektor Amifostin (WR2721) zählt, und Vitamine [9] zeigen ihre Wirkung als Radioprotektoren durch die Verminderung der strahleninduzierten Menge an Radikalen in der Zelle. Sie sind damit in der Lage Schädigungen auf zellulärer Basis signifikant zu reduzieren. Für die Strahlentherapie ist Amifostin vor allem deshalb von höchstem Interesse, weil es mutmaßlich eine Spezifität für Normalgewebe aufweist [10]. Doch gibt es bereits erste Berichte die dieses widerlegen und ebenso Hinweise auf eine Protektion von Tumorgewebe aufzeigen [11].

Eine zweite Klasse von Radioprotektoren sind Substanzen, die in der Lage sind zelleigene Mechanismen der Radioprotektion positiv zu beeinflussen. Diese Substanzen entfalten ihre radioprotektive Wirkung in der Zelle durch Einwirkung auf jene Moleküle und Signalkomponenten, die für das Überleben der Zelle nach Bestrahlung eine maßgebliche Rolle spielen.

Eine Gruppe solcher Substanzen sind Wachstumsfaktoren wie z.B. KGF [12] und Interleukine wie z.B. Interleukin1 [13]. Diese besitzen jedoch nicht die Eigenschaft spezifisch Normalgewebe zu protektieren und haben aus diesem Grund einen ebenso schützenden Effekt auf Tumorgewebe. Da jedes Zellsystem unterschiedlich auf Wachstumsfaktoren und IL reagiert, können diese Substanzen bis heute nicht als klinisch relevante Radioprotektoren eingesetzt werden. Nichts desto trotz ist das Wissen um den molekularen Mechanismus der Radioprotektion ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis der differenziellen Antworten von verschiedenen Zelltypen auf Bestrahlung.

Die Zelle selbst besitzt viele unterschiedliche Mechanismen um mit Bestrahlung umzugehen und dadurch entstandene Schäden zu beheben. Ein essentieller Mechanismus der zelleigenen Radioprotektion ist die Stimulation von Reparaturprozessen nach strahleninduzierter Schädigung der DNS zur Steigerung der Überlebensrate. Radioprotektoren, die in der Lage sind diese zu stimulieren, zeigen zum Teil ihre Wirkung erst nach sehr hohen Strahlendosen, sind teilweise toxisch oder besitzen häufig einen instabilen Molekülaufbau [14]. Allen gemein ist, dass diese Radioprotektoren es bisher nur in präklinische Studien geschafft haben. Ein erfolgversprechender Vertreter dieser Gruppe, der in den bereits gezeigten Untersuchungen keine dieser negativen Nebeneffekte zeigte, ist der Bowman Birk Protease Inhibitor (BBI) [15]. Dieses 71 Aminosäuren lange Polypeptid steigert sowohl das klonogene Überleben in Fibroblasten nach Bestrahlung [16] als auch den therapeutischen Nutzen einer Strahlentherapie *in vivo* [17]. Der

Einleitung

radioprotektive Effekt von BBI wird in Abhängigkeit der Verfügbarkeit des Tumorsuppressors TP53 vermittelt [18]. Demzufolge erfahren Zellen mit mutiertem TP53 keine Radioprotektion. Da über 50% der humanen Tumoren ein mutiertes TP53 aufweisen [19][20], kommt ein Großteil von Tumoren für eine Kombinationsbehandlung mit Radioprotektor und Bestrahlung in Frage. Die radioprotektive Aktivität von BBI konnte auf die Stabilisierung des TP53 Proteins und die damit assoziierte transkriptionelle Aktivierung reparaturobligater Gene zurück geführt werden [18].

Ionisierende Strahlung kann viele Formen der DNS-Schädigung zur Folge haben. Jeder entstandene Schaden wird von der Zelle registriert und qualitativ beurteilt. Anschließend werden entsprechend der Schädigung der Zellzyklus gestoppt und spezifische Reparaturprozesse aktiviert oder die Zelle leitet die Apoptose ein bzw. wird nekrotisch („*to die or not to die*“-Strategie). Strahleninduzierte Schäden können in reparaturprofizienten Zellen binnen weniger Minuten oder Stunden durch verschiedene Prozesse repariert werden. So können Basen- und Einzelstrangschäden durch Excisionsmechanismen (BER, NER und MMR) fehlerfrei innerhalb weniger Minuten beseitigt werden.

Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die durch ionisierende Strahlung entstehen können (1Gy induziert ca. 20-40 DSBs), stehen der Zelle zwei Hauptreparaturmechanismen zur Verfügung. Die Homologe Rekombinationsreparatur (HRR) führt zu einer nahezu fehlerfreien Behebung des Doppelstrangbruches durch rekombinatorische Prozesse. Dies geschieht unter Zuhilfenahme des homologen Schwesterchromatids, welches jedoch nur in der späten S- und in der G2-Phase des Zellzyklus zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu führt das „*Non-Homologe Endjoining*“ (NHEJ) zu einer Verknüpfung der offenen Bruchenden und ist somit nicht fehlerfrei. Diese Art der Reparatur kann jedoch auch durchgeführt werden, wenn sich die Zelle in der G0/G1- oder der S-Phase befindet. Ein fehlerhafter Ablauf dieses Reparaturmechanismus, sog. Missreparatur, führt zu Entstehung von dizentrischen Chromosomen [7]. Eine Reduktion dieser Missreparaturen im Normalgewebe durch eine Verbesserung des NHEJ stellt eine qualitative Besserung der DNS-Reparatur dar.

Für BBI konnte nachgewiesen werden, dass sein positiver Einfluss auf das NHEJ mittels Aktivierung der DNS-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) vermittelt wird [21]. Die Anwesenheit dieses Proteins am DNS-Schaden und im Speziellen dessen Aktivierungszustand spielt eine essentielle und somit maßgeblich eine qualitativ beeinflussende Rolle in der nicht homologen DNS-Reparatur (NHEJ) [22][23].

In früheren Untersuchungen wurde aus dem Bowman-Birk-Protease-Inhibitor das aktive Zentrum isoliert. Die abgespaltene Sequenz aus fünf Aminosäuren zeigte den entsprechend auch von BBI vermittelten radioprotektiven Effekt auf das klonogene Überleben von humanen Hautfibroblasten [24]. In weiteren Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin für den radioprotektiven Effekt essentiell war. Phosphorylierte Formen der Aminosäuren Serin und Threonin zeigten nicht die gewünschte Wirkung [25]. Interessanterweise weist auch **Phosphotyrosin (pTyr)**, das aus BBI isolierte Aminosäurederivat, seine radioprotektive Aktivität nur in wildtyp-TP53 Zellen, nicht jedoch in Zellen mit mutiertem TP53 auf. Diese funktionellen Parallelen zwischen BBI und pTyr legen einen verwandten Wirkmechanismus dieser beider Substanzen nahe. Mit seiner Normalgewebespezifität zählt auch pTyr zu einem der vielversprechenden neuen Vertreter in der Gruppe der Radioprotektoren, die in der Radioonkologie Verwendung finden könnten.

1.1.1. Die Rolle von Phosphotyrosin in der Onkologie

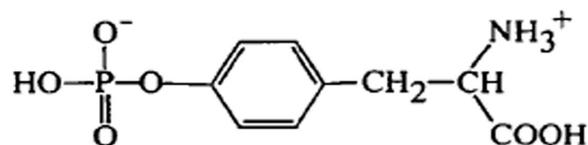


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung von O-Phospho L-Tyrosin (pTyr)

Bereits vor 15 Jahren berichtete die Arbeitsgruppe um Mishra, dass eine Inkubation von Tumorzellen mit pTyr in millimolaren Konzentrationen *in vitro* zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation führt [26]. Die beobachtete Hemmung ging mit einer Reduktion der EGF induzierten Tyrosinphosphorylierung am Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) einher. Diese beiden Feststellungen decken sich dahingehend, dass eine EGF-vermittelte Phosphorylierung am EGFR essentiell für die proliferations-assoziierte Signaltransduktion ist. Als einen möglichen Mechanismus der pTyr-induzierten Proliferationshemmung wurde eine Aktivierung der Phosphatasen nach pTyr Inkubation diskutiert, da dieses Aminosäurederivat ein Substrat für verschiedene Phosphatasen darstellt. Die mittels pTyr aktivierten Phosphatasen wurden als mögliche Regulatoren des Phosphorylierungszustandes des EGFR nach EGF Behandlung diskutiert [27].

Aufgrund eigener Vorarbeiten aus unserem Labor konnte pTyr jedoch auch eine radioprotektive

Einleitung

Aktivität in wildtyp TP53-Zellen zugewiesen werden [24][25]. Im millimolaren Konzentrationsbereich führte eine pTyr Behandlung von Tumorzellen in Kombination mit Bestrahlung zu einer Radiosensitivierung, was im Fall von Normalgewebszellen nicht nachweisbar war. Im mikromolaren Bereich jedoch zeigte pTyr sowohl in Normalzellen als auch in wiltyp-TP53 Tumorzellen einen signifikant radioprotektiven Effekt in Kombination mit ionisierender Bestrahlung, nicht aber in Tumorzelllinien, die ein mutiertes TP53 trugen. Die radioprotektive Aktivität von pTyr konnte unter diesen Bedingungen mit der Stabilisierung des TP53 Proteins nach pTyr Inkubation korreliert werden [25].

In vivo Daten mit dem wirkverwandten BBI bestätigten die selektive, radioprotektive Aktivität im Normalgewebe von C3H-Mäusen mittels Beinverkürzung-Tests („*leg contracture assays*“). Die durch Bestrahlung induzierten fibrotischen Prozesse konnten durch eine Präinkubationsphase mit BBI signifikant reduziert werden. Eine unerwünschte Protektion von bestrahltem Tumorgewebe und somit die Normalgewebsspezifität von BBI konnte mittels Tumorwachstumsverzögerungs-Tests („*tumor growth delay assays*“) nachgewiesen werden [17]. Entsprechend der Wirkungsverwandtschaft zwischen BBI und pTyr deuten erste *in vivo* Daten mit pTyr im Xenograft-Modell mit C2Hf/KAM-Mäusen ebenfalls auf eine selektive Normalgewebsspezifität hin (K. Dittmann, persönliche Mitteilung).

Die Berichte von Mishra et al. [27] und eigene erste Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus der pTyr-vermittelten Radioprotektion zeigten einen signifikanten Effekt auf den epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Nach eigenen Vorarbeiten in unserem Labor konnte der EGFR als ein in die pTyr-vermittelten Radioprotektion involvierte Signalkomponente identifiziert werden, welche eine Schlüsselrolle in der pTyr-assozierten Signaltransduktion spielt [28].

1.2. Stellenwert des nukleären EGFR in der strahlen- und pTyr-induzierten Signalvermittlung

Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist ein Mitglied der Erb-Familie und spielt als Transmembranprotein eine wichtige Rolle bei Signalvermittlungsprozessen innerhalb verschiedenster Zelltypen in nahezu allen Geweben. Als membranständige Rezeptortyrosinkinase ist der EGFR in der Lage liganden-induzierte Signale mittels Dimerisierung und Modifikation des Phosphorylierungszustandes („Aktivierung“) in die Zelle sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär weiterzuleiten [29][30][31][32]. Die Modifikation am

Phosphorylierungsmusters des EGFR stimuliert die Aktivierung intrinsischer Prozesse und Signalkaskaden durch Beeinflussung und Bindung anderer beteiligter Proteine und Signalkomponenten [33][34].

Eine essentielle Rolle spielt der EGFR in der Vermittlung von Signalen, die die Differenzierung, das Zellwachstum und -überleben regulieren [35]. Tatsächlich konnte in den letzten Jahren eine Überexpression des EGFR mit Tumorprogression, Tumorentwicklung, dem Überleben und dem Therapieansprechen korreliert werden [36][37]. Aber auch andere Prozesse der Tumorprogression wie Angiogenese, Metastasierung und Radio-/Chemoresistenz konnten mit einer EGFR-Überexpression in Zusammenhang gebracht werden [38][39][40]. Für bestimmte Tumorentitäten korreliert die „*outcome*“-Prädiktion bezüglich Entwicklung, Progression und Therapieansprechen mit dem Expressionsmusters des EGFR [41][42][43][44][45].

Durch Behandlung mit verschiedensten Noxen (UV, Chemikalien, Hitze und Bestrahlung) kann der EGFR aber auch liganden-unabhängig phosphoryliert/aktiviert werden [46][47].

Insbesondere in der Radioonkologie spielt diese liganden-unabhängige EGFR-assoziierte Signaltransduktion eine bedeutende Rolle, da diese mit dem Überleben nach Bestrahlung in Verbindung gebracht wird [48][49][50][51].

Eine zentrale Schaltstelle für die nach Bestrahlung induzierte Stressantwort der Zelle scheint eine EGFR-assoziierte Aktivierung von DNS-Reparaturprozessen zu sein [52]. Dass der EGFR nicht nur eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation spielt sondern eine ebenso wichtige in der des Zellüberlebens und der DNS-Reparatur ist in mehreren Berichten bereits beschrieben [53][54][55][56][57]. Neben der Aktivierung der EGFR-abhängigen cytoplasmatischen Signalketten, ist nach Bestrahlung der Transport des EGFR in den Zellkern ein wichtiger Mechanismus zur Stimulation der DNS-Proteinkinase (DNA-PK), die eines der Schlüsselproteine für die DNS-Reparatur nach Bestrahlung darstellt [58][59][60].

Dass dieser Mechanismus tatsächlich EGFR abhängig durch Bestrahlung stimuliert wird, konnte von unserer Arbeitsgruppe mittels dem spezifischen EGFR Antikörper C225 (Cetuximab) bereits beschrieben werden [61]. Eine Hemmung der strahleninduzierten EGFR Translokalisierung in den Zellkern durch C225 führte zu einer Reduktion der DNA-PK Aktivität, was eine signifikante Strahlensensibilisierung der untersuchten Zellen zur Folge hatte.

Auch im Falle einer BBI Behandlung konnte gezeigt werden, dass dieser Radioprotektor initial mit dem EGFR interagiert [62] und diesen liganden-unabhängig phosphoryliert. Aufgrund der

Einleitung

naheliegenden, funktionellen Parallelen zwischen BBI und pTyr wurde ein verwandter Wirkmechanismus dieser beiden Substanzen bezüglich eine EGFR-Interaktion untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde beschrieben, dass eine pTyr Inkubation, analog zu BBI, in der Lage war den EGFR liganden-unabhängig zu phosphorylieren und somit eine pTyr-induzierte EGFR-assozierte Signaltransduktion in Gang zu setzen [28]. Eine nähere Betrachtung und Aufklärung des Mechanismus der pTyr-induzierten nukleären Akkumulation des EGFR durch dessen liganden-unabhängig induzierte Modulation des Phosphorylierungsmusters war Teil dieser Arbeit.

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Weg der pTyr-induzierten Signalvermittlung beinhaltet Interaktionen verschiedener Signalkomponenten sowohl in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelle als auch im Zellkern.

In diesem Zusammenhang könnte der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) eine der Initialkomponenten der pTyr-vermittelten Signaltransduktion sein. Er ist ein cytosolisch, liganden-abhängiger Rezeptor, der in der Lage ist polyzyklische Aromaten als Liganden zu binden [63]. Nach Aktivierung setzt der AhR eine Signalkaskade in Gang, die mit einer Aktivierung und anschließender Abspaltung der c-Src Kinase aus dem AhR-Proteinkomplex im Cytoplasma gekoppelt ist [64]. Der AhR selber transloziert in den Zellkern, wo er mit seinem Partner ARNT dimerisiert und als Transkriptionsfaktor verschiedene Gene aktiviert [65]. Die Abspaltung der aktivierten c-Src Kinase aus dem liganden-aktivierten AhR-Komplex induziert eine Translokation an die Zellmembran, wo sie beschrieben ist, den EGFR zu phosphorylieren/aktivieren und im Weiteren eine EGFR-assozierte Signalkaskade zu induzieren [66].

Dass die Aktivierung des Ah-Rezeptors und die damit nachgeschaltete Signalvermittlung nicht nur durch aromatische Kohlenwasserstoffe wie zum Beispiel TCDD, sondern auch durch UV-Strahlung induziert werden kann, wurde bereits beschrieben [67]. Erste unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen ebenso eine Stabilisierung und Aktivierung des Rezeptors und damit eine Aktivierung der Src-Kinase nach ionisierender Strahlung im Cytoplasma. Eine pTyr-induzierte Aktivierung der Src-Kinase wäre ebenfalls durch eine Aktivierung des AhR und eine daraus folgende Abspaltung der Src-Kinase denkbar. Wie in Abbildung 1.2. zu sehen, könnte eine mögliche Interaktion zwischen dem Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) und pTyr eine der ersten Schritte in der pTyr-induzierten Signalkaskade sein.

Lombardo et al. schilderte bereits 1995 eine Interaktion zwischen der c-Src-Kinase und dem

EGFR. Die Phosphorylierung des EGFR an spezifischen Tyrosinpositionen ist mit der Aktivierung des Rezeptors verknüpft [33]. Inwiefern diese Interaktion eine Rolle auf das EGFR-assoziierte „*Signalling*“ in der Zelle spielt, konnte damals noch nicht endgültig beantwortet werden. Denkbar wäre eine Signalweitergabe mittels einer Src-vermittelten Internalisierung des phosphorylierten EGFR in Caveolae. Volonte et al. beschreibt als zelluläre Stressantwort eine c-Src-vermittelte Aktivierung mittels einer Tyrosinphosphorylierung am Caveolin 1 an der Position 14 [68]. Die Arbeitsgruppe um Khan berichtet in diesem Zusammenhang, dass der EGFR eine vom Phosphorylierungsstatus abhängige Caveolin1-Internalisierung durchlaufen kann, die nach liganden-unabhängiger Aktivierung initialisiert wird [69]. Unter diesen Bedingungen wird der EGFR in perinukleäre Kompartimente transportiert, wo er funktionell eine gewisse Zeit stabil vorliegt. Erste Daten aus unserem Labor zeigen, dass dieser Weg der EGFR Internalisierung auch nach Bestrahlung begangen wird und als Folge eine Anhäufung des EGFR im perinukleären Kompartiment zu beobachten ist (K. Dittmann, persönliche Mitteilung).

Beim Transport des EGFR und anderer Proteine in den Zellkern spielen spezielle Transporterproteine eine ausschlaggebende Rolle. Eine strahleninduzierte Komplexbildung zwischen dem nukleären EGFR und dem Transportprotein Karyopherin α wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt [58]. Von Mosammaparast et al. wurde beschrieben, dass Karyopherine mittels Phosphorylierung an spezifischen, nukleären Lokalisationssequenzen (*Nuclear localization sequence*; NLS) binden und mit diesem Mechanismus Kerntransporte verschiedener Proteine reguliert werden können [70]. Wie von Hsu et al. nachgewiesen, ist die NLS in allen Mitgliedern der ErbB-Familie hochkonserviert [71]. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass diese Sequenz ausschlaggebend für alle ErbB- Mitglieder ist, um in den Zellkern transloziert zu werden. Die NLS des EGFR [72] beinhaltet eine Threoninphosphorylierungsstelle an der Position 654, die von uns als strahlungs-assoziierte Phosphorylierung identifiziert werden konnte [28]. Nach Behandlung mit pTyr und Bestrahlung findet sich diese Phosphorylierung am EGFR ausschließlich im Zellkern und korreliert mit dessen Akkumulation.

Es wurde von verschiedenen Autoren beschrieben, dass für die Phosphorylierung am Threoninrest Nr. 654 des EGFR eine der Isoformen der Protein Kinase C verantwortlich ist [73] [74]. Wir konnten zeigen, dass sowohl die Phosphorylierung am T654 des nukleären EGFR als auch seine damit assoziierte Akkumulation im Zellkern durch Aktivierung der kernständigen PKC ϵ reguliert wird [75]. Auch für die damit verknüpfte Aktivierung der DNA-PK nach Bestrahlung scheint der Aktivierungszustand der PKC ϵ eine essentielle Rolle zu spielen. Die

Einleitung

Akkumulation des EGFR im Zellkern und die damit assoziierte Stimulation der DNS-Reparatur wird durch die Modifikation des Aktivierungszustandes der kernständigen PKC ϵ nach Bestrahlung und pTyr-Behandlung gesteuert. Somit spielt die PKC ϵ in der pTyr und strahlenvermittelten Zellantwort eine entscheidende Rolle.

Die Aktivität der Proteinkinase C kann je nach Subfamilie durch den intrazellulären Calciumspiegel oder das Phospholipid Diacylglycerol (DAG) gesteuert werden [76][77]. Die zur Subfamilie der neuartigen PKC-Isoformen gehörende PKC ϵ ist Calcium unabhängig und wird ausschließlich durch den „*Second messenger*“ DAG aktiviert. DAG ist wiederum das Substrat für DAG Kinasen (DGKs) und spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der verschiedenen Proteinkinase C Isoformen und anderer Signalvermittlungsprozesse [78]. Das Glycerolipid DAG ist ein Spaltprodukt des Phospholipids Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂). Die Regulation des PIP₂-Gehaltes ist aufgrund der vielfältigen Interaktionen in der Zelle streng reguliert, kann jedoch auf verschiedenste Arten beeinflusst werden [79][80]. In Säugerzellen wird PIP₂ von zwei Kinasen synthetisiert. Im ersten Schritt wird über eine membranständige PI-4-Kinase aus Phosphatidylinositol (PI) Phosphatidylinositol-Phosphat (PIP). PI wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und an die innere Plasmamembran transferiert, in welcher PIP synthetisiert wird. PIP wird dann von Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase (PIP5K) zu PIP₂ phosphoryliert [81]. Auch die Phosphorylierung/Aktivierung der PIP5-Kinase geschieht im ER und deutet somit auf die Rolle der PIP₂ Synthese im perinukleären Bereich hin [82]. Eine große Anzahl an verschiedensten chemischen Substanzen, wie der epidermale Wachstumsfaktor EGF [83], Phosphatasen [84] und Phorbolster [85] wurden bereits als regulativ wirkende Faktoren in der PIP₂-Synthese beschrieben. Aber auch im Zellkern spielt die PIP₂-Regulation durch verschiedene Kinasen eine wichtige Rolle [86]. Die Aktivierung der PIP5-Kinase und damit die Stimulation der PIP₂-Synthese kann unter anderem auch durch Phosphatidsäure (PA) aktiviert werden [87]. PA ist das Spaltprodukt der DGK-Phosphorylierung von DAG in Phosphatidsäure (PA). Somit ist die Regulation des PA-Spiegels in der Zelle ebenfalls einer der wichtigen Faktoren in der Generierung von PIP₂ und der darauf folgenden Signalkaskade.

PIP₂ selbst wird durch Hydrolasen wie z.B. die Phospholipase C in DAG und Inositoltriphosphat (IP₃) umgesetzt wird. Die Phospholipase C Familie gehört zur Klasse der Phospholipasen, hat aber zusätzlich ein Cholin eingebaut und wird in annähernd allen Geweben sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär exprimiert [88][89]. Es sind 10 Isoformen der PLC bekannt (ausgenommen alternative Splicevarianten), welche sich in Struktur, Substrataffinität,

Expressionsmuster und Einfluss auf intrazelluläre Signalprozesse unterscheiden.

Als wichtiger „*Second Messenger*“ erfüllt DAG viele Rollen in der Signalvermittlung verschiedenster Zellen [90]. Ein limitierender Faktor der Erzeugung von DAG und der damit verbundenen Signalvermittlung ist die Aktivität der Diacylglycerolkinasen (DGKs).

Diacylglycerolkinasen katalysieren die Phosphorylierung des Diacylglycerols (DAG) zu Phosphatidsäure (*Phosphatidic Acid*; PA) [91] und sind somit in der Lage DAG-vermittelte Signalkaskaden zu hemmen. Es sind bereits 9 Isoformen in verschiedenen Zelltypen und Geweben nachgewiesen worden, was ihre funktionelle Signifikanz verdeutlicht aber auch ihre Komplexität und große Varianz in zellulären Funktionsprozessen hervorhebt [92]. Ein weiterer Punkt der Diversität in der Familie der DGKs ist die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Isoformen. So sind DGKs in nukleären und perinukleären Kompartimenten gefunden worden, wo sie einem aktiven Transport in den Zellkern unterliegen und dort eine funktionelle Bedeutung bei intrazellulären Prozessen besitzen [93]. Die DGK Aktivität konnte nicht nur in der Zellmembran, sondern auch im Cytoskelett und dem Zellkern gezeigt werden [94]. Aufgrund dieser Fähigkeit besitzen die DGKs eine bedeutende Aufgabe in der Regulierung der DAG-assoziierten Signalvermittlungsprozesse.

Dass DGKs Auswirkungen auf die Regulation der Aktivität von PKCs und die damit verknüpfte Beeinflussung der Phosphorylierung des EGFR haben können, zeigte Crotty et al. [95] im Zusammenhang mit der Isoform DGK δ . Ebenso konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass eine Hemmung der DGK Proteinexpression zu einer Steigerung der PKC Aktivität und damit assoziiert zu einer Modulation des Phosphorylierungsmusters des EGFR am T654 führte.

Die Arbeitsgruppe um Carsberg beschrieb 1995 bereits den stimulierenden Einfluss von UV-Strahlung auf die Generierung der DAG-Menge in humanen Keratinocyten und Melanocyten [96]. Im Fall einer Behandlung von primären Rattenhepatocyten mit ionisierender Strahlung konnte ebenfalls eine strahleninduzierte Zunahme des DAG-Levels nachgewiesen werden [97]. In diesem Zusammenhang wurde die Aktivierung der Phospholipasen nach Bestrahlung als ein möglicher Induktor und Generator des DAG diskutiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der folgenden Untersuchung der Einfluss einer Modulation der intrazellulären DAG-Menge auf die nachgeschaltete PKC ϵ -Aktivierung und die damit assoziierte EGFR Translokation in den Zellkern nach Bestrahlung oder pTyr-Inkubation untersucht.

In Abbildung 1.2. ist eine Illustration der möglichen Signalvermittlung durch eine pTyr-Behandlung dargestellt. Aufgrund der im Folgenden vorgestellten Daten wird dieses Schema als

Einleitung

möglicher Wirkmechanismus der pTyr-vermittelten Radioprotektion diskutiert.

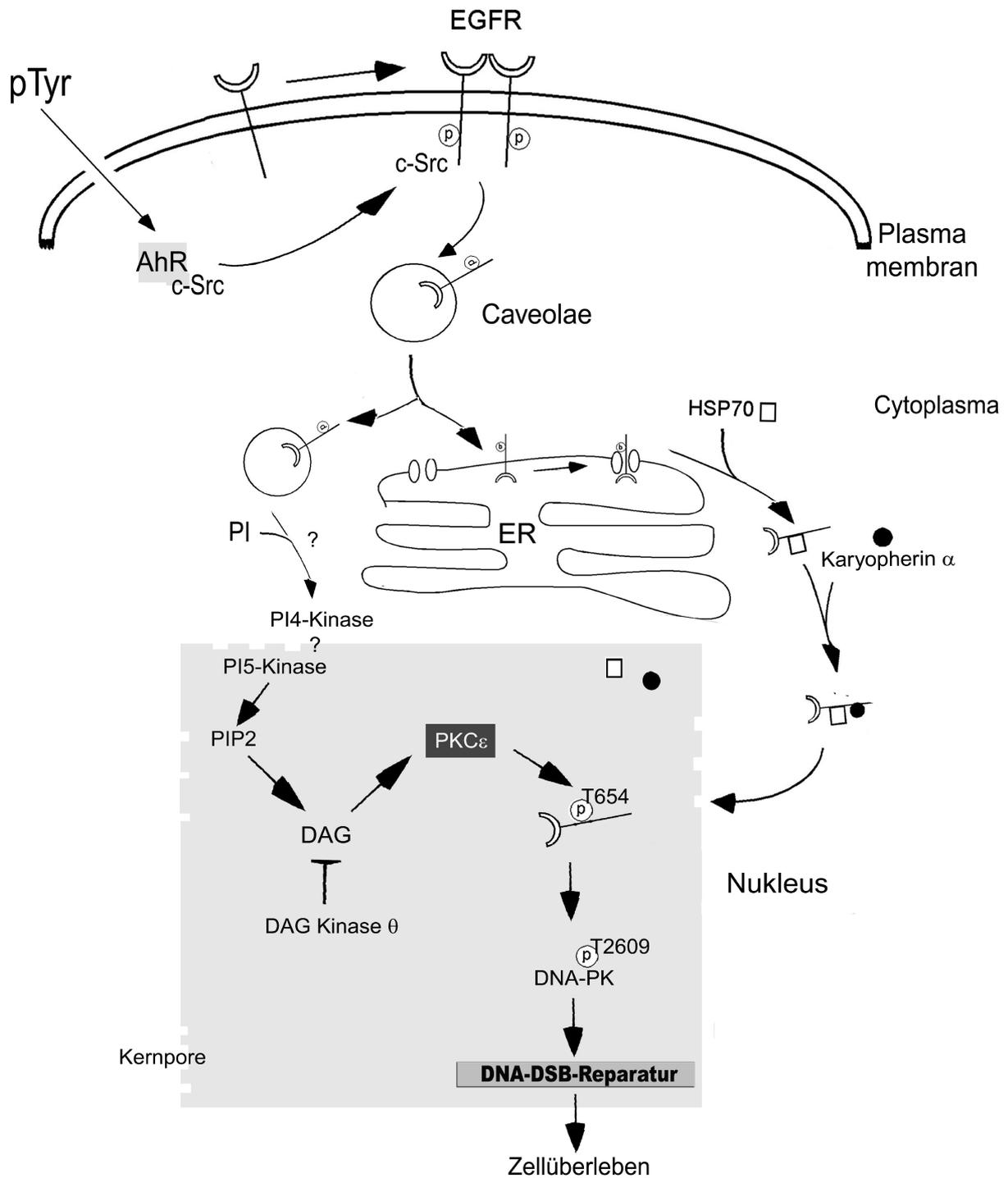


Abb. 1.2.: Schematische Illustration des möglichen molekularen Wirkmechanismus der pTyr-vermittelten Radioprotektion (modifiziert nach einem Schema von Liao et al. [98]).

1.3. Zielsetzung

Die limitierenden Faktoren der modernen Radioonkologie sind unerwünschte Nebeneffekte auf das tumorumgebende Normalgewebe, welche zu akuten und späten Schädigungen führen können. Die Vielzahl an molekularen Signalkaskaden, die durch Bestrahlung induziert werden, steuern die positive oder negative Wirkung einer radioonkologischen Therapie sowohl auf Tumor- als auch auf gesundes Gewebe. Durch den Einsatz spezifischer Normalgewebsschutzmittel könnte die Effizienz einer solchen Therapie deutlich verbessert und schwere Schädigungen im umliegenden Gewebe reduziert werden. Im weiteren trägt ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen solcher Substanzen dazu bei die Aufklärung der strahlenvermittelten Signalwege voran zu treiben.

Die vorliegende Arbeit widmet sich daher hauptsächlich der Fragestellung, ob das aus BBI isolierte Aminosäurederivat **O-Phospho L-Tyrosin (pTyr)** in der Lage ist spezifisch das Überleben von Normalzellen nach Bestrahlung zu verbessern. Erste Vorarbeiten zeigten bereits eine Interaktion zwischen pTyr und der EGFR-assoziierten Signaltransduktion, welche in Zusammenhang mit der strahleninduzierten DNS-Reparatur diskutiert wurde [58]. Ausgehend von einer direkten Beeinflussung der DNS-Reparatur durch pTyr, sollte der molekulare Wirkmechanismus näher untersucht und Signalwege identifiziert werden, deren Aktivität durch eine pTyr-Behandlung positiv auf das Überleben nach Bestrahlung Einfluß nehmen.

Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

1. Moduliert eine Behandlung mit pTyr positiv das Überleben durch Beeinflussung der DNS-Reparatur in verschiedenen Zelllinien nach Bestrahlung?
2. Welche Rolle spielt der EGFR-assoziierte Signalweg in der pTyr-vermittelten Radioprotektion?
3. Wie wird der pTyr-induzierte Transport des EGFR in den Zellkern reguliert und welchen Einfluss hat dies auf die DNS-Reparatur?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zellen und Zellkulturmedium

Es wurden folgende etablierte Zelllinien für die Versuche verwendet:

Zelllinie	Quelle	Herkunft
HSF7	Hautfibroblasten (human)	
A549	Lungenkarzinom (human)	ATCC; CCL 185
A172	Glioblastom (human)	ATCC; CRL 1620
FaDu	Plattenepithelkarzinom (human)	ATCC; HTB-43
MDA-MB-231	Brustkrebs (human)	ATCC; HTB-131

Zur Kultivierung aller verwendeten Zelllinien wurde Dullbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco verwendet, dem 44 mM NaHCO₃ (Biochrom AG) beigelegt wurde. Dem Medium wurde außerdem 10% fötales Kälberserum (FCS) von PAN Biotech und 1% Penicillin und Streptomycin (Gibco) zugesetzt.

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Zellkulturwaren	BD Falcon
Nitrocellulose Membran (Optitran)	Schleicher-Schuell
Whatmann Papier	Schleicher-Schuell
ECL Detection Kit	Amersham Bioscience
Proteinbestimmungs-kit	BioRad
96 well Platten	Nunc
Phosphataseinhibitor-Cocktail I	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitoren	Roche
Röntgen Filme	AGFA
Sterilfilter 0,22µM	Sartorius
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen
Protein-A-Sepharose	AmershamBioscience
Sterile Filtertips	Greiner BioOne

2.1.3. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Roth, Applichem, Serva, BioRad, Amersham oder Pharmacia Biotech bezogen und hatten, sofern notwendig, p.a. Qualität.

2.1.4. Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifugen	Eppendorf
Gelelektrophorese-Kammer	Hofer
Tank Blot-Apparatur	Pharmacia
Röntgenbestrahlungseinheit (RS-225)	Gulmay
ELISA-Reader	Anthos Labtec
SpeedVac Zentrifuge	Bachofer
Axiovert Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

2.1.5. Lösungen und Puffer

Coomassie^R-Blau-Färbelösung:

50% Methanol
10% Eisessig
0,25% Coomassie^R

Giensa-Lösung (pH7,3):

194ml SörA (9,078g KH₂PO₄ pro 1l H₂O)
306ml SörB (11,876g KH₂PO₄ pro 1l H₂O)
20ml Giensa Konzentrat

Lysispuffer (pH8,0):

1% NP40
0,87g NaCl
0,6g Tris base
ad 100ml H₂O

Kernextraktionspuffer (PufferA):

100µl 1M HEPES
40µl 2,5M KCl
12µl 0,5M EDTA
ad 10ml H₂O

Material und Methoden

<u>SDS-Probenpuffer (2x):</u>	20ml Glycerin 2g SDS 10mg Bromphenolblau 24ml Sammelgelpuffer (4x) 5,4ml β -Mercaptoethanol ad 100ml H ₂ O
<u>Trenngelpuffer (pH8,8):</u>	90,85g Tris Base 2g SDS ad 500ml H ₂ O
<u>Sammelgelpuffer (pH6,8):</u>	30,3g Tris Base 2g SDS ad 500ml H ₂ O
<u>Laufpuffer:</u>	115,2g Glycin 24g Tris Base 4g SDS ad 4l H ₂ O
<u>Blottingpuffer:</u>	1l Methanol 29g Tris Base 14,5g Glycin 1,85g SDS ad 4l H ₂ O
<u>Stripping-Puffer (pH2,2):</u>	4,5g Glycin 0,3g SDS 3ml Tween20 ad 300ml H ₂ O
<u>PBS (pH7,4):</u>	13,7mM NaCl 2,7mM KCl 80,9mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄
<u>Waschpuffer (Western Blot):</u>	1l PBS

0,1% Tween20

Reaktionspuffer (Kinase-Assay):

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl

1% Triton X-100

0.5% Na-Deoxycholat

0.25 mM EDTA pH 8.0

0.12 mM $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP**2.1.6. Inhibitoren/Analogon und siRNA**

Name	Spezifität	IC ₅₀	Konzentration (nM)	Firma
Calphostin C	PKC Inhibitor	50nM	100	BIOMOL
C225 (Cetuximab)	EGFR antibody	---	30	Merck
R59949	DGK inhibitor	300nM	600	Calbiochem
OAG (1-Oleoyl-2-Acetyl-SN-Glycerol)	DAG Analog	---	20.000	Cayman Chemical

Si-RNA	Sense	Anti-sense	Konzentration (nM)	Firma
AhR-siRNA	ACAUAUCCAG CUGAAUUA	UAAUUCAGC UGGAUAUGU	30	MWG Biotech AG
PKC ϵ -siRNA	GGAAGAGUGU AUGUGAUC	UGAUCACAUA CACUCUCC	30	MWG Biotech AG
DGK θ -siRNA	GGAGGUCCUG AAGAUCUAC	GUAGAUCUUC AGGACCUCC	30	MWG Biotech AG
Kontroll-siRNA	UUCUCCGAAC GUGUCACGU	ACGUGACACG UUCGGAGAA	30	MWG Biotech AG

2.1.7. Primäre Antikörper

Anitgen	Herkunft	Hersteller
EGFR	Maus, monoklonal	BD Falcon
EGFR pT654	Maus, monoklonal	NanoTools

Material und Methoden

EGFR pY1045	Maus, monoklonal	NanoTools
EGFR py845	Maus, monoklonal	NanoTools
PKCε	Maus, monoklonal	BD Falcon
PKCε pS729	Kaninchen, polyklonal	GeneTEX Inc
Lamin B1	Maus, monoklonal	Biozol
Aktin	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich
Caveolin 1	Maus, monoklonal	BD Falcon
Caveolin 1 pY14	Maus, monoklonal	BD Falcon
Ah Rezeptor	Maus, monoklonal	Abcam
c-Src Kinase	Maus, monoklonal	Santa Cruz
c-Src Kinase pY416	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
DNA-PK	Maus, monoklonal	Dianova
DNA.PK pT2609	Kaninchen, polyklonal	Rockland
DAG Kinase θ	Maus, monoklonal	BD Falcon
Histon H2AX pS139	Maus, monoklonal	Upstate

2.1.8. Sekundäre Antikörper

Anti-Maus-IgG	Ziege	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma
Anti-Maus-IgG (Alexa)	Ziege	Molecular Probes

2.1.9. Kits

Das PIP₂-Quantifizierungskit wurde von der Firma Echelon Inc. (Artikelnummer K-3400) bezogen und die Puffer nach den Anweisungen des Herstellers hergestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in wasserdampfgesättigten Brutschränken (Binder) bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert und kultiviert. Die Tumorzelllinien wurden einmal wöchentlich passagiert und nur im konfluenten Zustand für die Versuche verwendet. Im Fall der humanen Hautfibroblasten (HSF7) wurde alle 3 bis 4 Tage das Medium gewechselt und die Zellen, wenn nötig, entsprechend ihrer PD und CPD passagiert oder zum Versuch verwendet. Es wurden nur

Zellpassagen bis zu einer CPD von max. 18 benutzt.

2.2.2. Bestrahlung

Die Bestrahlung aller Zellen erfolgte im Röntgengenerator R225 von Gulmay mittels Röntgenstrahlung/ 225kV Photonen bei einer Dosisleistung von 1Gy/Minute. Unerwünschte Quensheffekte wurden durch einen 3mm starken Aluminiumfilter ausgefiltert. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Grundeinstellung der Röhre von 100kV und 15mA.

2.2.3. Koloniebildungstest

Um die klonogene Überlebensrate verschiedener Zelllinien nach Bestrahlung und /oder Behandlung mit unterschiedlicher Substanzen zu bestimmen, wurden bei allen Tumorzelllinien 500 Zellen in Ø100mm Zellkulturschalen bei 20% FCS im Medium ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Erst danach wurden sie entsprechend dem Protokoll behandelt oder bestrahlt. Alternativ wurden jeweils 250 Zellen pro well in 6-well Schalen ausgesät. Die humanen Fibroblasten wurden ebenfalls in Ø100mm Schalen (1500 Zellen pro Schale) bei 20%FCS ausgesät und 24 Stunden später behandelt und/oder bestrahlt.

Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Kulturschalen mit Formaldehyd und Ethanol fixiert und anschließend für eine Minute in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Die Koloniebildungsassays in denen humane Fibroblasten verwendet wurden, wurden zusätzlich noch mit Giemsa gegen gefärbt. Im Anschluss wurden alle Präparate gut gewässert und im Trockenofen bei 50°C getrocknet. Unter dem Binokular wurden nur Kolonien > als 50 Zellen pro Kolonie ausgezählt und anschließend das klonogene Überleben mittels einer halblogarithmischen aufgetragenen Überlebenskurve im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle festgestellt. Pro Versuchsbedingung wurden mindestens drei Schalen ausgezählt.

2.2.4. γ H2AX-Assay

Um die Anzahl an residualen DNS-Doppelstrangbrüchen mit positiven γ H2AX-Fokus nach Bestrahlung unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurden Zellen auf spezielle Zellkulturobjektträger ausgesät (BD Falcon) und im Brutschrank bis zum Erlangen der vollständigen Konfluenz inkubiert. Vor der Bestrahlung wurden die Zellen für 16 Stunden mit pTyr behandelt. Die Transfektionen wurden noch vor der pTyr-Behandlung durchgeführt. In allen Versuchen wurden die Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung in 70%igem Ethanol fixiert

Material und Methoden

und erst für die Immunfluoreszenzfärbung mit dem γ H2AX-spezifischen Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um positive Foki im Zellkern zu markieren wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem spezifischen sekundär Antikörper (488-Alexa) markiert und anschließend die DNS mittels einer DAPI Gegenfärbung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert Zeiss). Zu jeder Probe wurden fünf Aufnahmen mit einem Plan-Neofluar 40x/0,75D Objektiv in einer 400-fachen Vergrößerung gemacht. Pro Kondition wurden 300 – 500 Nuklei ausgezählt.

2.2.5. Proteinaufarbeitung & Kernextraktion

Die konfluenten Zellen wurden vor der weiteren Bearbeitung einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale abgelöst, in 350 μ l Lysispuffer aufgenommen und in ein entsprechendes Reaktionsgefäß aufgenommen. Eine 30 minütige Inkubation bei + 4°C und eine kurze Ultraschallbehandlung lysierte die Zellen vollständig. Die Lysate wurden mit 140000 rpm bei + 4°C zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Proteinquantifizierung verwendet.

Die Extraktion der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion wurden entsprechend der Anweisung im Protokoll des NE-PER® Extraktions-Kit durchgeführt (Pierce).

Um die exakte Proteinmenge für jede Probe zu ermitteln, wurde mit Hilfe eines BioRad-Kits eine Proteinquantifizierung nach Bradford vorgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und wurde bei 620nm im ELISA-Reader ausgelesen. Als Standard wurde eine BSA-Lösung in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Das gewährleistete eine einheitliche/definierte Menge an Protein pro Probe.

2.2.6. Western Blot

Die Auftrennung der Protein erfolgte mittels einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Unabhängig ob cytoplasmatische oder kernständige Proteine untersucht wurden, wurden 150 μ g Protein pro Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proben waren mit SDS-Probenpuffer versetzt und wurden vor dem Auftrag für fünf Minuten in kochendem Wasser denaturiert. Bei 0,1mA/cm² Gel wurden die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt (Sambrook & Russell, CSH protocols 2006). Anschließend wurden die Proteine zur weiteren Immundetektion auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei 5,7 mA/cm² und 24 V wurden die Proteine über Nacht bei + 4°C in einem Tankblot auf die Membran geblottet. Im Anschluss daran wurde

die Blottingeffizienz und der gleichmäßige Proteinauftrag mittels einer Ponceau S-Färbung nachgewiesen.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Membranen für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur in einer 3 %igen BSA-Lösungen vorinkubiert. Der Nachweis des Proteins von Interesse erfolgte danach durch Behandlung der Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper bei +4°C über Nacht. Dem Auftrag des sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur ging ein dreimaliges Waschen der Membran mit PBST voran. Der Nachweis der spezifischen Antikörper-Protein-Bindung wurde durch eine Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen und über eine Exposition auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

2.2.7. *In vitro* Kinase-Aktivitäts-Test

Konfluente A549 Zellen wurden entweder 16 Stunden mit 10µM pTyr behandelt oder mit 4 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen. Anschließend wurden die Kernproteine aus je 20 x 10⁶ Zellen isoliert (siehe 2.2.5.) und eine Immunpräzipitation der kernständigen PKCε durchgeführt. Hierzu wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers von BD Falcon (siehe 2.1.7.) die nukleäre PKCε für drei Stunden immunpräzipitiert und im Anschluß die Proben für zwei Stunden mit einer 50%igen Protein-A-Sepharose-Lösung inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die Immunpräzipitate in Reaktionspuffer überführt. Die Kinaseaktivität wurde für 10 Minuten bei 37°C in Anwesenheit von 1µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP quantifiziert. Nach der Kernproteinauftrennung über eine SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung des $\gamma^{32}\text{P}$ -gebundenen Substrats (Histon III, Sigma) mittels Röntgenfilmexposition ermittelt und densitometrisch ausgewertet.

2.2.8. Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden 20 x 10⁶ Zellen pro Ansatz mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 350µl Puffer A aufgenommen. Die Extraktion der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion wurden entsprechend der Anweisung im Protokoll des NE-PER® Extraktions-Kit durchgeführt (Pierce).

Die nukleäre oder cytoplasmatische Fraktion wurde mit 5µl des zu immunpräzipitierenden Antikörpers für drei Stunden bei +4°C inkubiert. Anschließend wurden 50µl einer 50%igen Protein-A-Sepharose-Lösung zugegeben und die Proben über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Präzipitate wurden danach fünf mal mit Puffer A gewaschen, anschließend mit SDS-

Material und Methoden

Probenpuffer versetzt und 5 Minuten gekocht. Die Auftrennung der immunpräzipitierten Proteine geschah mittels SDS-PAGE und Immunoblotting, wie bereits in 2.2.6. beschrieben.

2.2.9. Behandlung mit Inhibitoren und Phosphotyrosin

Die Inhibitoren/Aktivatoren wurden gemäß den Angaben der Hersteller in Stammlösungen aliquotiert und bei den angegebenen Temperaturen bis zur endgültigen Verwendung gelagert. Bei Substanzen, die in DMSO oder Ethanol gelöst waren, wurden die Kontrollen entsprechend mit der gleichen Konzentration des Lösungsmittels behandelt (vehicle).

Inhibitor/Aktivator	Endkonzentration	Lösungsmittel	Lagerung
Calphostin C	100nM	DMSO	+4°C
R59949	600nM	Ethanol	-20°C
C225	30nM	PBS	-70°C
OAG	20µM	Acetonitril	-70°C

Phosphotyrosin wurde in einer 1mM Stammlösung in PBS bei -20°C gelagert. Die Behandlung aller Zelllinien mit pTyr erfolgte mit einer Endkonzentration von 10µM und wurde entweder für verschieden Zeitintervalle zum Medium gegeben oder die Zellen wurden 16 Stunden vor der Bestrahlung mit pTyr vorinkubiert.

2.2.10. Transfektion mit spezifischer siRNA

Die Zellen wurden bis zu 80%iger Konfluenz in Ø100mm Zellkulturschalen unter Normalbedingungen kultiviert. Fünf Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen auf DMEM + 10% FCS ohne Antibiotika Beisätze umgesetzt. Die siRNA (siehe 2.1.6.) wurde anschließend mit einer Endkonzentration von 30nM mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) nach den Abgaben des Herstellers für 48 Stunden transfiziert. Die Transfektion erfolgte in DMEM + 10%FCS ohne Antibiotika. Nach der Transfektion wurden sie mittlerweile konfluenten Zellen gemäß den Versuchsbedingungen weiter behandelt und für die entsprechenden Versuche vorbereitet.

2.2.11. PIP₂-Quantifizierung

Dieses Kit von Echelon Inc (Artikelnummer K-3400) wurde nach Anweisungen des Herstellers dazu verwendet PIP₂ zu quantifizieren. Es beruht auf der Methode der Protein-Lipid-Overlays

[99]. Aus den Proben wurden zuerst die neutralen von den sauren Lipiden getrennt und anschließend mittels Phasentrennung isoliert. Nach Auftragen der Proben auf den Nitrozellulose-Strip und spezifischer Antikörper Behandlung konnte die Lipidmenge mit Hilfe einer Chemoluminiszenzreaktion auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die Daten wurden im Anschluss densitometrisch ausgewertet (siehe 2.2.13.).

2.2.12. Präparaton von DNS-Protein-Komplexen (*Crosslinking*)

Konfluente Zellen wurden entweder mit pTyr, 4Gy Bestrahlung oder einer Kombinationbehandlung aus pTyr-Vorinkubation und anschließender Bestrahlung behandelt und im Anschluß daran entsprechend der Anweisung im Protokoll des NE-PER® Extraktions-Kit (Pierce) in cytoplasmatische und Kernfraktion separiert. Die Kernfraktion wurde mit einer 1%igen Formaldehyd-Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und somit die kernständigen Proteine an die DNS gekoppelt [100]. Die Fällung der DNS und damit der gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe von Isopropanol und 10µl 2M Natriumacetat über Nacht. Nach zweimaligem Waschen in 100%igem Ethanol wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Separation der DNS-gebundenen Protein erfolgte über eine SDS-PAGE (siehe 2.2.6.)

2.2.13. Densitometrische Auswertung und Statistik

Die densitometrische Quantifizierung der Western Blots, Kinase-Assays und PIP₂-Quantification-Assays wurden unter Zuhilfenahme der Computersoftware von Scion image durchgeführt.

Um einen Vergleich zwischen Daten aus zwei unabhängigen Gruppen anzustellen, wurde der „student's t-test“ durchgeführt. Alle Werte zeigen den Mittelwert +/- der Standardabweichung oder des Standardfehlers. P-Werte < als 0,05 ($p < 0.05$) wurden als statistisch relevant anerkannt.

3. Ergebnisse

3.1. Radioprotektiver Effekt einer pTyr-Behandlung

3.1.1. Klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung

Zur Untersuchung einer potentiell radioprotektiven Wirkung von pTyr auf verschiedene humane Tumorzelllinien und Normalgewebszellen wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Die Zellen wurden 16 Stunden vor Bestrahlung mit 10µM pTyr behandelt und anschließend mit unterschiedlichen Einzeldosen ionisierender Strahlung bestrahlt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt.

3.1.1.1. Klonogenes Überleben in humanen Fibroblasten und Tumorzellen mit wildtyp-TP53 nach pTyr-Vorbehandlung

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigten die wt. TP53 exprimierenden Tumorzellen (A549) und Normalgewebszellen (HSF7) einen protektierten Effekt nach der Vorbehandlung mit pTyr. Das klonogene Überleben dieser Zelllinien, nach Bestrahlung mit zwei, vier und sechs Gray, war nach pTyr Behandlung signifikant erhöht (Abb.3.1).

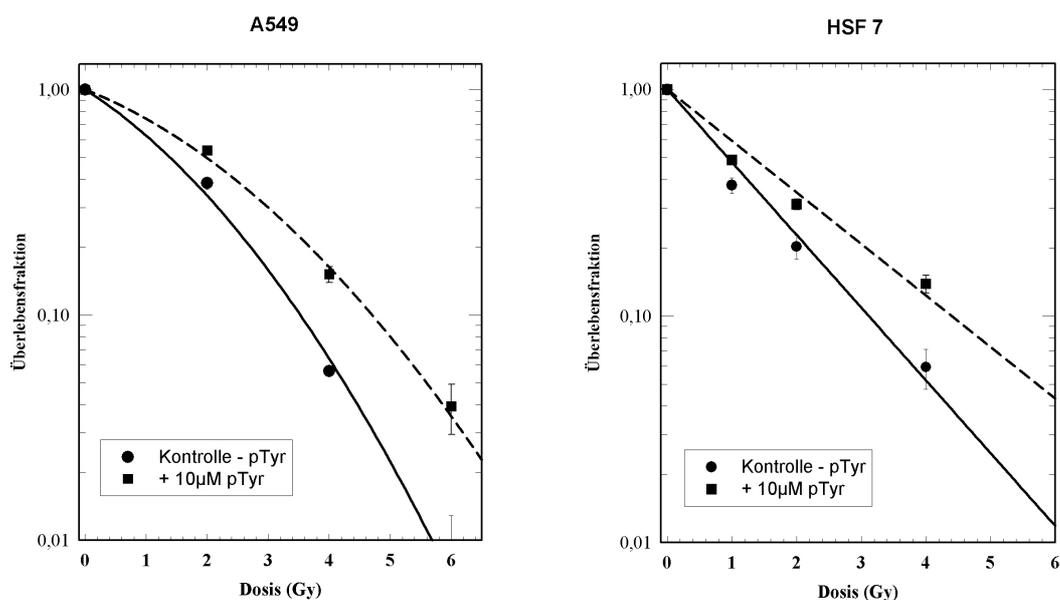


Abb. 3.1: Koloniebildungstest mit Einzeldosisbestrahlung und pTyr Präinkubation für die Karzinomzelllinie A549 (wt TP53) und humane Fibroblasten HSF7.

Überlebensrate nach Bestrahlung mit 2,4 oder 6Gy und einer Präinkubation mit 10µM pTyr. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat 16 Stunden mit pTyr vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die gebildeten Kolonien (>50 Zellen) wurden 10 Tage nach Bestrahlung quantifiziert.

3.1.1.2. Klonogenes Überleben in Tumorzellen mit mutiertem TP53 nach pTyr-Vorbehandlung

Eine 16 stündige Behandlung mit pTyr induzierte in den untersuchten Karzinomzelllinien FaDu und MDA, im direkten Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, keinen radioprotektiven Effekt auf das klonogenes Überleben der Zellen nach Bestrahlung (Abb.3.2.). Die verwendeten Zelllinien exprimieren beide ein mutiertes TP53.

Ergebnisse

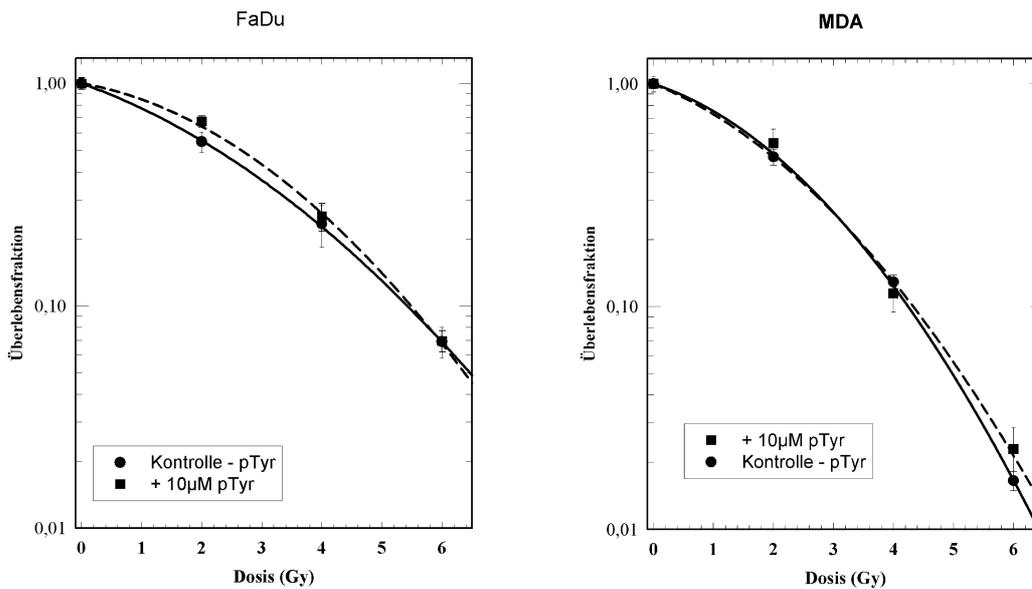


Abb. 3.2: Klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung in den Zelllinien FaDu und MDA mit mutiertem TP53 nach Präinkubation mit pTyr.

Überlebensrate nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 2,4 und 6 Gy und Behandlung mit 10 μM pTyr. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat für 16 Stunden mit pTyr behandelt und anschließend bestrahlt. Die Anzahl an gebildeten Kolonien (> 50 Zellen) wurde 10 Tage nach Bestrahlung bestimmt.

3.1.2. Einfluss von pTyr auf die Reparatur von residualen

DNS-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung

Zur näheren Betrachtung des radioprotektiven Effekt von pTyr wurden Versuche durchgeführt in denen der positive Einfluss einer pTyr-Präinkubation auf die DNS-Reparatur nach ionisierender Bestrahlung untersucht, im Speziellen der Effekt von pTyr auf die Reparatur residualer DNS-Doppelstrangschäden betrachtet wurde. Die Methode der Wahl (γ H2AX-Assay) quantifiziert die gebildeten Reparatur-Foki 24 Stunden nach Bestrahlung mit zwei, vier und sechs Gray Einzelbestrahlung.

In Tumorzellen und Normalgewebszellen, die beide ein wt. TP53 Gen exprimieren, zeigte eine pTyr Behandlung vor Bestrahlung eine signifikante Verminderung der residualen Reparatur-Foki nach Bestrahlung (Abb.3.3 A und B). Die Tumorzelllinie FaDu (mt. TP53) hingegen zeigte keine nennenswerte Veränderung in der Anzahl der Foki pro Einzelzelle im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb.3.3 C).

In allen verwendeten Zelllinien zeigte eine pTyr Inkubation keine Erhöhung der basalen Menge an DNS-Schädigungen und somit keine gesteigerte Anzahl an residualen

γ H2AX-positiven Foki (Abb.3.3).

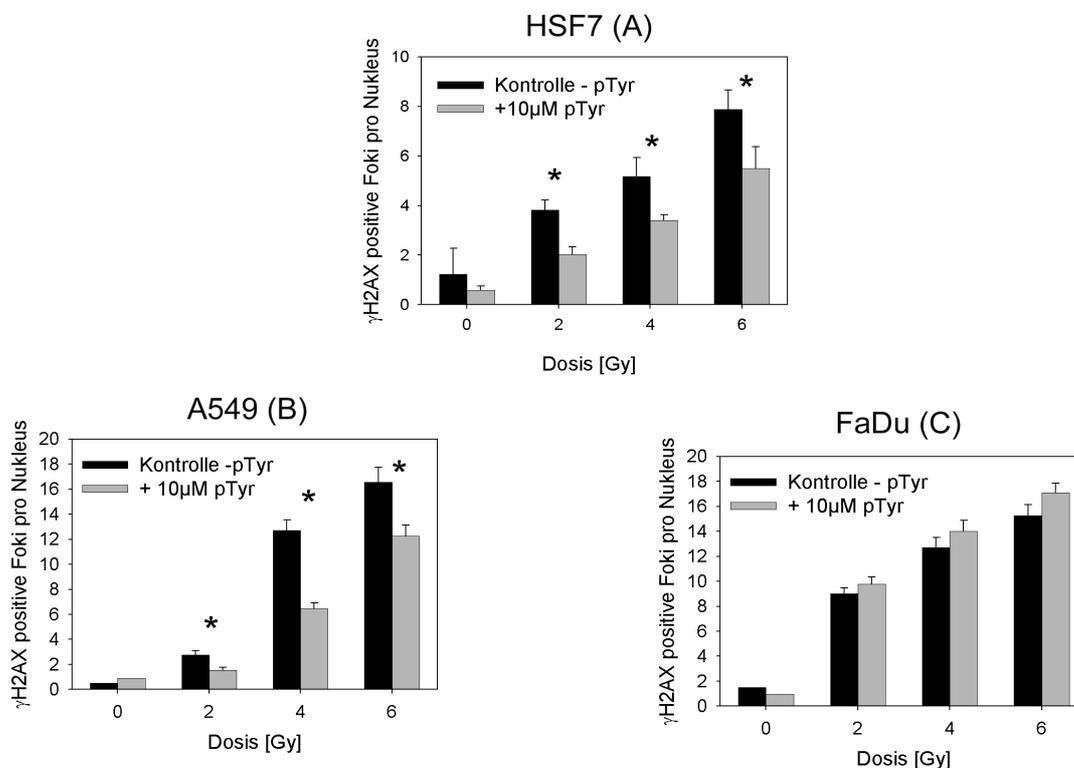


Abb. 3.3: Residuale γ H2AX-positiven Foki 24 Stunden nach Bestrahlung mit Einzeldosen.

Residuale DNS-Schäden in den Zelllinien HSF7 (A), A549 (B) und FaDu (C) wurden 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2,4 oder 6 Gy mittels Quantifizierung γ H2AX-positiver Foki durchgeführt. Jeder Wert stellt den Mittelwert \pm SE an residualen Reparaturfoki pro Zelle dar. Sternchen beschreiben eine statistisch signifikante Differenz (student's t-test $p < 0.05$) zwischen unbehandelten Kontrollen und Zellen, die mit pTyr vorbehandelt wurden.

3.2. Interaktion zwischen Phosphotyrosin und dem EGFR

Nach ionisierender Bestrahlung und anderem genotoxischen Stress wird der EGFR in den Zellkern transportiert. Dort hat er einen stimulierenden Effekt auf die Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen durch Interaktion mit und Aktivierung der nukleären DNA-Protein-Kinase (DNA-PK), welche eine essentielle Rolle in DNS-Reparaturmechanismen nach Bestrahlung spielt [58].

Um zu untersuchen, ob eine pTyr Behandlung ebenfalls eine Auswirkung auf diesen Mechanismus zeigt, wurde die Interaktion von pTyr auf die Akkumulation des EGFR in den Zellkern beobachtet und des Weiteren die damit gekoppelte Signalkaskade näher untersucht.

Ergebnisse

3.2.1. Phosphotyrosin-vermittelte Akkumulation des EGFR im Zellkern

Neben der radioprotektiven Aktivität von pTyr konnte auch eine erhöhte Translokation des EGFR in den Zellkern nach pTyr Gabe beobachtet werden. Nach pTyr-Inkubation verschiedener Zelllinien konnte nach frühestens sechs Stunden eine erhöhte Akkumulation des EGFR in der Kernfraktion der Zellen festgestellt werden (Abb.3.4). Es reagierten jedoch nicht alle getesteten Zellen in gleichem Maße auf die Behandlung.

In humanen Fibroblasten, A549 Zellen und der Glioblastomzelllinie A172 konnte eine signifikant akkumulierte Menge an EGFR im Zellkern nach 6 und 16 Stunden pTyr-Inkubation gezeigt werden (Abb.3.4 A, B und C).

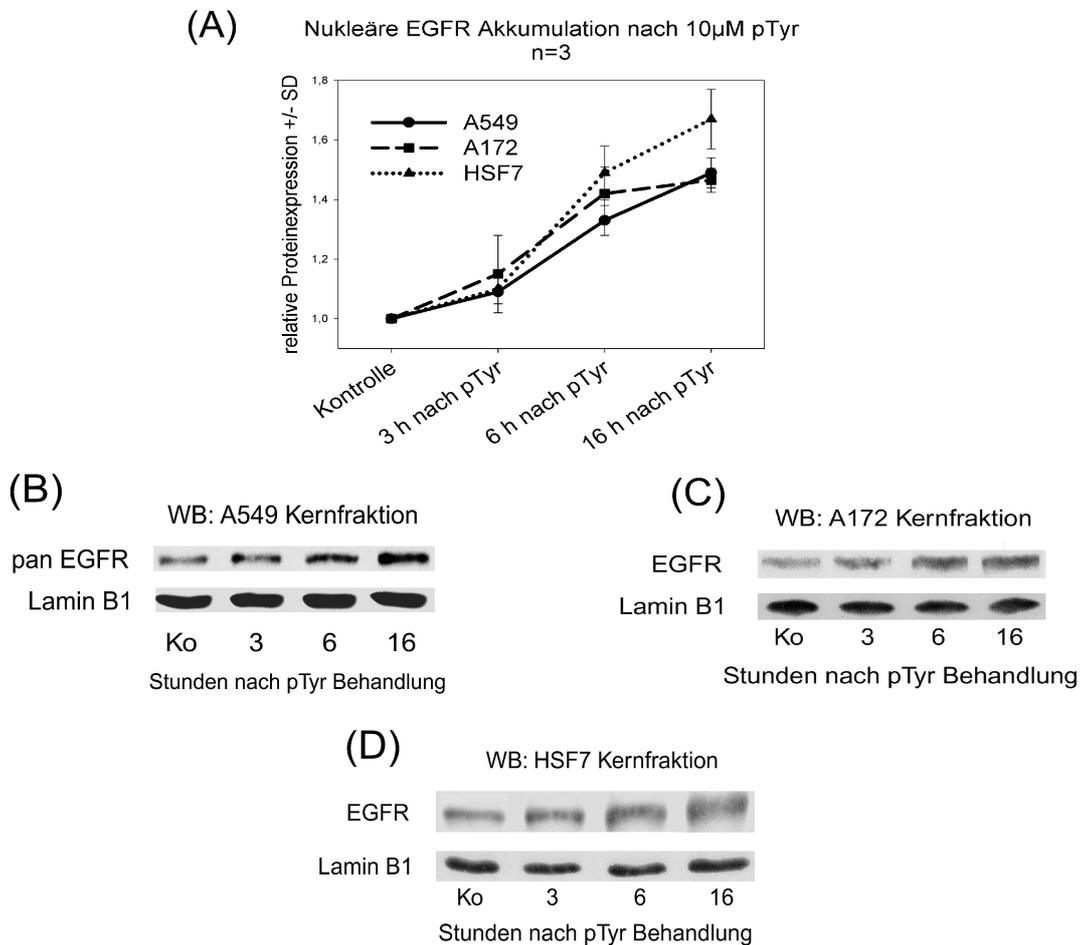


Abb. 3.4: Nukleäre EGFR Akkumulation in wt TP53 Zelllinien nach Präinkubation mit pTyr.

Densitometrische Auswertung (A): Werte entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Versuchen pro Zelllinie +/- Standardfehler. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die eigene Laminkontrolle und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die Zelllinien A549 (B), A172 (C) und HSF7 (D) wurden für verschiedene Zeiträume (in Stunden) mit 10 μ M pTyr inkubiert.

Da der unstimulierte Basalwert des nukleären EGFR in der untersuchten Zelllinie FaDu bereits

sehr hoch war, zeigte eine pTyr-Gabe nur eine leichte aber dennoch signifikante Erhöhung der Akkumulation des EGFR im Zellkern (Abb.3.5).

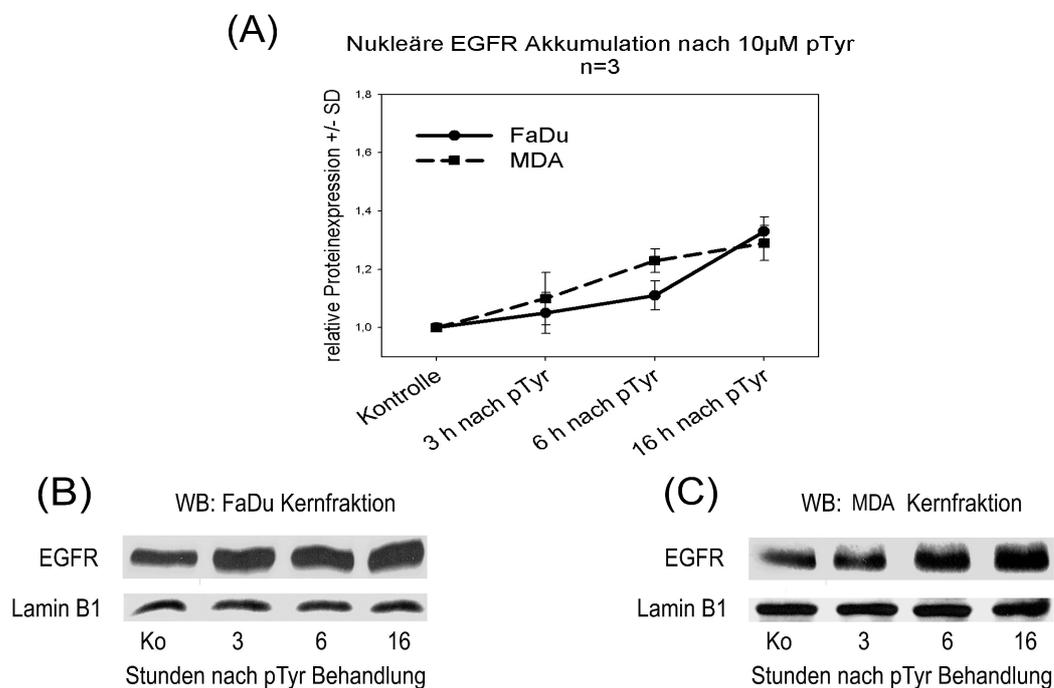


Abb. 3.5: Nukleäre EGFR Akkumulation in FaDu (A) und MDA (B) (mt. TP53) nach Inkubation mit pTyr. Densitometrische Auswertung (A): Werte entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Versuchen pro Zelllinie +/- Standardfehler. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die eigene Laminkontrolle und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die Zelllinien FaDu (B) und MDA (C) wurden für verschiedene Zeiträume (in Stunden) mit 10 μ M pTyr inkubiert.

3.2.2. Strahlungseffekte auf den nukleären EGFR nach Phosphotyrosin-Vorbehandlung

Ein wichtiger Aspekt bei der Radioprotektion von Normalgewebe in direkter Tumorumgebung während einer radioonkologischen Therapie ist die Betrachtung der Effekte einer kombinierten Behandlung von pTyr und ionisierender Bestrahlung.

Hierfür wurden in den wildtyp-TP53 Zelllinien A549 (Abb.3.6B), A172 (Abb.3.6C) und normalen Hautfibroblasten (HSF7) (Abb.3.6 D) Western-Blot-Versuche durchgeführt, in denen die Zellen im konfluenten Zustand erst 16 Stunden mit pTyr behandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt wurden.

(A) Nukleäre EGFR Translokation in A549 nach 4Gy
n = 12

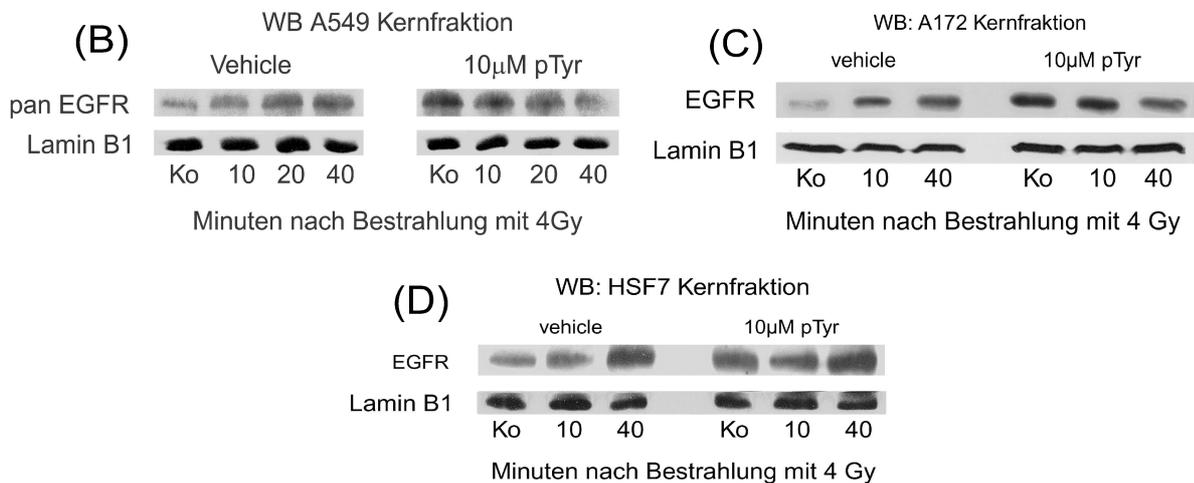
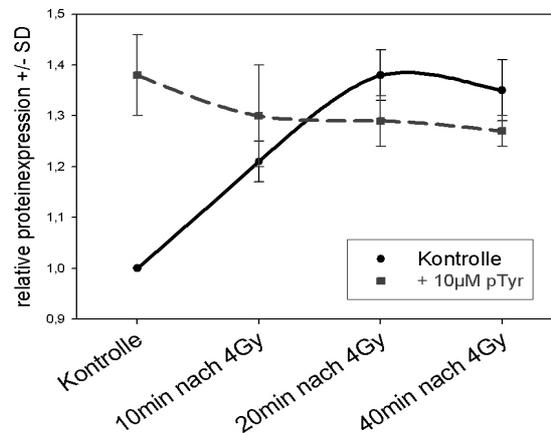


Abb. 3.6: Effekt einer pTyr-Vorbehandlung auf die strahleninduzierte EGFR Translokation in den Zellkern

(A) Densitometrische Auswertung: Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel aus 12 unabhängigen Versuchen +/- Standardfehler und stellen die strahleninduzierte nukleäre EGFR Translokation in A549 +/- 10µM pTyr Vorbehandlung dar. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die eigene Laminkontrolle und anschließend auf die unbestrahlte und unbehandelte Kontrolle normalisiert.

In den Zelllinien A549 (B), A172 (C) und HSF7 (D) wurden die nukleären Proteine entsprechend den Versuchsbedingungen nach Bestrahlung mit 4Gy und Vorbehandlung für 16 Stunden mit pTyr lysiert und mittels Western-Blot-Test analysiert. Um eine gleichmäßigen Proteinauftrag sicher zu stellen wurde Lamin B1 als Standard detektiert.

Eine Bestrahlung mit 4 Gy führte in allen Zelllinien zu einer Translokation des EGFR in den Zellkern. Diese Akkumulation des EGFR begann zehn Minuten nach Bestrahlung und hielt bis zu 40 Minuten nach Bestrahlung an. Eine Stabilisierung dieser EGFR Akkumulation im Zellkern nach Bestrahlung konnte auch für längere Zeitintervalle nach Bestrahlung nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt). Wurden die Zellen 16 Stunden vor Exposition mit pTyr behandelt, konnte eine deutliche Zunahme des unbestrahlten Basalwertes im Zellkern beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Menge an EGFR im Zellkern konnte durch Bestrahlung mit 4 Gy

nicht mehr induziert werden (Abb.3.6 A).

3.2.3. Nukleäre Akkumulation des EGFR ist essentiell für die radioprotektive Aktivität von pTyr

Um die Abhängigkeit der pTyr-vermittelten Radioprotektion von der Translokalisierung des EGFR in den Zellkern darzustellen, wurden im folgenden Versuche durchgeführt, in denen die Akkumulation des EGFR nach pTyr-Gabe mittels eines EGFR spezifischen Antikörpers unterbunden wurde.

Die Lungenkarzinomzelllinie A549 wurde mit dem monoklonale Antikörper C225 (Cetuximab) in einer Konzentration von 30nM für eine Stunde inkubiert. Diese C225 Behandlung führte zu einer reduzierter Menge an basal akkumuliertem EGFR im Zellkern ohne vorangegangene pTyr Gabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb.3.7). Die pTyr-induzierte Akkumulation des EGFR im Zellkern nach sechs und 16 Stunden Inkubation wurde durch eine Kombinationsbehandlung von C225 und folgender pTyr Gabe vollständig aufgehoben (Abb.3.7).

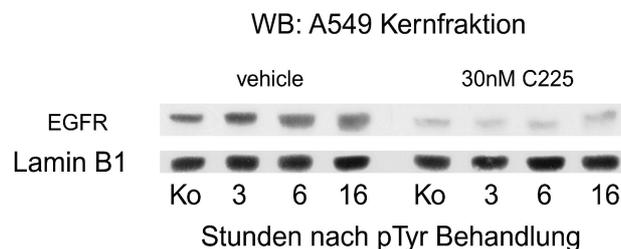


Abb. 3.7: Effekt von C225 auf die pTyr induzierte EGFR Akkumulation im Kern von A549.

Die Zellen wurden für 3,6 und 16 Stunden mit pTyr inkubiert +/- 30nM C225 für jeweils eine Stunde vor pTyr Gabe. Der kernständige EGFR und das Strukturprotein Lamin B1 wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Die Untersuchung der Wirkung einer C225-pTyr Kombinationstherapie auf das klonogene Überleben in A549 Zellen ergab einen signifikanten Einfluss der nukleären EGFR Translokation auf die pTyr-vermittelte Radioprotektion (Abb.3.8).

Eine einstündige Behandlung mit 30nM C225 vor Bestrahlung radiosensitivierte die Zellen und reduzierte deutlich die klonogene Überlebensrate. Im Fall einer 16 stündigen pTyr-Vorbehandlung war eine klare Radioprotektion der Zellen zu beobachten.

Um den Einfluss des EGFR auf die pTyr-induzierte radioprotektive Aktivität zu untersuchen, wurden Kombinationsbehandlungen durchgeführt. Im ersten Fall wurden die A549 Zellen 16 Stunden mit pTyr und erst eine Stunde vor Bestrahlung mit C225 vorbehandelt. Durch die 15

Ergebnisse

stündige pTyr Vorbehandlung war eine hohe Menge an EGFR bereits im Zellkern akkumuliert und konnte durch eine C225 Gabe nicht mehr verringert werden. In diesem Fall konnte nach wie vor eine deutliche pTyr-vermittelte Radioprotektion nach Bestrahlung gezeigt werden (Abb.3.8). Erfolgte die Behandlung im umgekehrten Ablauf wurden die Zellen eine Stunde mit C225 inkubiert und anschließend noch 16 Stunden mit pTyr. Dies führte dazu, dass eine pTyr-vermittelte Translokalisierung des EGFR nicht mehr statt finden konnte. Als Folge war der radioprotektive Effekt einer pTyr Behandlung nicht mehr zu beobachten (Abb.3.8).

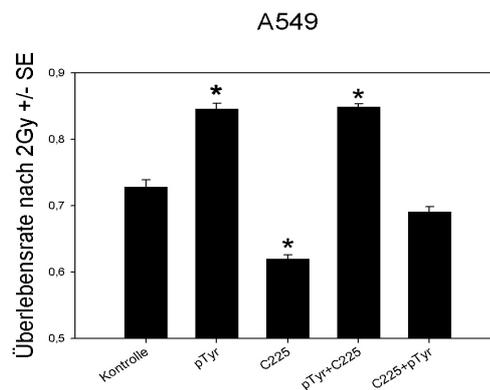


Abb. 3.8: Neutralisierung des pTyr-assoziierten radioprotektiven Effekt durch C225 im klonogenen Überleben nach 2Gy in A549.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat für 16 Stunden mit 10 μ M pTyr und/oder entsprechend den Versuchsbedingungen mit 30nM C225 behandelt. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit 2Gy. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien (>50 Zellen) quantifiziert. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert drei unabhängiger Experimente +/- Standardfehler und stellt die Überlebensrate von A549 nach 2Gy Bestrahlung dar. Asteriske beschreiben eine statistisch signifikante Differenz (student's t-test $p < 0.05$) zwischen unbehandelten Kontrollen und Zellen, die mit pTyr/C225 vorbehandelt wurden.

3.3. Wechselwirkung zwischen Phosphotyrosin und dem Ah-Rezeptor

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) besitzt die Fähigkeit aromatische Kohlenwasserstoffe zu binden und kann dadurch von Chemikalien aktiviert werden. Zudem kann der Ah Rezeptor über verschiedene Proteininteraktionen den cytoplasmatischen EGFR phosphorylieren und beeinflusst somit den posttranslationalen Status des EGFR. Des weiteren wurde beschrieben, dass der AhR selbst nach Aktivierung einer Translokalisierung in Zellkern unterliegt. Da all dies eine mögliche Interaktion mit bzw. Einflussnahme durch pTyr nahelegt, wurden folgende Versuche durchgeführt.

Nach einer Präinkubation mit 10 μ M pTyr zeigte sich in der cytoplasmatischen Fraktion von A549 Zellen eine in Abhängigkeit der Zeit zunehmende Stabilisierung des Ah Rezeptors. Nach

zwei stündiger Inkubation war eine zunehmende Stabilisierung des AhR zu beobachten, die bis zu 24 Stunden nach pTyr-Gabe erhalten blieb (Abb. 3.9 A). Im Zellkern konnte eine ähnliche Kinetik gezeigt werden. Auch hier induzierte pTyr eine Induktion der Translokation des Ah Rezeptors in den Zellkern, welche ihren Höhepunkt nach 16 stündiger Inkubation erreichte. Auch nach 24 Stunden war dieser hohe Wert des kernständigen AhR noch nachzuweisen (Abb.9 B).

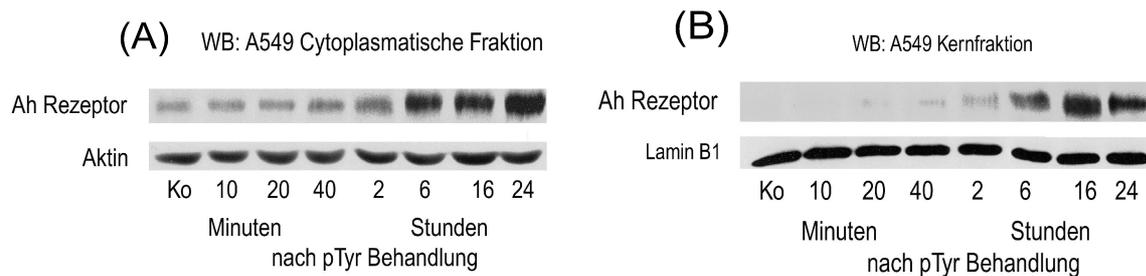


Abb. 3.9: pTyr-induzierte cytoplasmatische Stabilisierung und nukleäre Translokation des Ah-Rezeptors in A549.

A549 Zellen wurden für 10,20,40 Minuten und 2,6,16, und 24 Stunden mit 10 μ M pTyr inkubiert und anschließend lysiert. Die Trennung in cytoplasmatische (A) und nukleäre Fraktion (B) erfolgte wie unter 2.2.5. beschrieben. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert und der Ah-Rezeptor, ebenso wie Lamin B1 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern quantifiziert.

Um eine direkte Interaktion zwischen dem EGFR und dem Ah Rezeptor zu zeigen, wurde der EGFR aus der Kernfraktion von A549 immunpräzipitiert. Eine basale Bindung des Ah-Rezeptor war nachzuweisen. Eine Inkubation mit pTyr stimulierte diese Komplexbildung noch zusätzlich und erreichte ein Maximum nach 16 Stunden. Untersuchungen zeigten erste Beteiligungen der Proteine PKC ϵ und der DGK θ an der pTyr-induzierten EGFR-assoziierten Signalvermittlung (siehe Kapitel 3.6. und 3.7.). Der Ah-Rezeptor befand sich sowohl im Komplex mit dem kernständigen EGFR, als auch mit der PKC ϵ und der DGK θ (Abb.3.10), was eine Beteiligung an der pTyr-induzierten Signalkaskade nahelegt.

Ergebnisse

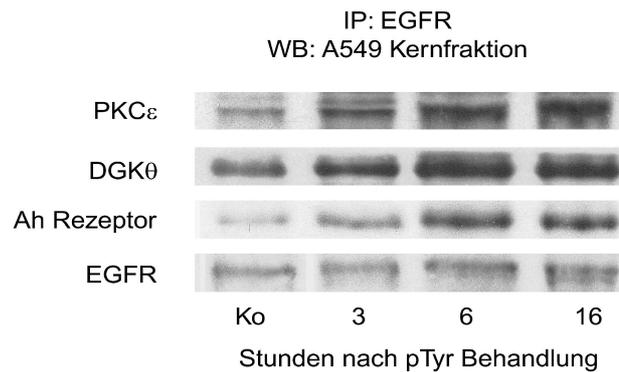


Abb. 3.10: pTyr-induzierte Kollokalisierung zwischen EGFR, DGK θ , PKC ϵ und dem Ah-Rezeptor im Zellkern von A549.

Konfluente A549 wurden für 3, 6 und 16 Stunden mit pTyr inkubiert und anschließend die Kernfraktion isoliert. Eine Immunpräzipitation des nukleären EGFR erfolgte wie in 2.2.8. beschrieben. Der Nachweis der Proteine die mit dem kernständigen EGFR koimmunpräzipitiert werden konnten, erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

3.3.1. Die Hemmung der AhR-Proteinexpression beeinflusst die pTyr-stimulierte EGFR Akkumulation im Zellkern

Eine Reduktion der Proteinexpression des AhR mittels einer spezifischen siRNA-Transfektion reduzierte sowohl die cytoplasmatische (Abb.3.11 A) als auch die kernständige (Abb.3.11 B) Proteinexpression des Rezeptors signifikant. Eine Akkumulation im Zellkern aufgrund einer pTyr-Behandlung konnte unter diesen Bedingungen nicht mehr beobachtet werden. Die Inhibition des AhR reduzierte die pTyr-stimulierte Akkumulation des EGFR im Kern und ebenso die damit assoziierte Phosphorylierung des EGFR am Threoninrest 654 wurde durch den AhR-“*Knock-Down*“ vollständig unterdrückt (Abb.3.11 B).

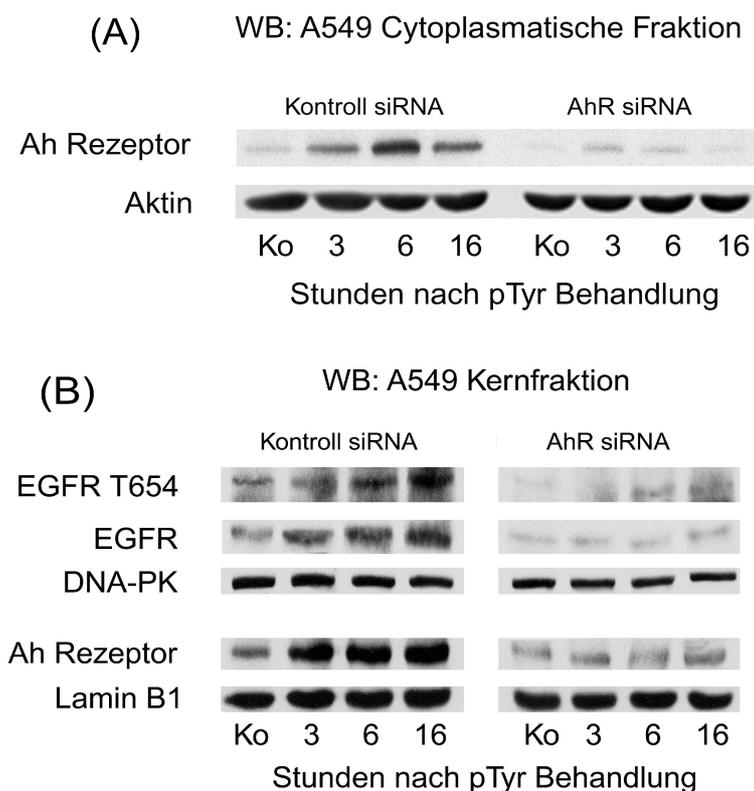


Abb. 3.11: pTyr-Effekt auf die nukleäre EGFR Akkumulation kann durch „AhR-Protein-knock-down“ in A549 unterdrückt werden.

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit 30nM spezifischer AhR-siRNA transfiziert (siehe 2.1.6.) und im Anschluß für 3,6, und 16 Stunden mit pTyr inkubiert. Die Transfektion erfolgte wie in 2.2.10. beschrieben. Die cytoplasmatischen (A) und kernständigen (B) Proteine wurden isoliert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse des Western-Blots erfolgte durch Nachweis der Proteine mittels spezifischer Antikörper. Als Ladungskontrolle diente im Cytoplasma Aktin (A) und im Zellkern Lamin B1 (B).

3.4. Effekt von Phosphotyrosin auf den Caveolin1-getriebenen EGFR Transport in den Zellkern

Untersucht wurde die Bindung des Träger-/ Membranproteins Caveolin1 an den EGFR. Da dieses Protein in der Lage ist Oligomere zu bilden und Cholesterol und Sphingolipide zu binden, ist es beschrieben, maßgeblich an der Formation von Invaginationen der Zellmembran, sogenannten Caveolae, beteiligt zu sein [69]. In diesen Caveolae können andere Transmembranproteine invaginiert sein, die anschließend einem Transport in das Zelllumen unterliegen.

Zur näheren Bestimmung der pTyr-stimulierten Signaltransduktion wurde in der cytoplasmatischen Fraktion von A549 Zellen der Phosphorylierungsstatus der Src Kinase am

Ergebnisse

Tyrosinrest 416 (Autophosphorylierungsstelle), die damit assoziierte Phosphorylierung am EGFR pY845 und des Trägerproteins Caveolin1 pY14 untersucht (Abb.3.12). Ein Anstieg der Phosphorylierungen an allen untersuchten Proteinen konnte bereits 10 Minuten nach 4Gy festgestellt werden, dieser hielt bis zu 40 Minuten nach Bestrahlung an. Im Falle einer Präinkubation mit pTyr vor der Bestrahlung wurde eine signifikante Erhöhung des Phosphorylierungsstatus im unbestrahlten Basalwert beobachtet, welcher durch eine nachfolgende 4Gy Bestrahlung nicht mehr weiter stimuliert wurde. Eine Modulation durch Bestrahlung und/oder pTyr-Behandlung an der Stabilisierung der Proteine Caveolin und Src Kinase konnte nicht festgestellt werden. Durch die Behandlungen wurden ausschließlich die Phosphorylierungsmuster beeinflusst (Abb.3.12).

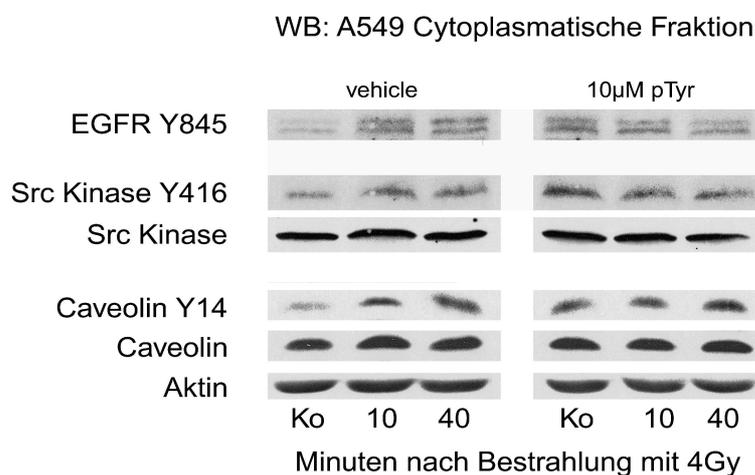


Abb. 3.12: Bestrahlung und pTyr-Gabe modulieren Phosphorylierungsstatus des EGFR, der Src Kinase und Caveolin1 im Cytoplasma von A549.

Konfluente A549 wurden mit 4Gy bestrahlt und/oder für 16 Stunden mit pTyr vorinkubiert. Danach wurden alle Zellen 10 und 40 Minuten nach Bestrahlung abgenommen. In der cytoplasmatischen Fraktion wurden die Proteine mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Der Blot wurde zuerst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen der Proteine inkubiert (EGFR pY845, Src pY416 und Caveolin1 pY14). Nach Detektion wurde der Blot gestrippt und nochmals mit Antikörpern gegen die Gesamtproteine (Src und Caveolin) inkubiert. Basierend auf dem Verhältnis zwischen Gesamtprotein und phosphorylierter Form konnte eine Zunahme/Aktivierung der Src Kinase und Caveolin1 sowohl durch Bestrahlung als auch durch pTyr-Gabe beobachtet werden.

Eine Komplexbindung zwischen dem EGFR und der phosphorylierten Form des Caveolin1 Proteins wurde mittels einer Immunpräzipitation des EGFR in der cytoplasmatischen Fraktion untersucht (Abb.3.13). Es konnte sowohl nach Bestrahlung als auch nach 16 stündiger pTyr-Inkubation eine eindeutige Stabilisierung des Immunkomplex beobachtet werden. Auch in diesem Fall konnte nach 4Gy und einer vorausgehenden pTyr Inkubation kein weiterer Anstieg der Komplexbildung zwischen dem cytoplasmatischen EGFR und dem am Tyrosin 14

phosphorylierten Caveolin1 nachgewiesen werden.

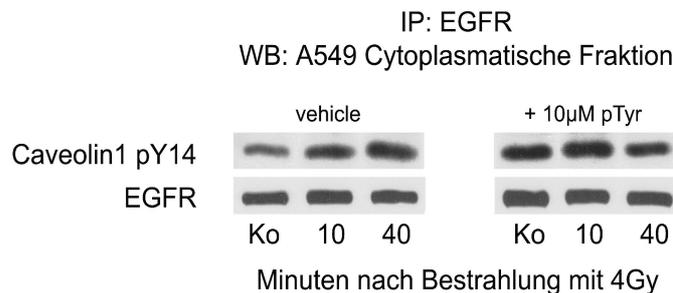


Abb. 3.13: Effekt von Bestrahlung und pTyr auf die Bindung von aktiviertem Caveolin1 an den cytoplasmatischen EGFR.

Konfluente A549 wurden mit 10µM pTyr vorbehandelt und anschließend mit 4Gy bestrahlt. Aus der cytoplasmatischen Fraktion wurde der EGFR immunpräzipitiert und die Bindung von phosphoryliertem/Src- und aktiviertem Caveolin1 (pY14) nach Bestrahlung und pTyr Präinkubation untersucht. Die Kolokalisation der beiden Protein wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Western-Blot quantifiziert.

3.5. pTyr moduliert das Phosphorylierungsmuster am EGFR

Phosphorylierungen an Proteinen spielen während Signaltransduktionsprozessen in Zellen eine wichtige Rolle. Um den Effekt einer pTyr-Inkubation auf die Modulation des Phosphorylierungsmusters des EGFR zu untersuchen, wurden im folgenden verschiedene Phosphorylierungsstellen sowohl am cytoplasmatischen als auch am nukleär lokalisierten EGFR in A549 nach Bestrahlung und/oder pTyr-Behandlung untersucht.

3.5.1. Tyrosinphosphorylierung am EGFR nach pTyr und/oder ionisierender Strahlung

Ausgehend davon, dass nach Stimulation/Aktivierung des EGFR, sei es durch Ligandenbindung oder liganden-unabhängig durch Stress, eine Modulation des Phosphorylierungsmusters beschrieben ist, wurden am EGFR die Tyrosinphosphorylierungsstellen Y1045 und Y845 untersucht.

Die bereits gut untersuchte Phosphorylierungsstelle Y1045 am EGFR dient nach EGF-Stimulation seiner Ubiquitinierung durch c-Cbl. Der Rezeptor wird dadurch zur Degradation markiert [101][102]. Durch eine pTyr-Behandlung wurde diese Phosphorylierungsstelle kaum beeinflusst. Es konnte jedoch sowohl in der cytoplasmatischen (Abb.3.14 A) als auch nukleären Fraktion (Abb.3.14 B) von A549 ein Abnahme der Phosphorylierung am Ty1045 nach Bestrahlung beobachtet werden.

Ergebnisse

Der Tyrosinrest Y845, der von der Src Kinase phosphoryliert werden kann [103], wurde, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, am cytoplasmatisch vorliegenden EGFR sowohl durch ionisierende Bestrahlung als auch durch pTyr deutlich vermehrt phosphoryliert (Abb.3.14 A). Am kernständigen EGFR zeigte eine pTyr-Behandlung keinen eindeutigen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung am Y 845. Eine Bestrahlung mit 4 Gy führte, wie im Cytoplasma, auch am kernständigen EGFR zu einer Zunahme der Phosphorylierung am Tyrosinrest Y845, die nach 20 Minuten ihr Maximum erreichte.

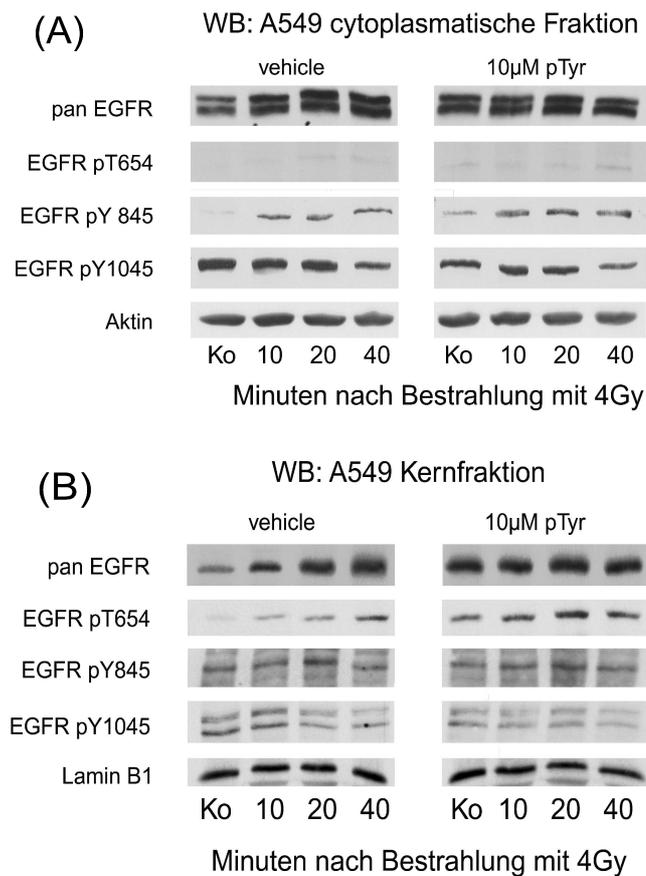


Abb. 3.14: Effekt von Bestrahlung und pTyr-Inkubation auf das Phosphorylierungsmuster des EGFR
A549 wurden nach Bestrahlung mit 4 Gy und/oder 16 stündiger pTyr-Behandlung in die cytoplasmatische (A) und nukleäre (B) Fraktion getrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Blotting der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Der Nachweis der phosphorylierten Proteine erfolgte durch phosphospezifische Antikörper. Als Ladungskontrolle wurde im Cytoplasma Aktin und in der Kernfraktion Lamin B1 quantifiziert.

3.5.2. pTyr-induzierte Phosphorylierung am Threoninrest 654 des EGFR

Neben der Untersuchung der Tyrosinphosphorylierungen am EGFR wurde auch eine Threoninstelle untersucht, die sich innerhalb der nukleären Lokalisationssquenz (NLS) des

EGFR befindet [72]. Interessanterweise wurde dieser Threoninrest nur am kernständigen (Abb.3.14 B) EGFR durch pTyr und Bestrahlung mit 4 Gy moduliert, wohingegen am cytoplasmatischen (Abb.3.14 A) EGFR eine Phosphorylierung am T654 kaum nachweisbar war. Nach pTyr Behandlung und Bestrahlung mit 4 Gy wurde eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung festgestellt (Abb.3.15 A), die mit der Akkumulation des EGFR im Kern assoziiert war. Eine Bestrahlung nach vorhergegangener pTyr Behandlung konnte die Phosphorylierung am T654 nicht über das Niveau der strahleninduzierten Phosphorylierung anheben. Dies konnte in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (A549 (Abb.3.15 B), A172 (Abb.3.15 C), HSF7 (Abb.3.15 D)) werden.

Ergebnisse

(A) Phosphorylierung am EGFR T654 in A549 nach 4Gy n = 12

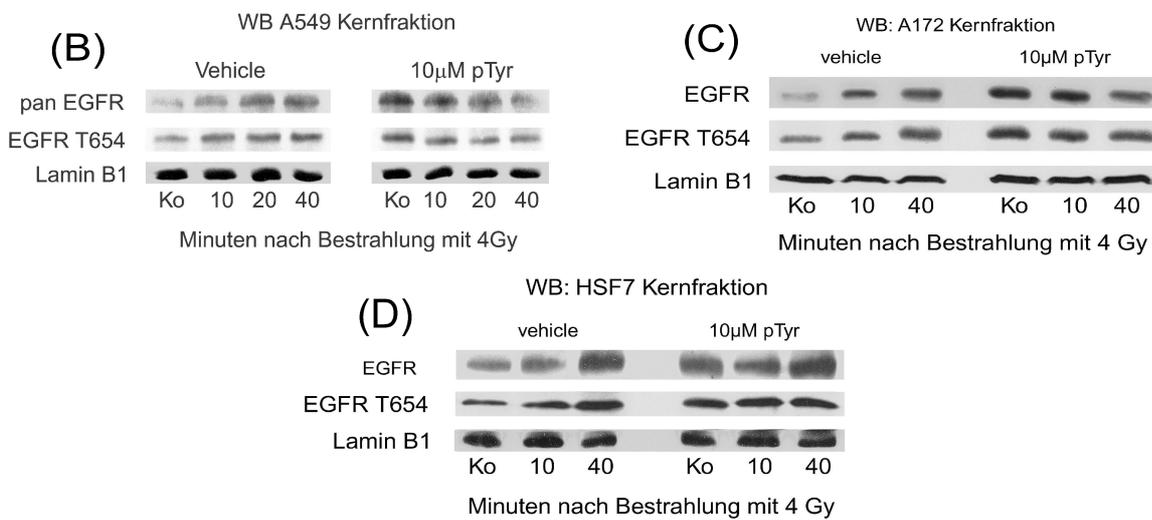
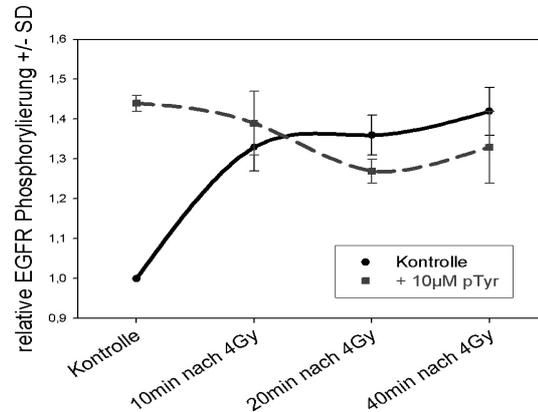


Abb. 3.15: Strahlungsinduzierte und pTyr-assoziierte Phosphorylierung des nukleären EGFR am Threoninrest 654 in A549.

(A): Densitometrische Auswertung: Werte entsprechen dem statistischen Mittelwert aus 12 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. Jeder Datenpunkt stellt die Phosphorylierung des kernständigen EGFR am T654 nach Bestrahlung mit 4Gy und/oder pTyr Präinkubation dar. Alle Werte wurden zuerst auf die eigene Laminkontrolle und anschließend auf die unbestrahlte und unbehandelte Kontrolle normalisiert.

In den Zelllinien A549 (B), A172 (C) und HSF7 (D) wurden mittels Western-Blot-Analyse die nukleären Proteine aufgetrennt. Spezifische Antikörper gegen die T654 phosphorylierte Form des EGFR wurden zuerst mit dem Blot inkubiert und quantifiziert. Im Anschluß daran wurde die Membran gestrippt und mit dem Antikörper gegen EGFR inkubiert.

3.6. Einfluss der Proteinkinase C ϵ auf die nukleäre Akkumulation des EGFR

Für die Phosphorylierung am T654 des EGFR wurde bereits beschrieben, dass eine der Isoformen der Proteinkinase C (PKC) dafür in Frage kommt [73]. In der Literatur sind zehn verschiedene Isoformen spezifiziert. Um den generellen Einfluss der PKC auf die Phosphorylierung am T654 und den damit assoziierten Transport des EGFR in den Zellkern zu

untersuchen, wurden A549 für drei Stunden mit dem PKC-Kinaseinhibitor Calphostin C inkubiert (Abb.3.16). Dieser spezifische PKC Inhibitor hemmt sowohl konventionelle PKC Isoformen (α, β, γ) als auch die der Gruppe der neuartigen Isoformen (*novel*: $\delta, \epsilon, \eta, \theta, \mu$) [104]. Die eingesetzte Konzentration betrug 100nM ($IC_{50} = 50nM$).

Ein erster Hinweis darauf, dass eine Protein Kinase C in die Regulation der Akkumulation des EGFR im Zellkern nach pTyr involviert ist, war die beobachtete Hemmung der basalen EGFR Menge nach Calphostin C Behandlung. Damit korrelierte auch die verminderte Phosphorylierung am T654 am kernständigen EGFR. Eine pTyr-induzierte Steigerung der nukleären EGFR Anreicherung und eine damit assoziierte T654 Phosphorylierung am EGFR konnte mittels einer Calphostin C Präinkubation vollständig unterbunden werden (Abb.3.16).

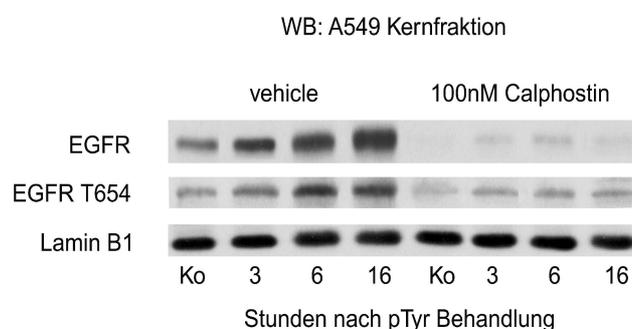


Abb. 3.16: pTyr-induzierte Phosphorylierung des EGFR und dessen Akkumulation im Zellkern wird durch Hemmung der PKC blockiert.

Konfluente A549 wurden jeweils eine Stunde vor pTyr Gabe mit 100nM Calphostin C behandelt und anschließend für 3, 6 und 16 Stunden mit pTyr inkubiert. Kernständige Proteine wurden isoliert und mit Hilfe des Western-Blot-Tests und spezifischen Antikörpern quantifiziert.

3.6.1. Identifikation der durch Phosphotyrosin-stimulierten

PKC-Isoform

Mittels Immunpräzipitation wurden verschiedene PKC-Isoformen im Komplex mit dem nukleären EGFR gefunden. Die Isoform der neuartigen PKC-Gruppe ϵ war bereits ohne vorhergehende Stimulation der Translokation des EGFR im Kern durch pTyr oder Bestrahlung mit dem nukleären EGFR kolokalisiert (Abb.3.17 A und B). Eine Behandlung mit pTyr führte zu einer signifikanten Steigerung der Komplexbildung zwischen dem nukleären EGFR und der PKC ϵ (Abb.3.17 A). Auch Bestrahlung mit 4 Gy konnte die Komplexbildung stimulieren. Die Kombinationsbehandlung aus Bestrahlung und vorheriger pTyr-Inkubation

Ergebnisse

konnte die Kolokalisation von EGFR und PKC ϵ im Zellkern nicht weiter erhöhen (Abb.3.17 B). Immunpräzipitationen der nukleären PKC ϵ zeigten ebenfalls eine pTyr- und strahlungsinduzierbare Komplexbildung mit dem EGFR (Daten nicht aufgeführt).

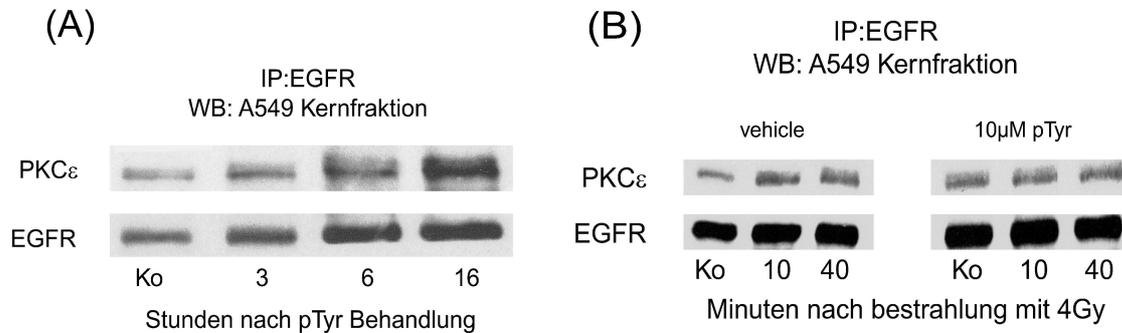


Abb. 3.17: pTyr- und Strahlungseffekt auf die Bindung zwischen dem EGFR und der PKC ϵ im Zellkern von A549.

(A): Der nukleäre EGFR wurde in Zellen immunpräzipitiert, die zuvor für 3, 6 und 16 Stunden mit pTyr behandelt worden waren. (B): A549 wurden mit 4Gy bestrahlt und die Proben nach 10 und 40 Minuten abgenommen. Der EGFR wurde in der Kernfraktion immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

3.6.2. Aktivierung der PKC ϵ durch Phosphotyrosin und durch ionisierende Strahlung

Um die Auswirkung einer pTyr-Behandlung oder Bestrahlung auf die Kinaseaktivität der PKC ϵ zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Kinase Assay mit Immunpräzipitaten der nukleären PKC ϵ durchgeführt. Sowohl eine Inkubation mit pTyr als auch Bestrahlung mit 4 Gy führten zu einer maßgeblichen Aktivierung der kernständigen PKC ϵ in A549 (Abb.3.18 A und B).

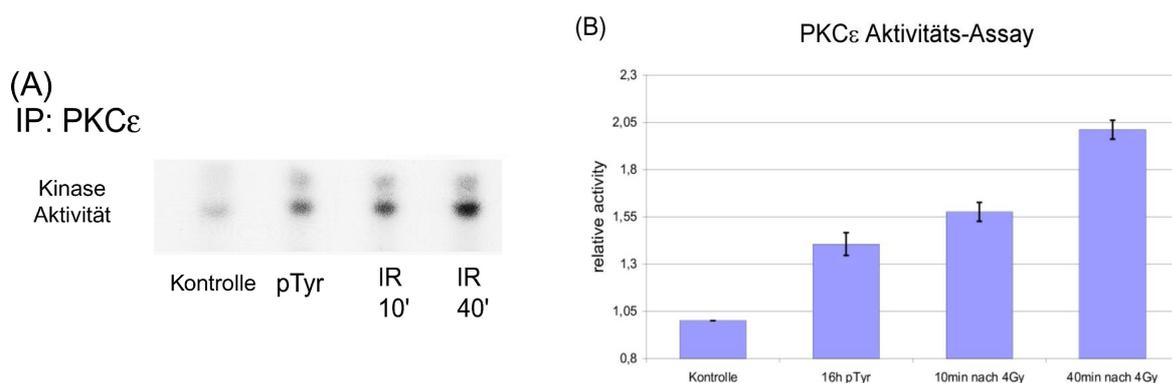


Abb. 3.18: Aktivierung der nukleären PKC ϵ durch pTyr und ionisierende Strahlung.

Aus konfluenten A549 Zellen wurden 10 und 40 Minuten nach Bestrahlung mit 4Gy oder 16 stündiger pTyr Inkubation die kernständigen Proteine isoliert und die PKC ϵ immunpräzipitiert. Die Kinaseaktivität wurde in Anwesenheit von γ^{32} -P-ATP für 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach Abbruch der Reaktion wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Phosphorylierung des Histons III quantifiziert.

(A): Repräsentatives Resultat eines PKC ϵ -Kinase-Assays. (B): Werte stellen das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) dar.

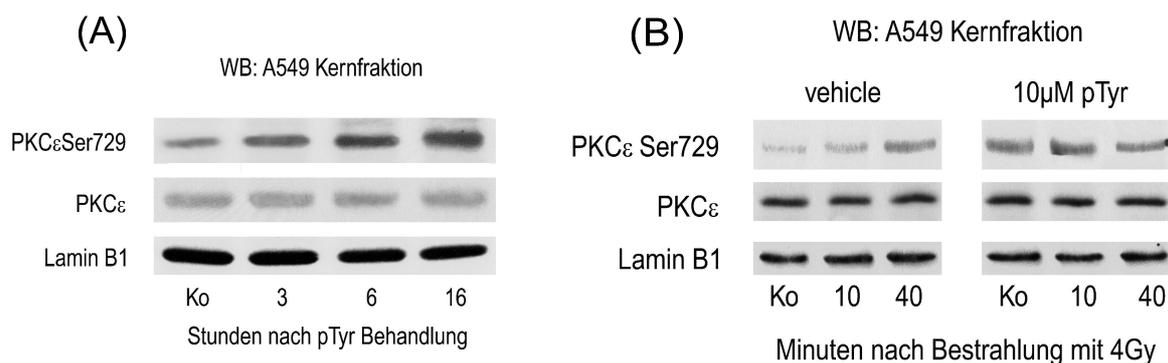


Abb. 3.19: PKC ϵ -Kinase Aktivität nach Bestrahlung und pTyr-Inkubation im Zellkern von A549.

(A): Zeitkinetik der PKC ϵ -Kinaseaktivierung (Autophosphorylierung am Serin 729) nach Behandlung der Zellen für 3, 6 und 16 Stunden mit pTyr. (B): Einfluss von Bestrahlung mit 4Gy 10 und 40 Minuten nach Bestrahlung auf die Kinaseaktivität der nukleären PKC ϵ in Kombination mit einer pTyr-Vorinkubation für 16 Stunden.

Basierend auf dem Verhältnis zwischen dem Gesamtprotein und der phosphorylierten Form (PKC ϵ Ser729) konnte unter allen Bedingungen eine Zunahme der Kinaseaktivität beobachtet werden.

Um die Beobachtung zu belegen, dass die PKC ϵ im Zellkern sowohl durch pTyr als auch durch ionisierende Bestrahlung aktiviert wird, wurde zusätzlich das Phosphorylierungsmuster der PKC ϵ untersucht (Abb.3.19 A und B). Hierfür wurde eine Autophosphorylierungsstelle in der Kinasedomäne dieses Proteins gewählt, welche stellvertretend für den Aktivierungszustand dieser Kinase beschrieben wird [105]. Der Grad der Aktivierung wurde mittels Quantifizierung dieser Serinphosphorylierung am Rest Nummer 729 im Western Blot untersucht.

Eine Präinkubation mit pTyr führte dazu, dass die Phosphorylierung signifikant anstieg, was entsprechend der Daten des Kinase-Assays, eine pTyr-induzierte Aktivierung der PKC ϵ aufzeigt

Ergebnisse

(Abb.3.19 A). Gleiches galt auch für ionisierende Bestrahlung mit 4Gy; auch unter dieser Bedingung wurde die nukleäre PKC ϵ signifikant aktiviert. Eine Kombinationsbehandlung aus pTyr und folgender Bestrahlung mit 4Gy konnte die PKC ϵ Phosphorylierung/Aktivierung nicht weiter erhöhen (Abb.3.19 B). Die Gesamtproteinmenge an PKC ϵ im Zellkern von A549 wurde weder durch pTyr noch durch Bestrahlung oder Kombinationsbehandlung beeinflusst (Abb.3.19 A und B).

3.6.3. Einfluss der PKC ϵ -Hemmung auf nukleäre EGFR Akkumulation und Phosphotyrosin-vermittelte DNS-Reparatur

Bei den verwendeten Zelllinien A549 und A172 konnte eine essentielle Rolle der kernständigen PKC ϵ in der pTyr- und stahleninduzierten EGFR Akkumulation im Zellkern und der damit assoziierten Signalkaskade beobachtet werden. Eine Reduktion des Proteins in der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion konnte mittels einer Transfektion mit spezifischer PKC ϵ - siRNA hervorgerufen werden (Abb.3.20).

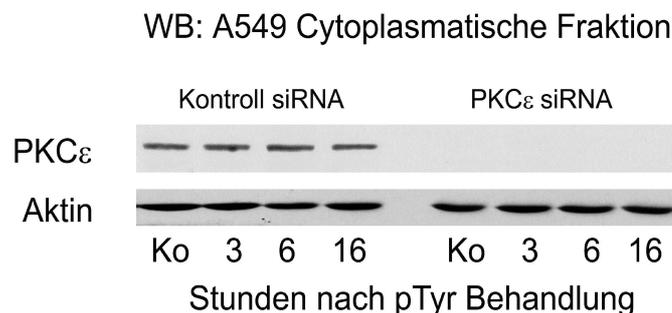


Abb. 3.20: Transfektion mit spezifischer PKC ϵ -siRNA führt zur Inhibition der Proteinexpression im Cytoplasma von A549.

Die Transfektion wurde wie in 2.2.10. beschrieben durchgeführt und die Zellen im Anschluß an die pTyr-Behandlung nach 3, 6 und 16 Stunden lysiert. Die Analyse der Proteine erfolgte über eine SDS-PAGE und anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die Proteine wurde mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde Aktin im Cytoplasma untersucht.

3.6.3.1. Hemmung der PKC ϵ Proteinexpression beeinflusst die pTyr-induzierte Signaltransduktion

Die Reduktion des PKC ϵ -Proteins hatte zwangsläufig eine damit assoziierte Abnahme der Kinaseaktivität zur Folge. Hier als Autophosphorylierung am Serinrest 729 dargestellt. Als Folge konnte ebenfalls eine massive Hemmung der EGFR Akkumulation und der damit assoziierten

Threoninphosphorylierung am T654 des nukleären EGFR festgestellt werden. Auch die pTyr-vermittelte Aktivierung der PKC ϵ , Akkumulation des kernständigen EGFR und die Phosphorylierung am T654 konnte durch die Hemmung der PKC ϵ Proteinexpression vollständig unterdrückt werden (Abb.3.21 A und B). Um die Spezifität der verwendeten siRNA zu überprüfen, wurde die Expression des Strukturproteins Lamin B1 und des DNS-Reparatur-relevanten Proteins DNA-PK untersucht. Beide Proteine wurden in ihrer Expression weder durch die Transfektion noch durch die pTyr-Behandlung beeinflusst. Die Phosphorylierung der DNA-PK am Threoninrest 2609 spielt eine wichtige Rolle in der strahleninduzierten und der pTyr-stimulierten DNS-Reparatur. Sie ist assoziiert mit der Akkumulation des EGFR im Zellkern. Die Hemmung der PKC ϵ führte ebenfalls zur Hemmung der DNA-PK Phosphorylierung. Dasselbe war auch im Fall einer pTyr getriebenen DNA-PK Aktivierung zu beobachten. Diese Ergebnisse waren sowohl in der Lungenkarzinomzelllinie A549 (Abb.3.21 A) als auch in der Glioblastomzelllinie A172 (Abb.3.21 B) nachzuweisen.

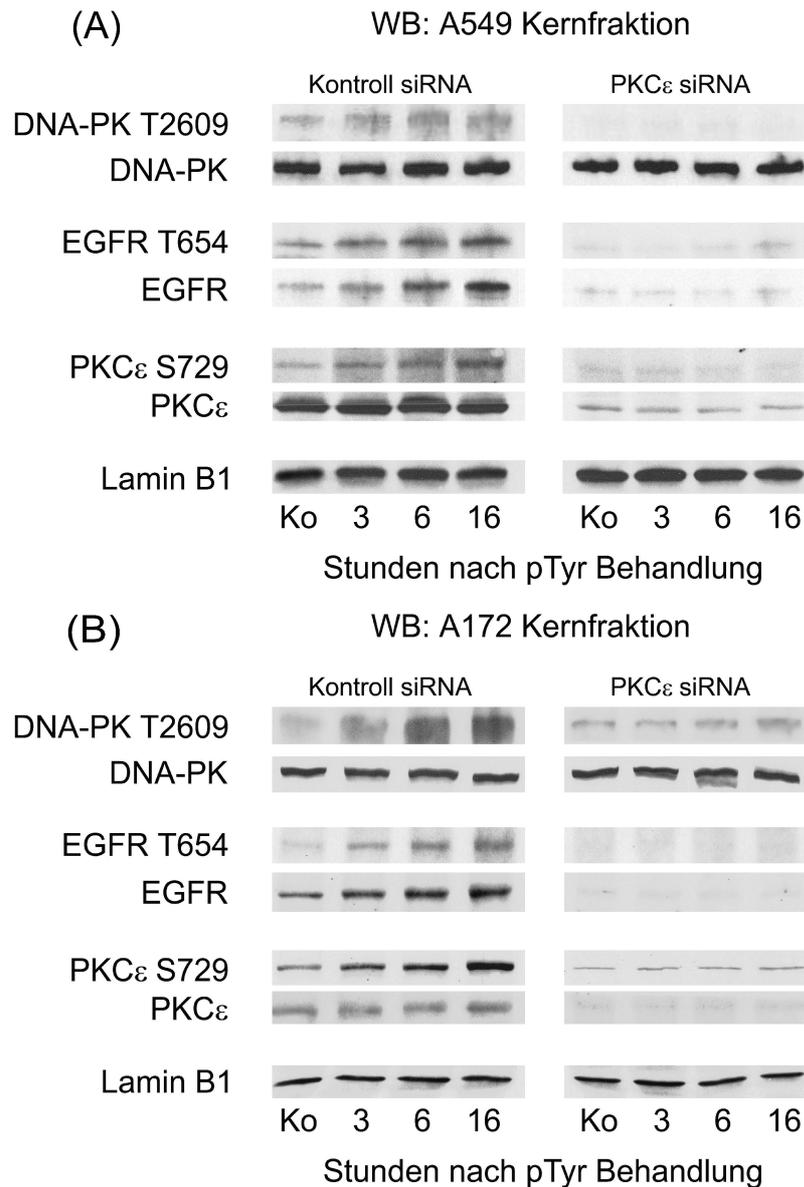


Abb. 3.21: Auswirkungen einer PKC ϵ -Hemmung mittels siRNA auf die pTyr-induzierte Akkumulation des EGFR, dessen Phosphorylierung am T654 und die Aktivierung der DNA-PK im Zellkern.

Die Zellen wurden 48 Stunden vor Behandlungsbeginn mit 30nM spezifischer siRNA transfiziert und dann für 3, 6 und 16 Stunden mit pTyr inkubiert. Eine Western-Blot-Analyse zeigte den Einfluss der Hemmung der PKC ϵ Proteinexpression auf die Phosphorylierungszustände des EGFR am T654 und der DNA-PK am T2609 im Zellkern von A549 (A) und A172 (B) nach pTyr Behandlung.

3.6.3.2. PKC ϵ ist essentiell für pTyr-vermittelte DNS-Reparaturprozesse nach ionisierender Bestrahlung

Um den Einfluss der PKC ϵ auf DNS-Reparaturprozesse nach Bestrahlung näher zu untersuchen wurden γ H2AX-positive Foki in A549 24 Stunden nach Bestrahlung mit unterschiedlichen

Dosen ausgewertet. Die Unterdrückung der Expression des PKC ϵ Proteins mittels spezifischer siRNA führte zu einer dosisabhängigen, signifikanten Erhöhung der Anzahl an residualen DNS-Schäden (Abb.3.22). Eine Reduktion der strahleninduzierten Schäden nach einer pTyr Vorbehandlung konnte unter Kontrollbedingungen in allen Dosen nachgewiesen werden, wohingegen dieser positive pTyr-Effekt nach Hemmung der PKC ϵ -Proteinexpression vollständig aufgehoben war. Die Menge an Schäden unter dieser Bedingung war im Vergleich zum reinen PKC ϵ -“*knock-down*“ noch weiter erhöht (Abb.3.22).

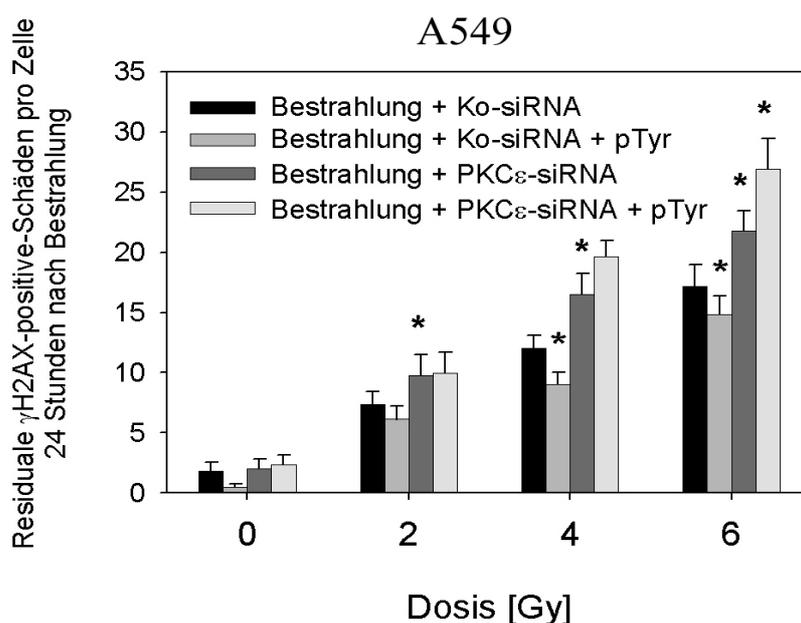


Abb. 3.22: Die Hemmung der PKC ϵ reduziert die DNS-Reparatur und blockiert den pTyr-vermittelten radioprotektiven Effekt.

A549 wurden für 48 Stunden mit spezifischer oder Kontroll si-RNA transfiziert und anschließend 16 Stunden mit pTyr inkubiert. Anschließen wurden die Zellen mit den entsprechenden Dosen bestrahlt und 24 Stunden danach fixiert. Die Restschäden wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen die phosphorylierte Form des γ H2AX-Histons visualisiert. Alle Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler der positiven Foki pro Nukleus 24 Stunden nach Bestrahlung. Für jeden Datenpunkt wurden 500 Nuklei aus je 3 unabhängigen Versuchen ausgewertet (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Asterisken beschrieben (students t-test; $p < 0,05$) und stellen jeweils das Verhältnis zwischen Kontroll-siRNA behandelten Zellen und PKC ϵ -siRNA Transfizierten dar.

3.6.3.3. „PKC ϵ -knock-down“ eliminiert die pTyr-vermittelte Radioprotektion im klonogenen Überleben

Entsprechend der Daten des DNS-Reparatur-Tests wurde auch im klonogenen Überleben in A549 eine Korrelation zwischen PKC ϵ -Proteinexpression und einer pTyr-vermittelten Radioprotektion gefunden. Zellen in denen die PKC ϵ Expression mittels siRNA-Transfektion

Ergebnisse

unterdrückt wurde, zeigten dosisabhängig eine deutlich schlechtere Überlebensrate im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abb.3.23). In einer Kombinationsbehandlung in der PKC ϵ -defiziente Zellen mit pTyr vorbehandelt wurden, konnte der radioprotektive Effekt, der unter Kontrollbedingungen durch pTyr-Gabe zu finden war, nicht mehr beobachtet werden (Abb.3.23).

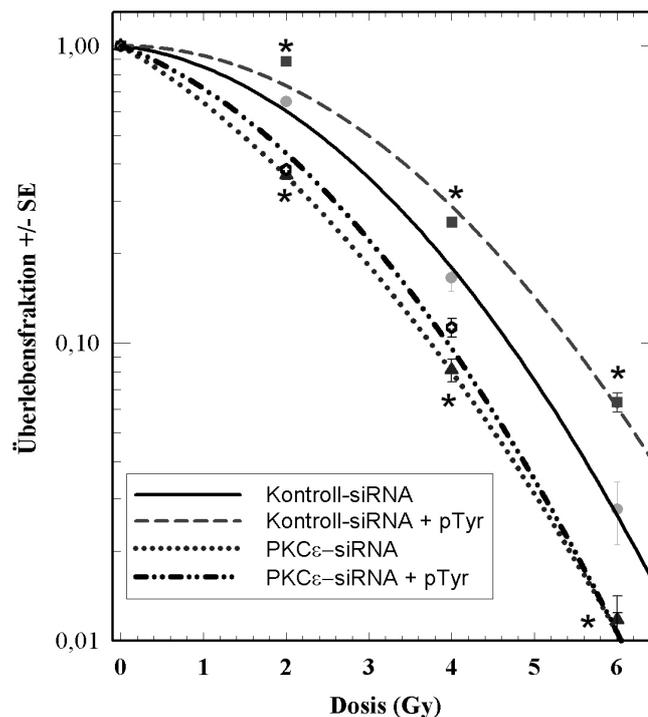


Abb. 3.23: Effekt einer PKC ϵ Hemmung auf das klonogene Überleben und die pTyr induzierte Radioprotektion in A549.

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit spezifischer PKC ϵ -siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend in Schalen ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen 16 Stunden mit pTyr inkubiert und im Anschluß mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt. 10 Tage nach Bestrahlung wurden die Kolonien (>50 Zellen) quantifiziert und die Überlebensfraktion berechnet. Jeder Wert zeigt den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen +/- Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Asterisken beschrieben (students t-test; $p < 0,05$) und stellen jeweils das Verhältnis zwischen Kontroll-siRNA behandelten Zellen und PKC ϵ -siRNA Transfizierten dar.

3.7. Wechselbeziehung zwischen Diacylglycerol, der Diacylglycerol Kinase θ und dem nukleären EGFR

Die Familie der Diacylglycerol Kinasen (DGKs) ist verantwortlich für die intrazelluläre aber auch intranukleäre Menge an Diacylglycerol (DAG) und dessen mengenmäßige Regulation. Dieser „Second Messenger“ hat Einfluss auf die Aktivierung verschiedener Proteinkinase C Isoformen und könnte so ebenfalls in der pTyr-induzierten Signalkaskade involviert sein.

Um zu untersuchen, ob die nukleäre DAG Kinase θ (DGK θ) Isoform und der EGFR im Zellkern miteinander interagieren, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, in denen die Beeinflussung einer Komplexbildung dieser beiden Proteine nach pTyr-Behandlung oder Bestrahlung in A549 untersucht wurde (Abb.3.24 A und B).

Es konnte eine ansteigende Menge an Immunkomplexen von EGFR und DGK θ in Abhängigkeit der pTyr-inkubierten Zeit beobachtet werden (Abb.3.24 A). Auch im Falle einer Bestrahlung mit 4 Gy konnte eine Stimulierung der Komplexbildung nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit pTyr 16 Stunden vor Bestrahlung führte zu einer signifikanten Erhöhung der basalen Bindung zwischen DGK θ und dem EGFR in der unbestrahlten Kontrolle. Die folgende Bestrahlung konnte die Immunkomplexbildung jedoch nicht über das Niveau der Strahleninduzierten erhöhen (Abb.3.24 B).

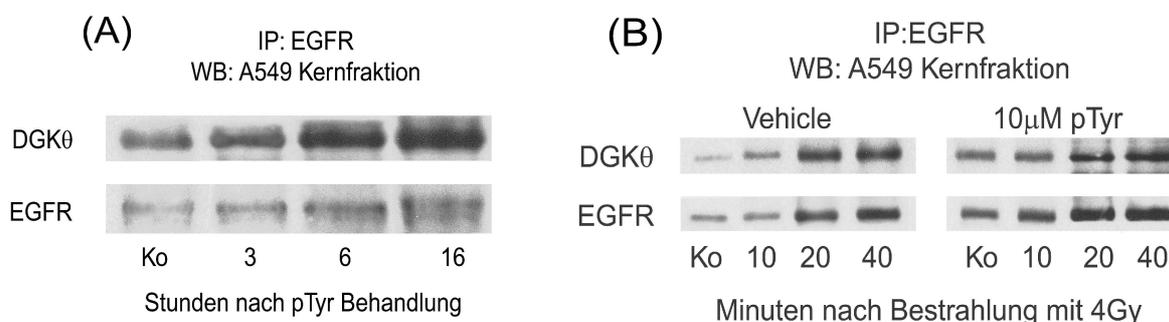


Abb. 3.24: pTyr-vermittelte und strahleninduzierte Bindung der DGK θ an den EGFR im Zellkern von A549.

Die konfluenten Zellen wurden für 3, 6 und 16 Stunden mit pTyr behandelt (A) oder 16 Stunden mit pTyr vorinkubiert und anschließend mit 4 Gy bestrahlt (B). Anschließend wurde die Kernfraktion isoliert und der EGFR immunpräzipitiert. Der Nachweis der koimmunpräzipitierten DGK θ wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers vorgenommen, nachdem die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden.

3.7.1. Effekte einer Beeinflussung der Interaktion zwischen EGFR und DGK θ mittels Inhibitorbehandlung und siRNA Transfektion

Der Kinaseinhibitor R59949 ist als spezifischer DGK-Inhibitor beschrieben [106]. Um den unmittelbaren Einfluss der DGK θ im Zellkern von A549 auf die Aktivierung der PKC ϵ und der damit assoziierten Akkumulation des nukleären EGFR zu ermitteln, wurde eine Behandlung der Zellen für 1,3 und 6 Stunden in einer Konzentration von 600nM durchgeführt ($IC_{50} = 200nM$). Die Inhibitorinkubation führte zu einer vermehrten Akkumulation des nukleären EGFR und

Ergebnisse

dessen Threoninphosphorylierung an der Position T654. Ein Maximum wurde nach sechs Stunden Inhibitorgabe beobachtet. Auch konnte eine Aktivierung der PKC ϵ mittels Quantifizierung der Phosphorylierungstellen Serin729 der PKC ϵ nachgewiesen werden. Die Behandlung führte jedoch nicht zu einer Reduktion der DGK θ - und PKC ϵ -Proteinexpression (Abb.3.25 A).

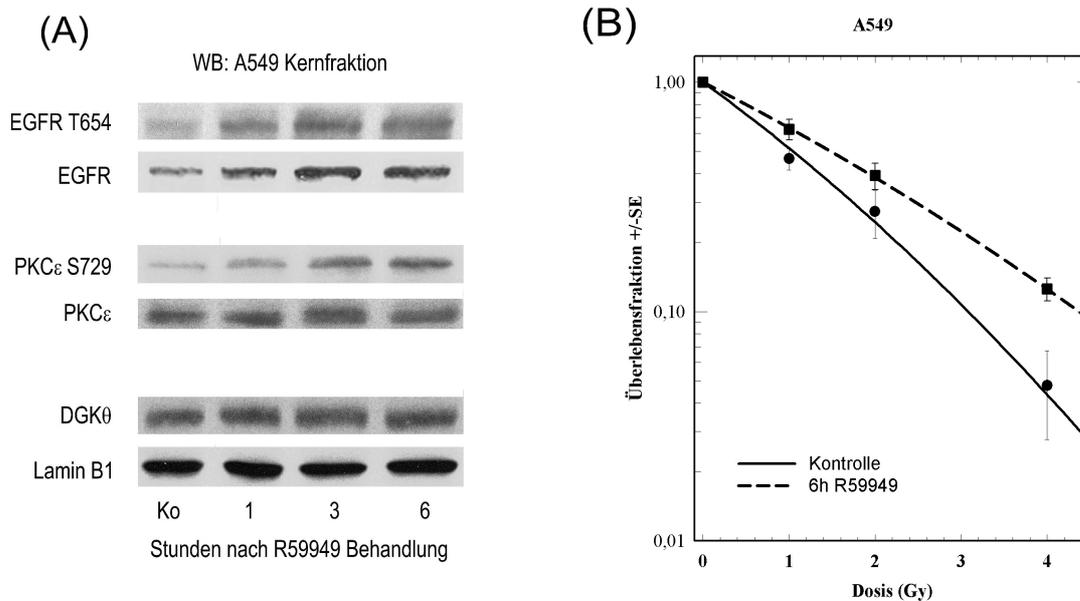


Abb. 3.25: Einfluss des DAG Kinaseinhibitors R59949 auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung, die Aktivierung der nukleären PKC ϵ und die Akkumulation des EGFR und dessen Phosphorylierung am T654 im Zellkern.

(A): Konfluente A549 wurden für 1, 3 und 6 Stunden mit 600nM R59949 inkubiert und die Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert. Antikörper gegen die phosphorylierten Formen der PKC ϵ (Serin 729) und des EGFR (Threonin 654) wurden zuerst mit der Membran inkubiert. Nach der Detektion wurden die Blots gestrippt und mit Antikörpern gegen die Gesamtproteine inkubiert. **(B):** 500 A549 Zellen wurden pro Bedingung ausgesät und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß an eine Behandlung für 6 Stunden mit 600nM R59949 wurde das Medium gewechselt und der Inhibitor entfernt. Danach folgte eine Bestrahlung mit 2, 4 und 6Gy. Die Überlebensfraktion wurde bestimmt (Kolonien >50 Zellen). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen.

Im klonogenen Überleben führte eine Vorbehandlung der Zellen mit R59949 für 6 Stunden vor Bestrahlung zu einer signifikant erhöhten der Überlebensrate in allen verabreichten Dosen (Abb.3.25 B). Diese Daten sprechen für einen regulierenden Einfluss der nukleären DAG Kinase auf die EGFR Akkumulation im Kern und die damit assoziierte positive Beeinflussung der Überlebensrate im klonogenen Überleben nach ionisierender Bestrahlung.

Der Inhibitor R59949 induzierte per se eine Stimulierung der PKC ϵ -abhängigen EGFR Akkumulation und der damit assoziierten Phosphorylierung am T654 des EGFR. Eine weitere

Erhöhung konnte nach Inhibitorbehandlung weder durch Bestrahlung (Abb.3.26 B) noch durch pTyr-Gabe (Abb.3.26 A) erreicht werden.

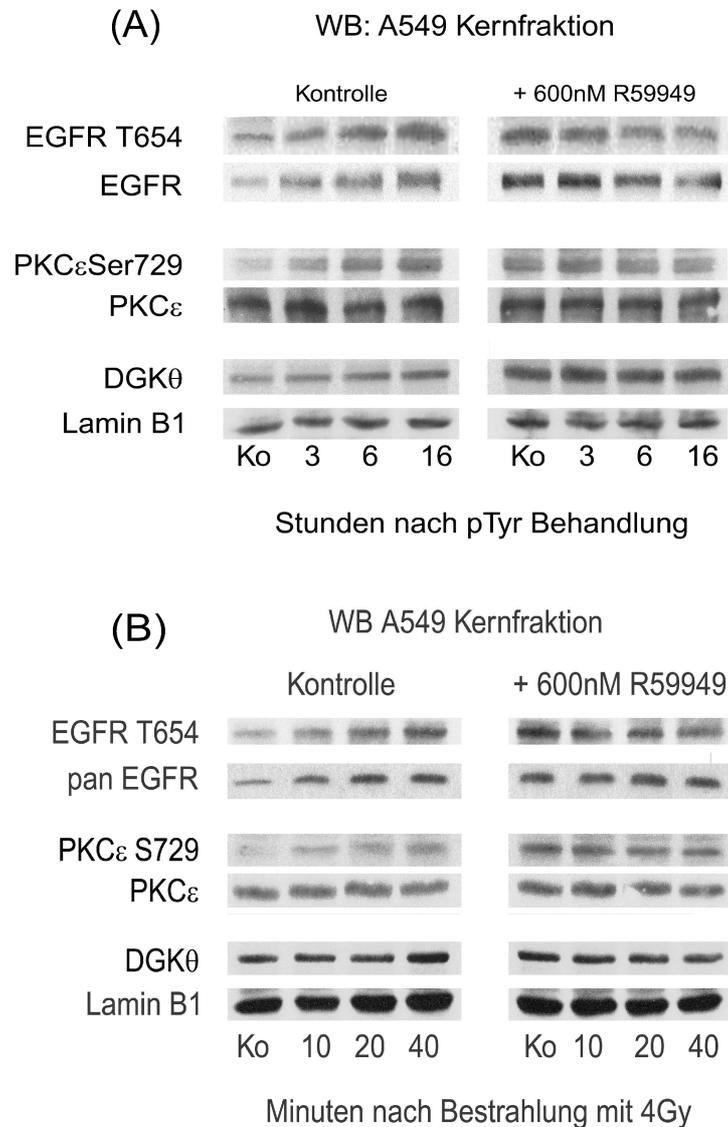


Abb. 3.26: Auswirkung einer DAG Kinase-Hemmung auf die pTyr-vermittelte und strahleninduzierte PKC ϵ Aktivierung und Translokation des EGFR in den Zellkern.

Konfluente A549 wurden in cytoplasmatische und nukleäre Fraktionen getrennt nachdem sie für unterschiedliche Zeitintervalle mit pTyr vorbehandelt (A) oder mit 4Gy bestrahlt und 10 oder 40 Minuten nach Bestrahlung abgenommen (B) wurden. In beiden Fällen wurden die Zellen vor Behandlung oder Bestrahlung mit 600nM R59949 behandelt.

Diese Ergebnisse ließen sich auch durch eine Transfektion mittels spezifischer siRNA verifizieren. Es konnte eine maßgebliche Reduktion der Proteinexpression von DGK θ in A549 erreicht werden (Abb.3.27). Durch diesen temporären „DGK θ -Knock-Down“ konnten im folgenden Versuch der Einfluss der DGK-Isoform θ auf die pTyr-induzierte EGFR

Ergebnisse

Translokation und deren nachfolgender Signalimpulsvermittlung untersucht werden. Durch die Reduktion des DGK θ -Proteins, sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern von A549, wurde die Akkumulation des kernständigen EGFR deutlich gesteigert. Assoziiert mit dieser vermehrten Anreicherung wurde ebenfalls eine stimulierte Phosphorylierung des EGFR am Threonin 654 induziert. Eine pTyr-induzierte Stimulation der EGFR Akkumulation und Threonin 654 Phosphorylierung nach 6 und 16 stündiger Inkubation konnte im Fall einer DGK θ -Proteinexpressions-Hemmung nicht mehr beobachtet werden (Abb.3.27).

Eine Auswirkung auf die pTyr-induzierte Aktivierung der PKC ϵ konnte ebenfalls festgestellt werden. Die Verminderung der DGK θ -Expression beeinflusste nicht die Expression der PKC ϵ , stimulierte jedoch signifikant die Phosphorylierung dieser am Serinrest 729, welcher stellvertretend für den Aktivierungszustand der Kinase steht. Eine weitere pTyr-stimulierte PKC ϵ Phosphorylierung konnte nach DGK θ -Proteinreduktion nicht mehr beobachtet werden (Abb.3.27).

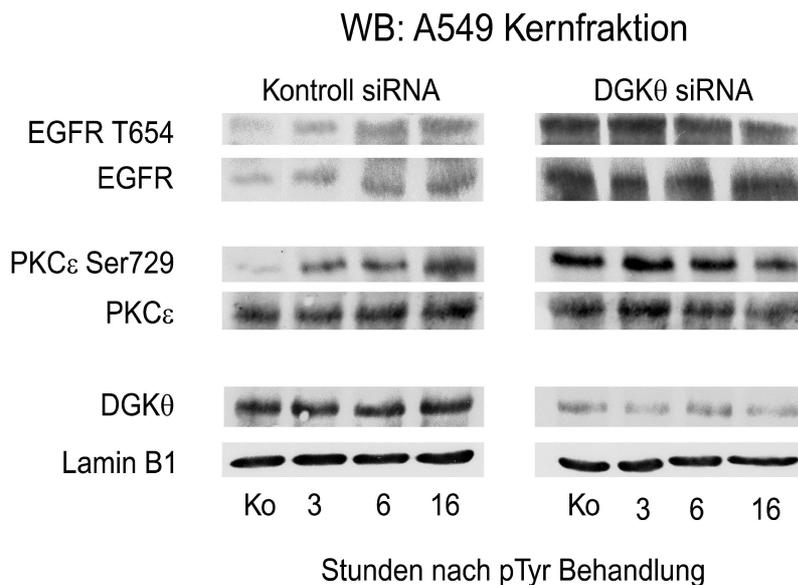


Abb. 3.27: pTyr induzierte PKC ϵ Aktivierung und EGFR Translokation in den Zellkern wird durch Hemmung der DGK θ Proteinexpression überlagert.

A549 wurden für 48 Stunden mit spezifischer DGK θ -siRNA transfiziert (siehe 2.2.10.) und für verschiedene Zeiträume mit pTyr behandelt. Der Isolation der Kernproteine folgte eine Western-Blot-Analyse und eine Quantifizierung mittels spezifischer Antikörper, wobei zuerst die phosphorylierten Formen der nachzuweisenden Proteine mit der Membran inkubiert wurden.

3.7.2. Einfluss von PIP₂ und dessen Spaltprodukt Diacylglycerol auf den Aktivierungsstatus der PKC ϵ und die Akkumulation des EGFR im Zellkern.

Um den Einfluss des „*Second Messengers*“ Diacylglycerol (DAG) auf die PKC ϵ Aktivierung im Zellkern und die damit assoziierte EGFR Phosphorylierung am T654 zu untersuchen, wurde ein DAG-Analog (1-Oleoyl-2-Acetyl-SN-Glycerol; OAG) [107] in einer Endkonzentration von 20 μ M für verschiedene Zeitintervalle mit den Zellen inkubiert (Abb. 3.28). Die Behandlung mit OAG führte bereits nach fünf Minuten zu einer erhöhten Phosphorylierung am Serinrest 729 der PKC ϵ . Die PKC ϵ -abhängige Phosphorylierung des nukleären EGFR am T654 konnte ebenfalls mit einer OAG-Gabe induziert werden, was mit einer Translokation des EGFR in den Zellkern korrelierte. Auch die DNA-PK Phosphorylierung am T2609, welche bereits in Zusammenhang mit dem nukleären EGFR beschrieben wurde zeigt eine signifikante Zunahme nach OAG-Gabe (Abb. 3.28). Die Stimulation dieser Phosphorylierungen an den nachgewiesenen Proteinen und die damit verbundene Akkumulation des EGFR deutet auf eine Beeinflussung dieses auch durch pTyr induzierbaren Prozess durch OAG und dessen Analog Diacylglycerol im Zellkern hin.

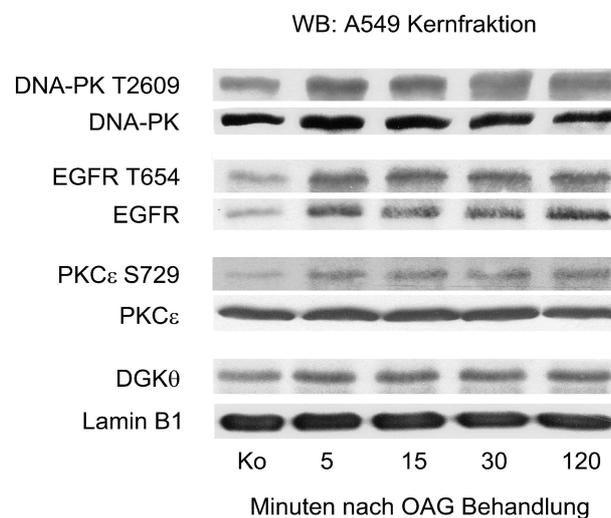


Abb. 3.28: Das DAG-Analog (OAG) beeinflusst die Kinaseaktivität der PKC ϵ , die Akkumulation des EGFR und dessen Phosphorylierung am T654 und die damit assoziierte Aktivierung der DNA-PK im Zellkern von A549.

Die konfluente Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit 20 μ M OAG inkubiert und anschließend ihre Kernfraktion isoliert. Die phosphorylierten Formen der Proteine, welche mittels Western-Blotting transferiert wurden, wurden als erste auf der Membran nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit den Antikörpern gegen die Gesamtproteine inkubiert.

Ergebnisse

Die Hydrolyse des Phospholipids PIP₂ (Phosphatidylinositol Bisphosphat) in seine Spaltprodukte IP₃ (Inositol Trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol) ist ein wichtiger Weg zur Generierung des „*Second messengers*“ DAG und der damit assoziierten Signalvermittlung. In folgenden Versuchen konnte mittels einer PIP₂-Quantifizierung in A549 nachgewiesen werden, dass sowohl Bestrahlung mit 4Gy als auch eine pTyr Inkubation zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an PIP₂ in der Zelle führt (Abb.3.29 A und B). Bereits fünf Minuten nach Bestrahlung stieg die PIP₂-Menge um das Doppelte an und blieb auf diesem erhöhten Niveau bis zu 40 Minuten nach 4 Gy. Eine 16 stündige Präinkubation der Zellen vor Bestrahlung führte bereits basal zu einem Anstieg der PIP₂-Menge um das 2,5-fache und konnte durch folgende Bestrahlung nicht weiter erhöht werden, verblieb aber auf dem hohen Level des Basalwertes (Abb.3.29 A und B).

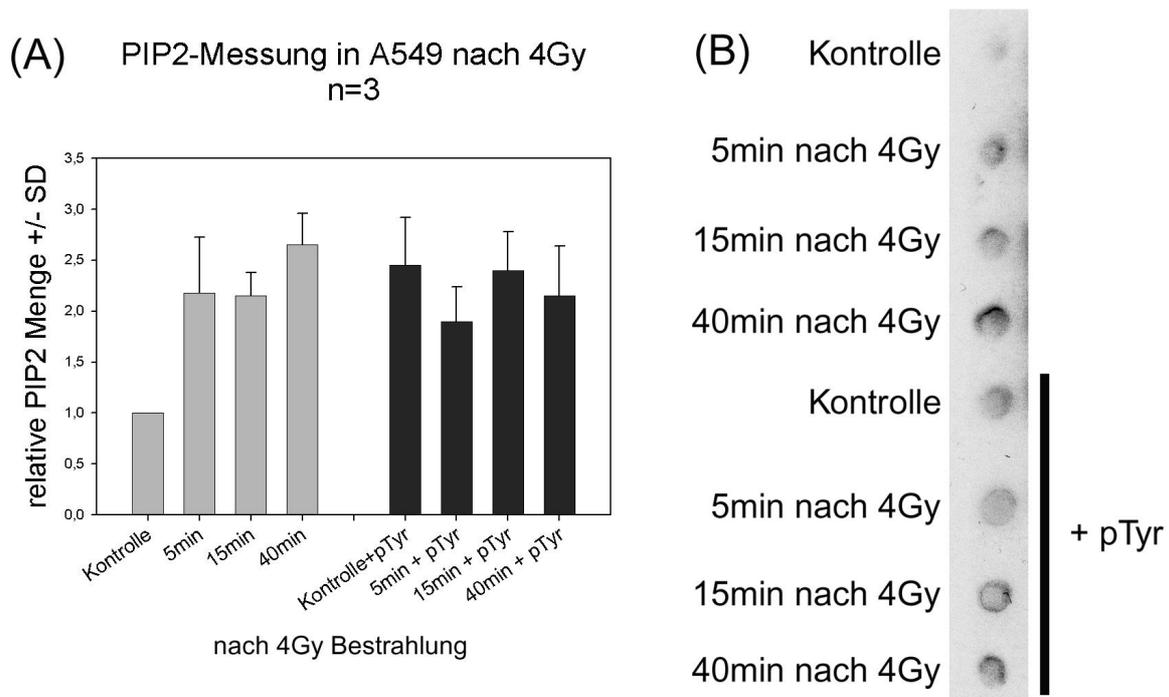


Abb. 3.29: pTyr und ionisierende Bestrahlung induzieren Anstieg der intrazellulären PIP₂ Menge.

5 x 10⁶ Zellen A549 wurden 16 Stunden mit pTyr vorbehandelt oder auch nicht und anschließend mit 4Gy bestrahlt. 10 oder 40 Minuten nach Bestrahlung wurden die Proben mit Hilfe des Echelon-Kits (PIP₂-Quantifizierungs-Kit) und nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet und die sauren Lipide isoliert. Eine Quantifizierung von PIP₂ erfolgte durch densitometrische Auswertung.

(B): Repräsentatives Resultat eines PIP₂-Quantifizierungs-Assays (A): Werte stellen das arithmetische Mittel +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) dar. Alle Datenpunkte wurden auf die unbestrahlte und unbehandelte Kontrolle normalisiert.

Im Falle einer pTyr-Behandlung für unterschiedlich lange Zeitintervalle zeigte sich erst nach 6 Stunden eine signifikante Erhöhung der PIP₂-Expression in A549. Eine 2,5-fache Erhöhung der

PIP₂-Menge konnte nach 16 stündiger pTyr Inkubation nachgewiesen werden. Kurze Inkubationen im Minutenbereich zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen Effekt auf die PIP₂-Generierung in A549 (Abb. 3.30 A und B).

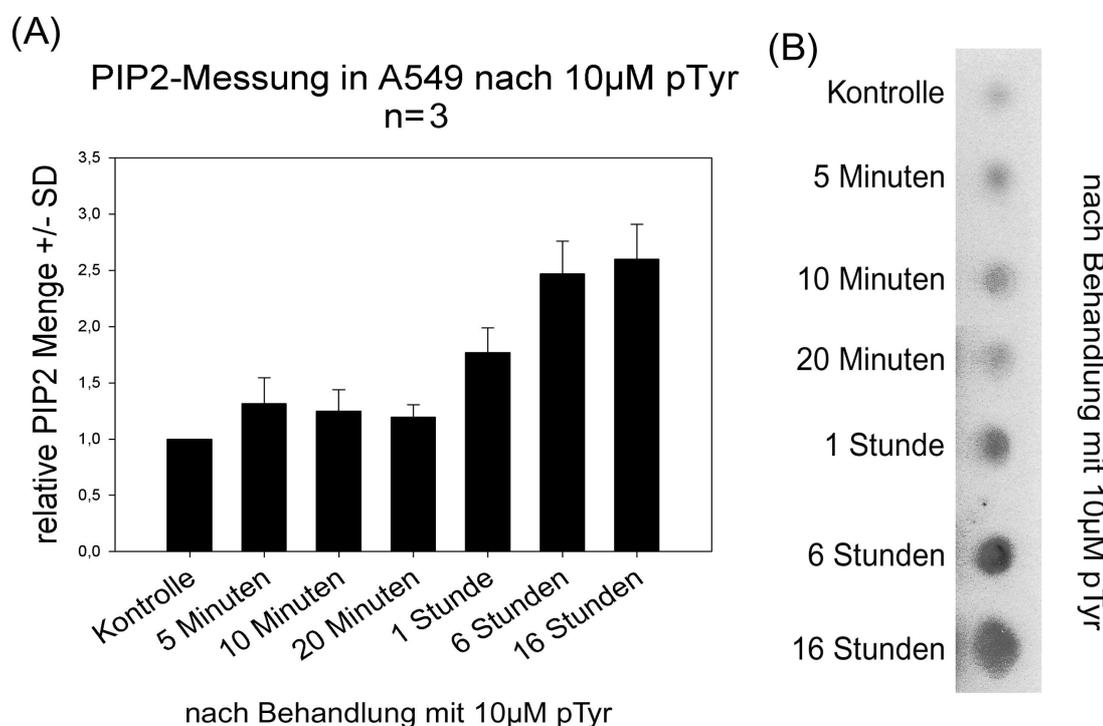


Abb. 3.30: pTyr induziert Anstieg der intrazellulären PIP₂ Menge.

5 x 10⁶ Zellen A549 wurden für unterschiedliche Zeitintervalle mit 10µM pTyr vorbehandelt. Nach der bestimmten Inkubation wurden die Proben mit Hilfe des Echelon-Kits (PIP₂-Quantifizierungs-Kit) und nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet und die sauren Lipide isoliert. Eine Quantifizierung von PIP₂ erfolgte durch densitometrische Auswertung.

(B): Repräsentatives Resultat eines PIP₂-Quantifizierungs-Assays (A): Werte stellen das arithmetische Mittel +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) dar. Alle Datenpunkte wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

3.8. Auswirkungen einer pTyr-Behandlung auf den Protein-DNS-Bindungsmechanismus nach Bestrahlung

Wie bereits beschrieben, beeinflusst der nukleär akkumulierte EGFR sowohl nach ionisierender Bestrahlung als auch nach pTyr-Behandlung die DNS-Reparatur. Eine wichtige Rolle spielt hier als Reparaturprozess die Nicht-Homologe-DNS-Reparatur (*Non-homologous-Endjoining*; NHEJ) von Doppelstrangbrüchen. Die Bindung spezieller Reparaturproteine an die DNS ist für diesen Vorgang unverzichtbar. Eines der essentiellen Proteine in diesem Prozess ist die DNA-PK, im Speziellen die am T2609 phosphorylierte Form. Diese Kinase wurde bereits als

Ergebnisse

Interaktionspartner des nukleären EGFR nach Bestrahlung beschrieben und wird von diesem in ihrer Aktivität beeinflusst [58].

Im Folgenden wurde die durch eine pTyr-Inkubation induzierte Bindung des EGFR und der phosphorylierten DNA-PK an die DNS untersucht. Hierfür wurden die nukleären Proteine der Zellen nach Behandlung mit pTyr und/oder Bestrahlung mittels Formaldehyd an die DNS gebunden („DNA-Protein-Crosslink“) [100] und konnten so über eine SDS-Page analysiert und quantifiziert werden.

3.8.1. Eine pTyr-Behandlung beeinflusst nicht die Bindung des EGFR und der DNA-PK an die DNS

Eine Präinkubation mit pTyr für verschiedene Zeiträume zeigte keine Induktion der Bindung von EGFR und phosphorylierter DNA-PK am Threonin 2609 an die DNS in den verwendeten Zelllinien A549 (Abb.3.30 A) und A172 (Abb.3.30 B).

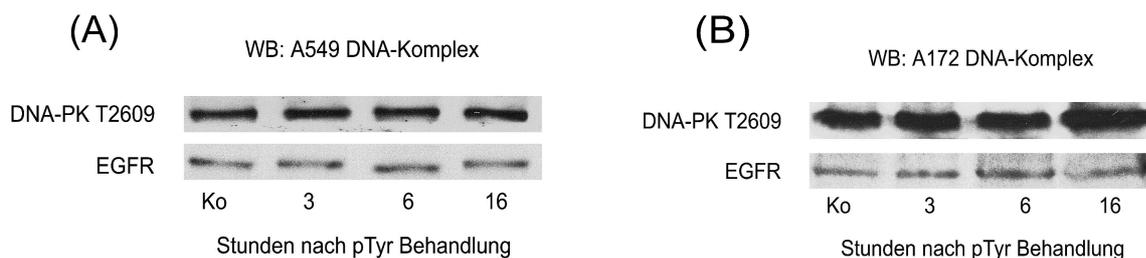


Abb. 3.31: pTyr zeigt keinen Wirkung auf die Bindung des EGFR und der phosphorylierten DNA-PK am T2609 an die DNS im Zellkern.

Konfluente A549 (A) und A172 (B) wurden für verschiedene Zeitintervalle mit pTyr behandelt. Nach der Isolierung der Kernfraktion wurden die Proteine an die DNS gebunden (DNA-crosslink). Die Prozedur wurde wie in 2.2.12. beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse.

3.8.2. Ionisierende Bestrahlung induziert Bindung des EGFR und der aktivierten DNA-PK an die DNS

Im Gegensatz hierzu induziert Bestrahlung mit 4 Gy innerhalb von 10 Minuten eine Proteinbindung an die DNS in beiden Zelllinien. Sowohl der kernständige EGFR als auch die DNA-PK in ihrer phosphorylierten Form binden in beiden untersuchten Zelllinien bis zu drei Stunden nach Bestrahlung an die DNS. Nach 16 Stunden sind beide Proteine wieder nahezu vollständig von der DNS abgelöst (Abb.3.31 A und B).

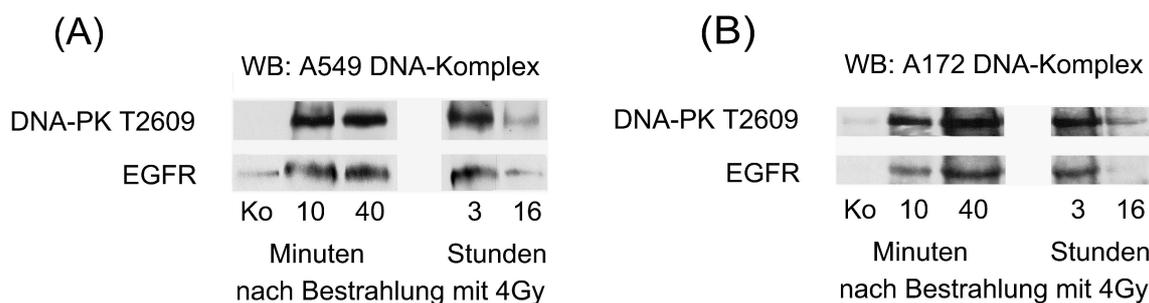


Abb. 3.32: Strahleninduzierte Bindung des EGFR und der aktivierten DNA-PK an die DNS.
 A549 (A) und A172 (B) wurden mit 4 Gy bestrahlt und 10 und 40 Minuten danach ihre Kernfraktion isoliert. Die Bindung der Proteine an die DNS wurde wie in 2.2.12. beschrieben durchgeführt und anschließend eine Western-Blot-Analyse ausgeführt.

3.8.3. Eine pTyr-Vorbehandlung stimuliert die Bindung von Reparaturproteinen an die DNS nach Bestrahlung

Eine Kombination aus einer 16 stündigen Präinkubation mit pTyr und einer anschließenden Bestrahlung mit 4 Gy führte in der unbestrahlten Kontrolle zu keiner vermehrten Bindung der untersuchten Proteine. Es konnte jedoch 10 und 40 Minuten nach 4 Gy in den Proben, die mit pTyr vorbehandelt wurden, im Vergleich zu den nicht-vorbehandelten Zellen, eine erhöhte Bindung des EGFR und der DNA-PK an die DNS beobachtet werden. Diese Ergebnisse treffen sowohl auf A549 (Abb.3.32 A) als auch auf A172 (Abb.3.32 B) zu.

Die Zellen die eine pTyr-Vorbehandlung erhalten haben, zeigten eine erhöhte Bindungskapazität der untersuchten Proteine im Zellkern.

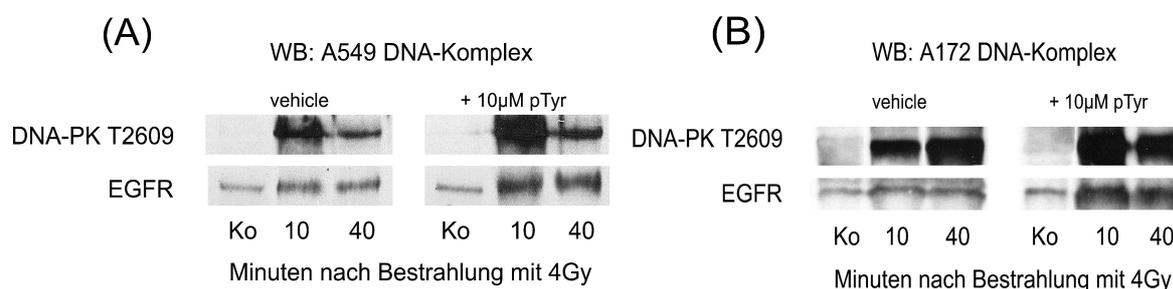


Abb. 3.33: pTyr steigert die strahleninduzierte Bindung des EGFR und der phosphorylierten DNA-PK an die DNS.

Konfluente A549 (A) und A172 (B) wurden 16 Stunden vor Bestrahlung mit pTyr inkubiert. 10 und 40 Minuten nach 4 Gy wurden die Kernfraktionen separiert und der DNS-Protein-Crosslink ausgeführt. Die Quantifizierung der Proteine geschah mittels einer Western-Blot-Analyse und spezifischen Antikörpern.

4. Diskussion

Substanzen mit radioprotektiven Effekten bergen in ihrer Wirkungsweise aus therapeutischer Sicht die Möglichkeit strahleninduzierte Signalwege zu beeinflussen, um daraus resultierende Zellantworten in einer gewünschten Weise zu manipulieren. Mit Hilfe von Radioprotektoren könnten im klinischen Einsatz Nebenwirkungen deutlich verringert und somit die Effizienz der radioonkologischen Therapieansätze wesentlich verbessert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die radioprotektive Wirkung des Aminosäurederivats **O-Phospho L-Tyrosin (pTyr)** und die diesem Effekt zugrunde liegende Molekularbiologie und zum anderen dessen Einfluss auf die strahleninduzierte Signaltransduktion untersucht werden.

4.1. pTyr verbessert das Überleben nach Bestrahlung durch Beeinflussung der DNS-Reparatur in wildtyp-TP53 Zelllinien

Verschiedene Zellsysteme zeigen individuelle Strahlenempfindlichkeiten. Diese Tatsache kann von vielen Faktoren abhängig sein (Alter, Differenzierungszustand, Konfluenz, Qualität der Strahlung, etc.). Auch in Bezug auf das Ansprechen einer pTyr-Behandlung vor Bestrahlung konnte eine individuelle Zellantwort beobachtet werden. Mishra et al. berichten von einer Hemmung der Proliferation in humanen Nierenkarzinom- und Brustkrebszellen durch eine pTyr Behandlung im millimolaren Bereich. In diesem Zusammenhang wurde eine hemmende Wirkung von pTyr auf die liganden-induzierte Tyrosinphosphorylierung am EGFR durch Stimulierung der Phosphataseaktivität diskutiert [26]. In der vorliegenden Studie konnte in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, dass in Abhängigkeit vom TP53 Status der Zelllinie eine pTyr-Vorbehandlung im mikromolaren Bereich das Überleben nach Bestrahlung signifikant verbessert. Sowohl normale Hautfibroblasten als auch Tumorzellen, die ein wildtyp-TP53 exprimieren, zeigten nach ionisierender Bestrahlung ein deutlich verbessertes Überleben, jedoch keine Hemmung des Proliferationsverhalten, wie ursprünglich von Mishra et al. diskutiert [26]. Im Gegensatz hierzu konnten Tumorzellen mit einem mutierten TP53 durch eine pTyr-Gabe vor Bestrahlung nicht radioprotectiert werden. Die Abhängigkeit der radioprotektiven Aktivität des pTyr vom TP53 Status der Zellen konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [25]. Interessanterweise kann dieser radioprotektive Effekt auf das Überleben nach ionisierender Bestrahlung mit der Fähigkeit der Zellen korreliert werden DNS-Schäden zu reparieren. Man geht aktuell davon aus, dass auf zellulärer Ebene radiogene Schäden primär durch nicht- oder falsch reparierte DNS-Schäden initiiert werden. Im Fall einer pTyr-

Vorbehandlung konnte in Zellen mit wt. TP53 eine eindeutige Verbesserung der strahleninduzierten DNS-Reparatur nachgewiesen werden, wohingegen Zellen mit mt. TP53 keinen Vorteil in Bezug auf DNS-Reparaturprozesse nach Bestrahlung zeigten. Diese Stimulierung der DNS-Reparatur durch pTyr und die damit verbundene positive Beeinflussung der Qualität der Strahlenantwort konnte nur in Normalgewebszellen und wt. TP53 Zelllinien beobachtet werden. Berichte über eine Rolle von TP53 während der DNS-Reparatur zeigen, dass die funktionelle Verfügbarkeit dieses Protein eine wichtige Rolle bei der Regulierung von DNS-Schäden nach Bestrahlung spielt [108][109]. Eine Behandlung mit pTyr, unabhängig von Bestrahlung, zeigte in keiner der untersuchten Zelllinien eine Induktion von DNS-Schäden. Dies lässt den Schluß zu, dass eine Behandlung mit pTyr zu einer qualitativen Verbesserung der DNS-Reparatur führt ohne die DNS per se zu schädigen. Im Folgenden konnten wir das mit dem verbesserten Zellüberleben nach pTyr-Vorinkubation korrelieren. Diese Daten geben einen ersten Hinweis auf die pTyr-vermittelte Wirkungsweise und zeigen die positive Beeinflussung der DNS-Reparaturmechanismen durch pTyr nach ionisierender Bestrahlung.

4.2. pTyr-induzierte nukleäre EGFR-Akkumulation ist essentiell für seine radioprotektive Aktivität

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Interaktion zwischen pTyr und dem Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) zu untersuchen, um einen eventuellen Einfluss von pTyr auf die EGFR-assoziierte DNS-Reparatur zu erfassen. Eine Reihe von Arbeiten berichten von der EGFR-induzierten Aktivierung der DNS-Reparatur nach Behandlung mit verschiedenen Noxen und dem damit gekoppelten Transport des EGFR in den Zellkern als Schlüsselfunktion der zellulären Stressantwort [52][58][61]. Wie von uns in dieser Arbeit nachgewiesen, beeinflusst pTyr signifikant den Transport des EGFR in den Zellkern und übt seinen radioprotektiven Effekt in Abhängigkeit der Funktionalität dieses nukleären Transportes aus. Dies wurde unter anderem durch Hemmung des Transport mittels C225, eines monoklonalen EGFR Antikörpers, nachgewiesen [61]. Die Hemmung des pTyr-vermittelten Transports des EGFR in den Zellkern mittels C225 eliminierte den radioprotektiven Effekt einer Vorbehandlung vollständig. Dies lässt den Schluß zu, dass die pTyr-induzierte Radioprotektion von der Akkumulation des EGFR im Zellkern und der damit verbundenen Stimulierung der DNS-Reparatur abhängig ist und über diesen Weg ihre protektive Aktivität gesteuert wird [28].

Diskussion

Ein weiterer Ansatz zum Verständnis der pTyr-induzierten Signalwege und die damit verbundene Interaktion mit dem EGFR ist die Untersuchung der Modulation des Phosphorylierungszustandes des EGFR durch eine pTyr-Inkubation. Phosphorylierungen an Tyrosinresten des EGFR spielen eine Schlüsselrolle bei der Signalvermittlung und regulieren die damit assoziierten Zellantworten [110]. Ionisierende Bestrahlung und andere zelluläre Stressfaktoren können das Phosphorylierungsmuster des EGFR modulieren [111]. Auch für den Bowman-Birk-Protease-Inhibitor (BBI), einem Radioprotektor der mit pTyr wirkverwandt ist, wurde eine Interaktion mit dem EGFR beschrieben [62]. Veränderungen des Tyrosinphosphorylierungsmuster zeigen in vielen Fällen Auswirkungen auf nachgeschaltete Signalkaskaden, die die mitogene Aktivität der Zelle beeinflussen können [54]. Mishra et al. zeigten in ihren Studien eine signifikante Hemmung der Tyrosinphosphorylierung am EGFR nach einer pTyr Behandlung. Diese Hemmung geht mit einer Proliferationshemmung einher [27]. Wir konnten zeigen, dass eine Inkubation mit pTyr im mikromolaren Konzentrationsbereich ebenfalls zu einer Beeinflussung des Phosphorylierungsmusters am EGFR führt. Bestrahlung induziert ein charakteristisches Phosphorylierungsmuster am EGFR, das für nachgeschaltete Zellreaktionen funktionelle Bedeutung hat. So wurde hier untersucht, ob eine pTyr-Behandlung mit dem strahleninduzierten Phosphorylierungsmuster des EGFR interferiert.

Interessanterweise konnten wir eine Threoninphosphorylierung an der Aminosäure Nr. 654 des EGFR identifizieren, die sowohl nach Bestrahlung als auch nach einer pTyr-Behandlung vermehrt gefunden wurde. Die Phosphorylierung konnte hauptsächlich am kernständigen EGFR nachgewiesen werden. In allen Versuchen entsprach der Grad der Phosphorylierung am T654 der Akkumulationsmenge des EGFR im Zellkern. Lund et al. beschrieben die Phosphorylierungsstelle T654, die von einer Isoform der Proteinkinase C phosphoryliert wird, als ein Schlüsselement in der Internalisierungsreaktion des membranständigen EGFR [112]. Dazu passend berichtet Lin et al. von einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) in der Aminosäuresequenz des EGFR, die die identifizierte Phosphorylierungsstelle einschließt [72]. Posttranslationelle Modifikation der NLS regulieren den Kerntransport in den Zellkern [70]. Als Transportproteine sind in diesem Zusammenhang u.a. Karyopherine beschrieben, welche mittels Bindung an das Zielprotein den Transport in den Zellkern steuern [70]. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine Interaktion und Komplexbildung zwischen Karyopherin α und dem EGFR nach Bestrahlung identifizieren [58]. Es ist denkbar, dass solch

eine posttranskriptionelle Modifikation/Phosphorylierung in der NLS des EGFR die Interaktion zwischen dem Transportprotein Karyopherin α und dem EGFR beeinflussen kann.

Eine pTyr-Behandlung stimuliert per se die Phosphorylierung am T654 des kernständigen EGFR und korreliert mit der pTyr-induzierten Akkumulation des EGFR im Zellkern. Als mögliche funktionelle Aufgabe wäre denkbar, dass die Phosphorylierung am T654 des nukleären EGFR die Dissoziation des Karyopherins α vom EGFR im Zellkern reguliert. Karyopherine besitzen neben der NLS auch eine nukleäre Exportsequenz (NES) und sind somit in der Lage Proteine aus dem Zellkern zurück in das Cytoplasma zu transportieren [113]. Diese Abspaltung hat zur Folge, dass der Karyopherin-assoziierte Transportkreislauf unterbrochen wäre und der EGFR im Zellkern akkumuliert vorliegt, da er nicht wieder aus dem Zellkern exportiert werden kann. Diese und erste unveröffentlichte Daten mit Mutationen in dieser Region bestätigen diese Hypothese und zeigen, dass die Phosphorylierung am T654 des kernständigen EGFR essentiell für die pTyr- und strahleninduzierte Akkumulation des EGFR im Zellkern zu sein scheint und somit eine wichtige Rolle in der pTyr-vermittelten Radioprotektion spielt [28].

4.3. EGFR-assoziierte Signaltransduktion nach pTyr-Behandlung

Eine mögliche Initialkomponente in der pTyr-vermittelten Signalkaskade könnte der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) sein, der durch Bindung aromatischer Kohlenwasserstoffe und anderer Chemikalien/Toxine aktiviert werden kann [63]. Mehrere Berichte beschreiben eine liganden-unabhängige Modulation des Phosphorylierungsmuster am EGFR durch eine Src-abhängigen Mechanismus, der über den AhR reguliert wird. Dieser Rezeptor ist in der Lage sowohl auf toxische Substanzen als auf UV-Bestrahlung mit seiner Aktivierung zu reagieren und eine nachgeschaltete Src-vermittelte Signaltransduktion in Gang zu setzen, die eine Tyrosinphosphorylierung am EGFR zur Folge hat [66][67]. Diese Phosphorylierung am Tyrosinrest 845 des cytoplasmatischen EGFR wird von der c-Src-Kinase durchgeführt, die nach Aktivierung des Ah-Rezeptors aus dem Proteinkomplex gelöst und somit aktiviert wird [64]. Die Arbeitsgruppe um Sato konnte in A431 Zellen nachweisen, dass die Phosphorylierung am Y845 des EGFR Src-abhängig ist [114]. In der vorliegenden Arbeit konnte von uns nachgewiesen werden, dass pTyr sowohl eine Aktivierung der c-Src Kinase induziert als auch einen stabilisierenden Einfluss auf den AhRezeptor im Cytoplasma zeigt. Gleichzeitig wurde pTyr-abhängig der cytoplasmatische EGFR an der Tyrosinstelle 845 vermehrt phosphoryliert. Erste Daten aus unserem Labor zeigen einen ähnlichen Mechanismus nach ionisierender Strahlung (K.

Diskussion

Dittmann, persönliche Mitteilung). Im weiteren wurde von uns eine nukleäre Akkumulation des AhR nach pTyr-Inkubation beobachtet. Um diese pTyr-induzierte Wechselwirkung zwischen dem AhR und dem EGFR näher zu belegen, wurde mittels Immunpräzipitationen eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine nachgewiesen. Schließlich konnten wir mit Hilfe einer spezifischen Hemmung der AhR-Proteinexpression zeigen, dass die AhR-Stabilisierung eine entscheidende Rolle in der pTyr-vermittelte EGFR Akkumulation und der damit assoziierte Phosphorylierung am T654 des nukleären EGFR spielt. Diese Daten sprechen für eine pTyr-vermittelte AhR-Aktivierung, die src-abhängig zu einer EGFR Phosphorylierung am Rest 845 führt.

Ein denkbarer Mechanismus der weiteren pTyr-induzierten Signalvermittlung wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben und beschäftigt sich mit dem Transport des EGFR mittels Internalisierung/Endocytose [69][98][115]. Die src-abhängige Phosphorylierung am Y845 des EGFR und simultane Phosphorylierung am Y14 von Caveolin 1 führen zu einer Internalisierung des EGFR. Der internalisierte EGFR befindet sich dabei in perinukleären Kompartimenten, in denen er funktionell stabil gelagert wird [69] und dient wahrscheinlich als Reservoir für den Kerntransport des EGFR (K. Dittmann, persönliche Mitteilung).

In der Tat konnte von uns gezeigt werden, dass pTyr einen signifikanten Einfluss auf diesen Signalwegs ausübt. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen nach ionisierender Strahlung einen Src-getriebenen Internalisierungsweg des EGFR in Abhängigkeit von Caveolin1 (K. Dittmann, persönliche Mitteilung). Somit wäre sowohl durch pTyr als auch durch Bestrahlung ein maßgeblicher Effekt auf die Caveolin1-getriebene Internalisierung des EGFR denkbar.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse deuten unsere Daten zusammenfassend darauf hin, dass eine Inkubation mit pTyr die Aktivierung des AhR und eine damit assoziierte

Abspaltung/Aktivierung der c-Src-Kinase zur Folge hat. Die phosphorylierte/aktivierte Src-Kinase ist in der Lage den EGFR ebenso wie Caveolin1 zu phosphorylieren und damit eine Caveolin1-getriebene

EGFR-Translokation in perinukleäre Kompartimente zu stimulieren. Liao und Carpenter berichten im Zuge ihrer Arbeit von einem EGF-induzierten Transport des EGFR an das Endoplasmatische Reticulum (ER) wo der funktionelle EGFR mittels Transportproteinen einem weiteren Transport in den Zellkern unterliegt [98]. Wie bereits erwähnt, wurde in früheren Arbeiten eine strahlen-induzierte Interaktion des perinukleären EGFR mit dem Transportprotein Karyopherin α beschrieben [58]. Demzufolge wäre es für die pTyr-getriggerte Signalkaskade

ebenfalls denkbar, dass der weitere Transport des EGFR über diesen Weg läuft und er somit in den Zellkern transportiert werden kann.

Um einen tieferen Einblick den molekularen Mechanismus von pTyr und damit in die pTyr-vermittelte Signalkaskade zu gewinnen, wurde im Folgenden durch die vorliegende Arbeit die Frage beantwortet, welche Kinase für die pTyr-induzierte Phosphorylierung des nukleären EGFR an der Position T654 verantwortlich ist. Die Familie der Proteinkinase C (PKC) besitzt eine zentrale Bedeutung bei Signaltransduktionsprozessen und wird durch 12 Isoformen in nahezu allen Geweben repräsentiert. Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur, biochemischen Eigenschaften, Substratspezifitäten und Gewebeexpression [116]. Durch eine Übertragung von Phosphatgruppen auf Serin- und Threoningruppen sind sie alle in der Lage, die Aktivität nachgeordneter Proteine durch Modulation ihres Phosphorylierungszustandes zu steuern. Auf Grund dieser regulatorischen Fähigkeiten haben die PKCs eine wichtige Rolle in der cytoplasmatischen Signalweiterleitung aber auch in der Verschaltung von ankommenden Signalen im Zellkern, denn auch in ihrer subzellulären Lokalisation differieren die verschiedenen Isoformen deutlich [117][118]. Dies erlaubt ihnen hochspezifische Interaktionen mit den jeweiligen Substratmolekülen [119][120]. Lin et al. und andere Arbeitsgruppen berichten davon, dass PKCs für die Phosphorylierung am EGFR an der Position T654 verantwortlich ist [73][74]. Demzufolge untersuchten wir in dieser Arbeit den Einfluss der PKC auf die Phosphorylierung des EGFR am T654, die von uns als assoziierte Phosphorylierungsstelle der nukleären EGFR Akkumulation nach pTyr-Inkubation und Bestrahlung identifiziert wurde [28]. Des weiteren untersuchten wir den direkten Einfluss einer pTyr-Behandlung und ionisierender Bestrahlung auf den Aktivierungszustand der PKCs.

Im Zuge dieser Studie konnte die Isoform ϵ der neuartigen PKC-Subfamilie (nPKCs) ermittelt werden, die für die Phosphorylierung an der Threonin 654-Position des nukleären EGFR verantwortlich ist. Sie spielt durch ihre Substratspezifität am nukleären EGFR eine essentielle Rolle für die pTyr-assoziierte EGFR Akkumulation im Zellkern. Es konnte des weiteren eine Aktivierung der PKC ϵ sowohl durch pTyr als auch durch Bestrahlung nachgewiesen werden, was mit der darauf folgenden Phosphorylierung des kernständigen EGFR am T654 und einer Akkumulation im Zellkern korrelierte. Die pTyr-induzierte Aktivierung der nukleären PKC ϵ beeinflusste das Überleben nach ionisierender Strahlung positiv, wohingegen eine Hemmung den radioprotektiven Effekt einer pTyr-Vorinkubation vollständig auslöschte. Damit verbunden konnte durch Hemmung der PKC ϵ -Proteinexpression gezeigt werden, dass sie entscheidend in

Diskussion

den Prozess der DNA-PK-Aktivierung nach pTyr-Behandlung involviert war. Passend zu diesen Ergebnissen war die Doppelstrangbruch-Reparatur nach Bestrahlung in PKC ϵ -defizienten Zellen signifikant verschlechtert und der radioprotektive pTyr-Effekt nicht mehr nachweisbar. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass die PKC ϵ die radioprotektive Aktivität von pTyr durch Stimulation der EGFR assoziierten-DNS-Reparatur entscheidend reguliert und steuert und aus diesem Grund essentiell für die pTyr-vermittelte Radioprotektion ist [75].

Die drei Subgruppen der PKC-Familie unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Anforderungen an ihre „*Second messenger*“. Die konventionelle Untergruppe (cPKC), die die Isoformen α , β_I , β_{II} und γ umfasst, brauchen für ihre Aktivierung Calcium in freier Form oder das Phospholipid Diacylglycerol (DAG). Die Gruppe der neuartigen Isoformen (nPKC) mit den Isoformen δ , ϵ , η und θ sind Calcium unabhängig und können nur durch DAG aktiviert werden, wohingegen die atypischen Isoformen (aPKC) ι , ξ , N1 und N2 weder auf Calcium noch DAG reagieren.

Aufgrund dieser Charakteristika haben für die konventionellen und neuartigen PKC Subgruppen Phosphatidylcholine wie zum Beispiel die Gruppe der Phospholipase C eine wichtige Bedeutung. Zu ihren Aufgaben als Hydrolasen gehört es Phosphatidylinositol-Bisphosphate (PIP $_2$) zu hydrolysieren [121][122]. Diese Reaktion generiert zwei intrazelluläre Botenstoffe, zum einen Inositol-Trisphosphat (IP $_3$) und zum anderen Diacylglycerol (DAG), welche wiederum den intrazellulären Calciumausstoß und die Aktivierung der cPKC und nPKC vermitteln [107][123]. Dass pTyr ebenso wie Bestrahlung eine quantitative Zunahme an PIP $_2$ hervorruft, konnte in der vorliegenden Arbeit von uns nachgewiesen werden und gibt somit einen ersten Hinweis auf den Einfluss einer pTyr-Behandlung auf die PIP $_2$ -vermittelte Signaltransduktion. Als mögliche Wirkungsweise wäre aufgrund dieser Daten eine pTyr-stimulierte PIP $_2$ -vermittelte Aktivierung des nukleären PKC ϵ denkbar. Eine Steigerung der Menge an PIP $_2$ führt zu einer damit assoziierten Steigerung des intrazellulären DAG-Levels. Diese Annahme stützend, konnte durch eine Behandlung mit dem DAG-Analog OAG (1-Oleyl-2-Acetyl-sn-Glycerol) eine Aktivierung der kernständigen PKC ϵ induziert werden, die, wie bereits beschrieben, die Akkumulation des EGFR im Zellkern steuert. Auch im Überleben nach Bestrahlung zeigte ein erhöhter DAG-Spiegel eine Verbesserung der Überlebensrate. Dies stimmt somit mit der Theorie überein, dass eine pTyr-Behandlung mittels Erhöhung der DAG-Menge die Aktivierung der PKC ϵ im Kern stimuliert, was als Folge eine EGFR-assozierte Stimulation der DNS-Reparatur haben könnte.

Ein regulierender Faktor in der DAG-vermittelten Signaltransduktion sind DAG-Kinasen

(DGKs), deren Funktion die Phosphorylierung des „*second messenger*“ DAG ist. Die Klasse der Transferasen, zu der auch die DGKs gehören, katalysieren die Phosphorylierung von DAG zu Phosphatidsäure (PA) unter Benutzung von ATP als Phosphatdonor. Aus diesem Grund sind sie von essentieller Bedeutung bei der Erhaltung des funktionellen Gleichgewichts zwischen DAG und dem Signallipid PA. DGKs katalysieren den Abbau von DAG und sind somit aber auch in der Lage DAG-vermittelte Signalimpulse und die damit gekoppelte PKC-Aktivierung zu limitieren und kontrollieren [91]. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Komplexbildung im Zellkern zwischen dem nukleären EGFR und der DGK-Isoform θ , welche durch eine Behandlung mit pTyr oder ionisierender Bestrahlung signifikant gesteigert werden konnte. Eine Kombinationsbehandlung aus pTyr-Vorbehandlung und anschließender Bestrahlung führte im Vorfeld zu einer Stabilisierung des Immunkomplexes, konnte jedoch durch eine nachfolgende Bestrahlung nicht weiter stimuliert werden. Diese stimulierbare Proteinbindung gibt uns einen ersten Hinweis auf eine mögliche regulative Interaktion in der pTyr-induzierten EGFR-Akkumulation im Zellkern.

Weil DGKs die Menge an verfügbaren DAG und PA maßgeblich regulieren, ist die Kontrolle des Aktivierungszustandes dieser Kinase essentiell und wird über mehrere Steuerungsmechanismen gesichert. So wird von Jiang et al. berichtet, dass Calcium die DGK α *in vitro* aktivieren kann [124]. Dieser Weg der DGK-Aktivierung ist besonders elegant, da durch die PIP₂-vermittelte Signalkaskade und das damit gekoppelte IP₃-Signalling, der intrazelluläre Calciumspiegel simultan mit der Menge an DAG ansteigt. Dieser negative Loop ist ein denkbarer Mechanismus zur Kontrolle der DGK-Aktivität, doch neben vielen anderen beeinflussenden Substanzen, beschreibt Walsh et al., dass PIP₂ selbst als potenter Inhibitor der Kinaseaktivität wirkt [125] oder PKC Isoformen durch Modulation des Phosphorylierungsmusters zur Aktivierung der DGK in der Lage sind [126]. Ebenso werden PKC Isoformen beschrieben, die regulierend in den Mechanismus der zellulären Lokalisation von Diacylglycerol Kinasen einwirken [127]. In allen hier ausgeführten Daten wurden Interaktionen zwischen spezifischen Isoformen sowohl der DGKs als auch der PKCs nachgewiesen. Basierend auf unseren Daten konnten wir zeigen, dass eine Hemmung der DAG Kinase θ zu einer vermehrten Aktivierung der PKC ϵ im Zellkern führt. Damit gekoppelt konnte ebenfalls die EGFR Akkumulation und die damit verbundene Threoninphosphorylierung 654 am EGFR durch Hemmung der DGK θ nachgewiesen werden. Dies führte uns zu dem Schluß, dass die pTyr-induzierte PIP₂ Erhöhung

Diskussion

und die damit assoziierte Vermehrung des DAG durch die Aktivierung der DGK θ kontrolliert werden kann. Die Hemmung dieser DGK Isoform führte zu einem Überschuß an DAG, was als Folge davon in einer Aktivierung der PKC ϵ im Zellkern und der damit verbundenen EGFR Translokation resultierte. Dieser Effekt überlagerte in Kombination sowohl den Effekt von pTyr als auch den

strahlungs-induzierten EGFR-anhängigen Signalweg.

Schlußfolgernd konnten wir in vorliegender Arbeit zeigen, dass pTyr stimulierend auf die Produktion von PIP₂ wirkt und damit gekoppelt die PKC ϵ aktiviert wird, was zu einer Phosphorylierung am T654 des EGFR und zur Akkumulation des EGFR im Zellkern führt. Ein regulierender Faktor in dieser Signalvermittlung scheint die nukleäre DGK θ zu sein, die pTyr-induziert an den nukleären EGFR bindet und dort von Bedeutung für die Kontrolle dieser Signalimpulse ist.

Da in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der nukleären EGFR-Translokation durch pTyr und ionisierende Strahlung und der damit assoziierte molekulare Mechanismus beobachtet wurde, wäre ein nächster Schritt zum besseren Verständnis eine Untersuchung im Hinblick auf die Interaktionen und Beeinflussungen des EGFR auf die PIP₂-vermittelten Signalkomponenten. So berichten Su et al. von einer regulativen Interaktion zwischen dem EGFR und der PIP₂-Hydrolyse, bei der mittels Tyrosinphosphorylierung des EGFR eine Akkumulation der DAG-Menge nachweisbar war, die über eine EGFR-assoziierte PIP₂-Hydrolyse reguliert wird [128]. Dass PIP₂-vermittelte Signalimpulse im Zusammenhang mit dem EGFR stehen, konnte auch von Cochet et al., gezeigt werden. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass der EGFR in der Lage ist nach EGF-Behandlung einen Proteinkomplex mit der PI4-Kinase und der PIP5Kinase zu bilden, welche beide für die Generierung von PIP₂ verantwortlich sind [81]. Durch diese Interaktion konnte von Cochet et al. eine EGFR-induzierte Aktivierung der PIP-Kinasen nachgewiesen werden, welche mittels Tyrosinphosphorylierung vermittelt wird [129]. Interessanterweise wurde sowohl die aktivierte PI4-Kinase als auch PIP₂ in den Caveolae von A431 Zellen nachgewiesen [130], in denen laut unseren Daten auch der internalisierte tyrosinphosphorylierte EGFR nach Bestrahlung und pTyr-Behandlung vorliegt. Diese Daten könnten in Kombination auf eine Interaktion zwischen dem pTyr-internalisierten EGFR und der PI4-Kinase hindeuten, welche zu Folge haben könnte, dass der PI4-Kinase-abhängige Signalweg nach Aktivierung durch den Caveolin-internalisierten EGFR stimuliert werden kann. Somit könnte eine pTyr-Inkubation genauso wie Bestrahlung gleichzeitig eine Stimulation der PIP₂-

Synthese als auch einen Transport des EGFR in den Zellkern induzieren (Abb. 4.1)

Ein anderer Ansatz der pTyr-vermittelten Stimulation der DAG-Menge könnte die Stimulation der Phosphatidylinositol-anhängigen Phospholipase C (PI-PLC) sein. Carsberg et al., zeigen in ihrer Studie, dass auch Bestrahlung mit UV zu einer Erhöhung des DAG-Spiegels führt, welche aus einer Aktivierung der Phospholipase C und Phospholipase D resultiert [96]. Im Fall von ionisierender Strahlung zeigt Nakajima et al., eine Erhöhung des DAG-Spiegels nach Bestrahlung durch Lipidperoxidation [131]. Der Effekt der strahlen-induzierten DAG-Produktion wurde aufgrund der Wirkung von Hydroxyl-Radikalen diskutiert. Diese hauptsächlich durch Strahlung produzierten Radikale führten in Rattenhepatocyten zu einer Aktivierung der PI-PLC, was eine Steigerung des DAG-Spiegels und, assoziiert damit, eine Aktivierung der PKC zur Folge hatte [97]. Inwiefern pTyr auf diesen Mechanismus der PLC Aktivierung Einfluss hat, muss in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden.

In vorliegender Arbeit wurde ebenfalls nach Indizien gesucht, die für die Beteiligung einer pTyr-modulierbaren Interaktion zwischen dem nukleären EGFR und der damit assoziierten Aktivierung der DNS-abhängigen-Proteinkinase (DNA-PK) sprechen. Die DNA-PK und der mit ihr assoziierte Komplex aus dem Ku-Heterodimer, das aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80 besteht, spielt für die Erkennung und Behebung von strahleninduzierten DNS-Schäden eine essentielle Rolle [132]. Der Ku/DNA-PK-abhängige Reperaturprozess (NHEJ) ist der Hauptreparaturweg von Säugerzellen bei DNS-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Bestrahlung [133]. Im Speziellen spielt hierbei der Aktivierungs-/Phosphorylierungszustand der DNA-PK eine Rolle, da dieser u.a. über die Kinaseaktivität Auskunft gibt. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die am T2609 phosphorylierte Form der DNA-PK untersucht, da diese für die aktivierte Form nach Bestrahlung steht [134]. Dass die Interaktion zwischen dem nukleären EGFR und der DNA-PK eine wichtige Rolle nach Bestrahlung spielt, wurde in unserem Labor und von anderen Autoren bereits gezeigt [58][135]. Auch im Bezug auf die pTyr-vermittelte Radioprotektion konnten wir eine EGFR-assozierte Stimulation der DNA-PK-abhängigen DNS-Reparatur zeigen [28]. Ein ausschlaggebender Mechanismus zur Erkennung von DNS-Schäden ist die funktionelle Bindung solcher Reparaturproteine an die DNS. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass ionisierende Strahlung zur Bindung der am T2609 phosphorylierten DNA-PK und des EGFR an die DNS führt. Im Gegensatz dazu zeigte eine pTyr-Inkubation per se keine Stimulierung der DNS-Protein-Bindung des EGFR oder der aktivierten DNA-PK, auch wenn im gesamten Zellkern eine eindeutige Steigerung der DNA-PK

Diskussion

Phosphorylierung und der EGFR Akkumulation durch pTyr nachgewiesen werden konnte. Durch eine pTyr-Präinkubation vor Bestrahlung konnte also die basale Menge an DNS-gebundener DNA-PK und EGFR nicht beeinflusst werden. Die anschließende Bestrahlung führte jedoch im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen zu einer signifikant vermehrten Bindung des EGFR und, damit assoziiert, auch zu einer erhöhten Bindung der T2609 phosphorylierten DNA-PK. Diese Daten lassen den Schluß zu, dass eine pTyr-Vorinkubation, unabhängig von DNS-Schäden, die Aktivierung der DNA-PK mittels Translokation des EGFR in den Zellkern stimuliert, ohne eine Bindung der Proteine an die DNS zu induzieren. Somit gibt pTyr der Zelle einen entscheidenden Vorteil im Hinblick auf DNS-Reparatur nach ionisierender Strahlung, da bereits im Moment der Bestrahlung die Kapazität der zellulären DNS-Reparaturmechanismen in Form von nukleär akkumuliertem EGFR und aktivierter DNA-PK deutlich erhöht ist und die Reparatur der Schäden damit eventuell erleichtert bzw. qualitativ verbessert wird.

4.4. Abschließende Besprechung / Schlußfolgerungen

Fasst man alle Informationen dieser Arbeit und die damit korrespondierende Literatur zusammen kann man den pTyr-vermittelten radioprotektiven Effekt und dessen molekularen Wirkmechanismus, der mit der Akkumulation des EGFR gekoppelt ist, folgendermaßen formulieren (Abb. 4.1):

Entsprechend der für ionisierende Strahlung veröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass eine pTyr-Behandlung eine signifikante Stimulation der Akkumulation des EGFR im Zellkern und der damit verbundenen Stimulierung der DNS-Reparatur zur Folge hat. Aufgrund dessen induziert eine Vorinkubation mit pTyr eine Steigerung des Überlebens nach Bestrahlung. Dies konnte allerdings ausschließlich in Zellen nachgewiesen werden, die ein wildtyp-TP53 exprimierten, was erste Hinweise auf die Normalgewebsspezifität des Radioprotektors gab. Erste Ergebnisse zeigen einen Caveolin/Karyopherin-abhängigen Transport des EGFR in den Zellkern, der durch pTyr aktiviert wird und mittels einer Phosphorylierung des kernständigen EGFR am T654 zu einer Akkumulation im Kern führt. Diese Akkumulation ist beschrieben als ein wichtiger Faktor in DNS-Reparaturprozessen [58]. Reguliert wird diese Phosphorylierung am T654 des kernständigen EGFR und damit auch die pTyr-induzierte EGFR Translokation durch die PKC ϵ , welche ihrerseits pTyr-stimulierten regulativen Prozessen der Phospholipid-Signalvermittlung unterliegt. Aufgrund der uns vorliegenden Daten schließen wir, dass eine pTyr-Behandlung vor Bestrahlung einen positiven Einfluss auf die TP53-abhängige

DNS-Reparatur hat und somit ohne selber DNS-Schäden zu induzieren in der Lage ist zelleigene Reparaturmechanismen zu stimulieren bzw. diese qualitativ zu verbessern.

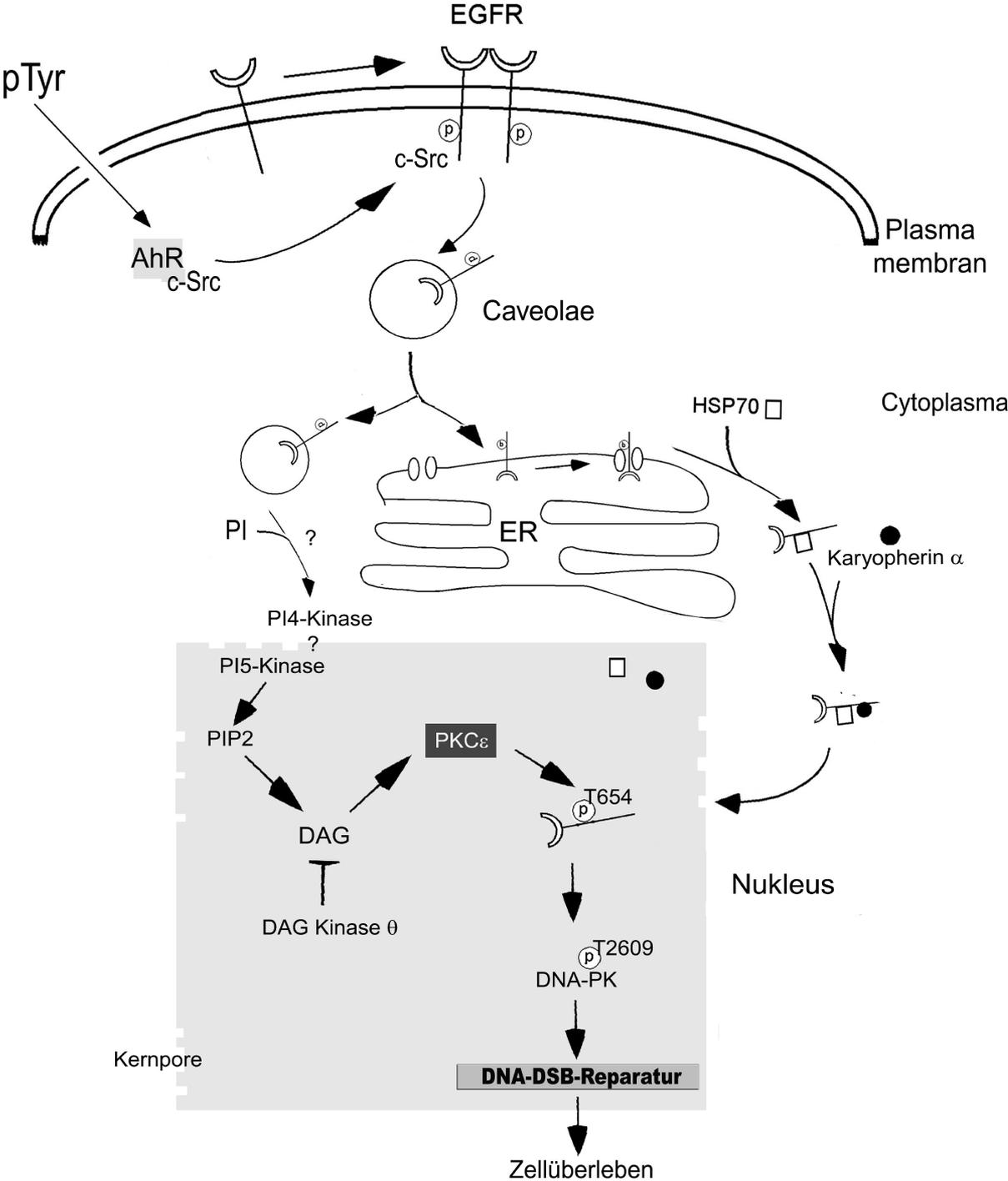


Abb. 4.1: Schematische Illustration des möglichen Signalwegs der pTyr-vermittelten Radioprotektion in wildtyp-TP53 Zellen/normalen Hautfibroblasten. Modifiziert nach einem Schema von Liao et al. [98].

Zusammenfassung

Krebs ist nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in Deutschland. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt im Durchschnitt bei 35% bis 45% und resultiert unter anderem aus der Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Die Strahlentherapie ist neben chirurgischen Eingriffen und chemotherapeutischen Methoden eine der wichtigsten Behandlungsarten onkologischer Erkrankungen. Trotz technischer Präzisierung und modernster Behandlungsplanung wirkt die bislang unvermeidliche Schädigung des tumorumgebenden Normalgewebes Dosis limitierend und kann zu akuten und späten Normalgewebsreaktionen und damit assoziierten Nebenwirkungen führen. Zum Schutz des gesunden Gewebes im Strahlenfeld können Radioprotektoren eingesetzt werden, die spezifisch Normalgewebe, nicht aber Tumorgewebe vor strahleninduzierten Effekten schützen sollen. Die damit verbundene Dosisescalation bei verbesserter Strahlentoleranz des umliegenden Normalgewebes hat eine Senkung der Nebenwirkungsrate und eine erhöhte Tumorkontrolle zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Wirkmechanismus des Radioprotektors *O-Phospho L-Tyrosin (pTyr)* untersucht und die damit assoziierte Modulation der strahleninduzierten Effekte auf verschiedene Signalkaskaden beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation normaler Hautfibroblasten mit pTyr zu einer signifikanten Erhöhung der klonogenen Überlebensrate nach Bestrahlung führt und somit radioprotektiv wirkt. Diese pTyr-vermittelte Radioprotektion erwies sich als abhängig von der Verfügbarkeit des Tumorsuppressors TP53. Nur Zellen mit wildtyp-TP53-Status zeigten nach einer pTyr Behandlung den radioprotektierten Effekt. Da ein Großteil humaner Tumoren ein funktionell mutiertes TP53 aufweist, kommen über 50% der Tumoren für eine Kombinationsbehandlung mit pTyr und Bestrahlung in Frage.

Erste Vorarbeiten zum pTyr-induzierten molekularen Wirkmechanismus zeigten eine Interaktion zwischen pTyr und der EGFR-assoziierten Signalkaskade, welche einen positiven Einfluss auf die strahleninduzierte DNS-Reparatur hat (Dittmann et al., JBC 2005).

Basierend auf diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer pTyr Behandlung auf molekularer Ebene untersucht und folgende Resultate erzielt:

1. Eine pTyr-Behandlung stimuliert die Akkumulation des EGFR im Zellkern, welche mit einer Stimulierung der DNA-PK-abhängigen DNS-Reparatur (NHEJ) gekoppelt ist.

2. Eine pTyr-vermittelte Stimulierung der DSB-DNS-Reparaturprozesse geschieht in Anhängigkeit von funktionell verfügbarem Tumorsuppressor TP53.
3. Der Phosphorylierungszustand des EGFR im Zellkern wird durch eine Behandlung mit pTyr und ebenso durch ionisierende Strahlung am Threoninrest 654 moduliert. Diese Phosphorylierung spielt eine wesentliche Rolle bei der nukleären Akkumulation des EGFR.
4. Die für die pTyr- und strahlenvermittelte Phosphorylierung am T654 des EGFR verantwortliche Proteinkinase C ist die Isoform ϵ im Zellkern.
5. Die Aktivierung der nukleären PKC ϵ ist essentiell für die EGFR-assoziierte Stimulierung der DNA-PK-abhängigen DNS-Reparatur.
6. Die für die pTyr- und strahleninduzierte Aktivierung der PKC ϵ in Frage kommende Signalkomponente ist Diacylglycerol, welches durch die Diacylglycerolkinase θ limitierend reguliert wird.
7. Die Erzeugung von Diacylglycerol durch Hydrolyse von Phosphoinositol Bisphosphat kann durch pTyr-Behandlung und Strahlung stimuliert werden.
8. pTyr stimuliert die Bindung des kernständigen EGFR und der phosphorylierten DNA-PK an die DNS nach Bestrahlung .

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der molekularen Eckpunkte einer pTyr-Behandlung, um den Gedanken eines klinischen Einsatzes von Phosphotyrosin im Rahmen einer radioonkologischen Behandlung voranzutreiben. Aus den vorliegenden Daten lässt sich schließen, dass eine pTyr-Behandlung in Kombination mit Bestrahlung bei der Behandlung TP53-mutierter Tumoren einen signifikanten Vorteil aufweist und die positive Beeinflussung von DNS-Reparaturprozessen zu einem verbesserten Überleben des tumorumliegenden Normalgewebes beiträgt.

Des weiteren trägt diese Arbeit ihren Teil dazu bei sowohl strahlenvermittelte als auch radioprotektive Signalwege genauer zu verstehen und somit ein besseres Verständnis für die Vorgänge in einer Zelle nach Bestrahlung und der damit gekoppelten Überlebenssignale zu erlangen.

Summary

Cancer is, after cardiovascular diseases, the main cause of death in Germany. The five-year-survival-rate averages at 35% to 45% and is supported by tumour treatment with ionizing irradiation.

Radiotherapy is among surgical interventions and chemotherapeutical methods one of the most important treatment procedure for oncological diseases. In spite of technical improvements and modern therapy designs the ineluctable damage of the tumour surrounding normal tissue acts dose limiting and may lead to acute and late normal tissue reactions and associated side effects. Radioprotectors are applied to protect healthy tissue in the radiation field, but should not protect tumour tissue against radiation effects. The potential dose escalation due to enhanced radiation-tolerance would be associated with increased tumour control.

The intention of this work was to shed light on the molecular mode of action of the radioprotector *O-Phospho L-Tyrosine (pTyr)* and the associated modulation of radiation-induced effects on signalling cascades.

The data presented provide evidence that preincubation of human fibroblasts with pTyr leads to a significant increase of cell survival after irradiation. The pTyr-mediated radioprotection was found to be dependent on the availability of the tumour suppressor TP53. Only cells characterized by a wildtype TP53, but not cells with mutated TP53 cells were protected by a pTyr-treatment. Given that a large proportion of human tumours express a mutated TP53, more than 50% of tumours are considered to be treated with pTyr and irradiation in combination.

Preliminary work on the field of pTyr-induced molecular mechanism showed an interaction between pTyr and the EGFR-associated signalling pathway, which positively influences radiation-induced DNA-repair (Dittmann et al., JBC 2005).

Based on these data we investigate the influence of pTyr treatment on a molecular level.

The following results were obtained:

1. pTyr treatment stimulates accumulation of the EGFR in the nucleus, which is involved in regulation of DNA-PK-dependent DNA-repair (NHEJ).
2. pTyr-mediated stimulation of DSB-DNA-repair processes is dependent on functional tumour suppressor TP53.
3. Ionizing radiation and pTyr are able to modulate the phosphorylation status of nuclear

EGFR at the position No. 654. This phosphorylation site plays an important role in accumulation of EGFR in the nucleus.

4. The isoform ϵ of the protein kinase C family is responsible for the pTyr- and radiation-induced T654 phosphorylation of the EGFR in the nucleus.
5. The kinase activity of the nuclear PKC ϵ is essential for nuclear EGFR accumulation and EGFR-associated stimulation of the DNA-PK-dependent DNA-repair.
6. The considered second messenger in the pTyr- and radiation-induced activation of PKC ϵ is diacylglycerol, which is limited by its regulatory kinase DGK θ .
7. Diacylglycerol is generated by hydrolyzation of phosphoinositol biphosphate, which can be stimulated by pTyr treatment and ionizing irradiation.
8. pTyr enhances complex formation between nuclear EGFR, phosphorylated form of DNA-PK and DNA after irradiation.

Aim of this work was to elucidate molecular vertices of a pTyr treatment in order to promote the clinical application of pTyr in the context of radiooncological therapy. From present data we suggest that combined treatment of TP53-mutated tumours with pTyr and irradiation improves survival of tumour surrounding normal tissue by influencing DNA-repair processes positively and therefore takes advantage in radiotherapy-treatment.

Furthermore this work gives a better insight into radiation-mediated and radioprotective signalling pathways and helps to achieve a deeper understanding in molecular mechanisms after irradiation and radiation-associated survival signals.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrokarbonrezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BBI	Bowman-Birk-Proteaseinhibitor
BER	Basen-Excisionsreparatur
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CPD	cumulative population doubling
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DGK	Diacylglycerol Kinase
DMEM	Dulbeco's Modified Eagels Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNS-abhängige Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzyme linked immunsorbent assay
FCS	Foetales Kälberserum
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HEPES Ethansulfonsäure	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-
H ₂ O _{dd}	Zweifach destilliertes-deionisiertes Wasser
HRR	Homologe Rekombinationsreparatur
HSF	Humane Hautfibroblasten
IL	Interleukine

IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol Triphosphat
IR	Ionisierende Strahlung
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyten Wachstumsfaktor
Lsg.	Lösung
mA	Milliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper
μCi	Mikro-Curie
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMR	Mismatch-Reparatur
NER	Nukleotid- Excisionsreparatur
NHEJ	Nichthomologes Endjoinig
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
(n)M	(Nano)molar
OAG	1-Oleoyl-2-Acetyl-SN-Glycerol
PA	Phosphatidic Acid/ Phosphatidat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Population doubling
PIP2	Phosphatidylinositol 3,4- Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
pTyr	O-Phospho L-Tyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SE	Standardfehler
SF	Survivalfraction/Überlebensrate

Abkürzungen

siRNA	Small interfering RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolette Strahlung
(k)V	(Kilo-)Volt

1. Literaturverzeichnis

- [1] **Robert-Koch-Institut** (2008) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. *GEKID / Gesundheitsberichterstattung des Bundes*.
- [2] **Herrmann Thomas, Michael Baumann, Wolfgang Dörr** (2006) Klinische Strahlenbiologie. *Elsevier, Urban&Fischer*.
- [3] **Michael Wannemacher** (2006) Strahlentherapie. *Springer*.
- [4] **H. P. Rodemann, H. P. Peterson, K. Schwenke, K. H. von Wangenheim** (1991). Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation., *Scanning Microsc*, 4, 1135-42; discussion 1142-3.
- [5] **H. Peter Rodemann, Marcel A Blaese** (2007). Responses of normal cells to ionizing radiation., *Semin Radiat Oncol*, 2, 81-88.
- [6] **H. P. Rodemann, M. Bamberg** (1995). Cellular basis of radiation-induced fibrosis., *Radiother Oncol*, 2, 83-90.
- [7] **Errol Friedberg** (2006) DNA-repair& mutagenesis. *ASM Oress*.
- [8] **D. J. Grdina, N. Shigematsu, P. Dale, G. L. Newton, J. A. Aguilera, R. C. Fahey** (1995). Thiol and disulfide metabolites of the radiation protector and potential chemopreventive agent WR-2721 are linked to both its anti-cytotoxic and anti-mutagenic mechanisms of action., *Carcinogenesis*, 4, 767-774.
- [9] **I. Felemovicius, M. E. Bonsack, M. L. Baptista, J. P. Delaney** (1995). Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol)., *Ann Surg*, 4, 504-8; discussion 508-10.
- [10] **John R Kouvaris, Vassilis E Kouloulis, Lampros J Vlahos** (2007). Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector., *Oncologist*, 6, 738-747.
- [11] **JC Linegaard, C. Grau** (2000). Has the outlook improved for arnifostine as a clinical radioprotector?, *Radiother Oncol*, , 113-118.
- [12] **K. I. Wu, N. Pollack, R. J. Panos, P. H. Sporn, D. W. Kamp** (1998). Keratinocyte growth factor promotes alveolar epithelial cell DNA repair after H2O2 exposure., *Am J Physiol*, 4 Pt 1, L780-L787.
- [13] **P. G. Braunschweiger, V. Basrur, O. Santos, A. Adessa, P. Houdek, A. M. Markoe** (1996). Radioresistance in murine solid tumors induced by interleukin-1., *Radiat Res*, 2, 150-156.
- [14] **Seyed Jalal Hosseinimehr** (2007). Trends in the development of radioprotective agents., *Drug Discov Today*, 19-20, 794-805.

Literaturverzeichnis

- [15] **Y. Birk** (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans., *Int J Pept Protein Res*, 2, 113-131.
- [16] **K. Dittmann, H. Löffler, M. Bamberg, H. P. Rodemann** (1995). Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture., *Radiother Oncol*, 2, 137-143.
- [17] **Klaus Dittmann, Mahmoud Toulany, Johannes Classen, Vanessa Heinrich, Luka Milas, H. Peter Rodemann** (2005). Selective radioprotection of normal tissues by Bowman-birk proteinase inhibitor (BBI) in mice., *Strahlenther Onkol*, 3, 191-196.
- [18] **K. H. Dittmann, N. Gueven, C. Mayer, P. Ohneseit, R. Zell, A. C. Begg, H. P. Rodemann** (1998). The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts., *Radiat Res*, 6, 648-655.
- [19] **M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris** (1991). p53 mutations in human cancers., *Science*, 5015, 49-53.
- [20] **Kazunori Otsuka, Chikashi Ishioka** (2007). TP53 mutations and molecular epidemiology, *Gan To Kagaku Ryoho*, 5, 683-689.
- [21] **K. Dittmann, P. Virsik-Köpp, C. Mayer, M. Rave-Fränk, H. P. Rodemann** (2003). Bowman-Birk protease inhibitor activates DNA-dependent protein kinase and reduces formation of radiation-induced dicentric chromosomes., *Int J Radiat Biol*, 10, 801-808.
- [22] **Eric Weterings, David J Chen** (2007). DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys?, *J Cell Biol*, 2, 183-186.
- [23] **Lawrence F Povirk, Rui-Zhe Zhou, Dale A Ramsden, Susan P Lees-Miller, Kristoffer Valerie** (2007). Phosphorylation in the serine/threonine 2609-2647 cluster promotes but is not essential for DNA-dependent protein kinase-mediated nonhomologous end joining in human whole-cell extracts., *Nucleic Acids Res*, 12, 3869-3878.
- [24] **K. H. Dittmann, N. Gueven, C. Mayer, H. P. Rodemann** (2001). Characterization of the amino acids essential for the photo- and radioprotective effects of a Bowman-Birk protease inhibitor-derived nonapeptide., *Protein Eng*, 3, 157-160.
- [25] **K. H. Dittmann, C. Mayer, H. P. Rodemann** (2001). O-phospho-L-tyrosine protects TP53 wild-type cells against ionizing radiation., *Int J Cancer*, , 1-6.
- [26] **S. Mishra, A. W. Hamburger** (1993). O-phospho-L-tyrosine inhibits cellular growth by activating protein tyrosine phosphatases., *Cancer Res*, 3, 557-563.
- [27] **S. Mishra, A. W. Hamburger** (1993). Exogenous phosphotyrosine modulates epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation., *Carcinogenesis*, 2, 269-273.

- [28] **Klaus Dittmann, Claus Mayer, Gabriele Wanner, Rainer Kehlbach, H. Peter Rodemann** (2007). The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor- and DNA-dependent kinase phosphorylation., *Radiother Oncol*, 3, 328-334.
- [29] **Y. Yarden, J. Schlessinger** (1987). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor., *Biochemistry*, 5, 1443-1451.
- [30] **Y. Yarden, J. Schlessinger** (1987). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation., *Biochemistry*, 5, 1434-1442.
- [31] **Xiaochun Yu, Kailash D Sharma, Tsuyoshi Takahashi, Ryo Iwamoto, Eisuke Mekada** (2002). Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling., *Mol Biol Cell*, 7, 2547-2557.
- [32] **H-W. Lo, M-C. Hung** (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival., *Br J Cancer*, 2, 184-188.
- [33] **C. R. Lombardo, T. G. Consler, D. B. Kassel** (1995). In vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor autophosphorylation domain by c-src: identification of phosphorylation sites and c-src SH2 domain binding sites., *Biochemistry*, 50, 16456-16466.
- [34] **April Thelemann, Filippo Petti, Graeme Griffin, Ken Iwata, Tony Hunt, Tina Settinarì, David Fenyo, Neil Gibson, John D Haley** (2005). Phosphotyrosine signaling networks in epidermal growth factor receptor overexpressing squamous carcinoma cells., *Mol Cell Proteomics*, 4, 356-376.
- [35] **Roy S Herbst** (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2 Suppl, 21-26.
- [36] **R. I. Nicholson, J. M. Gee, M. E. Harper** (2001). EGFR and cancer prognosis., *Eur J Cancer*, , S9-15.
- [37] **David Azria, Frederic Bibeau, Nicolas Barbier, Abderrahim Zouhair, Claire Lemanski, Philippe Rouanet, Marc Ychou, Pierre Senesse, Mahmut Ozsahin, André Pèlerin, Jean-Bernard Dubois, Simon Thèzenas** (2005). Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer., *BMC Cancer*, 62.
- [38] **W. E. Karnes, S. G. Weller, P. N. Adjei, T. J. Kottke, K. S. Glenn, G. J. Gores, S. H. Kaufmann** (1998). Inhibition of epidermal growth factor receptor kinase induces protease-dependent apoptosis in human colon cancer cells., *Gastroenterology*, 5, 930-939.

- [39] **T. Akimoto, N. R. Hunter, L. Buchmiller, K. Mason, K. K. Ang, L. Milas** (1999). Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas., *Clin Cancer Res*, 10, 2884-2890.
- [40] **Wendong Lei, Patrick P Koty, Mark L Levitt** (2003). Relationship of EGFR signal-transduction modulation by tyrosine kinase inhibitors to chemosensitivity and programmed cell death in lung cancer cell lines., *Methods Mol Med*, , 127-143.
- [41] **J. M. Bartlett, S. P. Langdon, B. J. Simpson, M. Stewart, D. Katsaros, P. Sismondi, S. Love, W. N. Scott, A. R. Williams, A. M. Lessells, K. G. Macleod, J. F. Smyth, W. R. Miller** (1996). The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer., *Br J Cancer*, 3, 301-306.
- [42] **J. R. Grandis, Q. Zeng, S. D. Drenning, D. J. Tweardy** (1998). Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line., *Int J Oncol*, 2, 375-378.
- [43] **N. H. Chow, H. S. Liu, E. I. Lee, C. J. Chang, S. H. Chan, H. L. Cheng, T. S. Tzai, J. S. Lin** (1997). Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer., *Anticancer Res*, 2B, 1293-1296.
- [44] **M. Volm, W. Rittgen, P. Drings** (1998). Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas., *Br J Cancer*, 4, 663-669.
- [45] **M. Maurizi, G. Almadori, G. Ferrandina, M. Distefano, M. E. Romanini, G. Cadoni, P. Benedetti-Panici, G. Paludetti, G. Scambia, S. Mancuso** (1996). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma., *Br J Cancer*, 8, 1253-1257.
- [46] **A. Knebel, H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, P. Herrlich** (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents., *EMBO J*, 19, 5314-5325.
- [47] **D. Peus, A. Meves, R. A. Vasa, A. Beyerle, T. O'Brien, M. R. Pittelkow** (1999). H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation., *Free Radic Biol Med*, 11-12, 1197-1202.
- [48] **P. M. Harari, S. M. Huang** (2001). Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling., *Semin Radiat Oncol*, 4, 281-289.
- [49] **L. Milas, K. Mason, N. Hunter, S. Petersen, M. Yamakawa, K. Ang, J. Mendelsohn, Z. Fan** (2000). In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody., *Clin Cancer Res*, 2, 701-708.

- [50] **R. K. Schmidt-Ullrich, R. B. Mikkelsen, P. Dent, D. G. Todd, K. Valerie, B. D. Kavanagh, J. N. Contessa, W. K. Rorrer, P. B. Chen** (1997). Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation., *Oncogene*, 10, 1191-1197.
- [51] **H. Peter Rodemann, Klaus Dittmann, Mahmoud Toulany** (2007). Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair., *Int J Radiat Biol*, 11-12, 781-791.
- [52] **S. M. Huang, P. M. Harari** (2000). Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis., *Clin Cancer Res*, 6, 2166-2174.
- [53] **Guido Lammering** (2005). Molecular predictor and promising target: will EGFR now become a star in radiotherapy?, *Radiother Oncol*, 2, 89-91.
- [54] **Mahmoud Toulany, Klaus Dittmann, Maren Krüger, Michael Baumann, H. Peter Rodemann** (2005). Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway., *Radiother Oncol*, 2, 143-150.
- [55] **Mahmoud Toulany, Michael Baumann, H. Peter Rodemann** (2007). Stimulated PI3K-AKT signaling mediated through ligand or radiation-induced EGFR depends indirectly, but not directly, on constitutive K-Ras activity., *Mol Cancer Res*, 8, 863-872.
- [56] **Mahmoud Toulany, Ulla Kasten-Pisula, Ingo Brammer, Shaomeng Wang, Jianyong Chen, Klaus Dittmann, Michael Baumann, Ekkehard Dikomey, H. Peter Rodemann** (2006). Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair., *Clin Cancer Res*, 13, 4119-4126.
- [57] **Mahmoud Toulany, Klaus Dittmann, Michael Baumann, H. Peter Rodemann** (2005). Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS., *Radiother Oncol*, 2, 117-129.
- [58] **Klaus Dittmann, Claus Mayer, Birgit Fehrenbacher, Martin Schaller, Uma Raju, Luka Milas, David J Chen, Rainer Kehlbach, H. Peter Rodemann** (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase., *J Biol Chem*, 35, 31182-31189.
- [59] **Stephen P Jackson** (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks., *Carcinogenesis*, 5, 687-696.
- [60] **Doug W Chan, Benjamin Ping-Chi Chen, Sheela Prithivirajsingh, Akihiro Kurimasa, Michael D Story, Jun Qin, David J Chen** (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks., *Genes Dev*, 18, 2333-2338.

- [61] **Klaus Dittmann, Claus Mayer, Hans-Peter Rodemann** (2005). Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity., *Radiother Oncol*, 2, 157-161.
- [62] **N. Gueven, K. Dittmann, C. Mayer, H. P. Rodemann** (1998). Bowman-Birk protease inhibitor reduces the radiation-induced activation of the EGF receptor and induces tyrosine phosphatase activity., *Int J Radiat Biol*, 2, 157-162.
- [63] **G. F. Kahl, D. E. Friederici, S. W. Bigelow, A. B. Okey, D. W. Nebert** (1980). Ontogenetic expression of regulatory and structural gene products associated with the Ah locus. Comparison of rat, mouse, rabbit and *Sigmodon hispidus*., *Dev Pharmacol Ther*, 2-3, 137-162.
- [64] **E. Enan, F. Matsumura** (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway., *Biochem Pharmacol*, 10, 1599-1612.
- [65] **S. L. Levine, G. H. Perdew** (2001). Aryl hydrocarbon receptor (AhR)/AhR nuclear translocator (ARNT) activity is unaltered by phosphorylation of a periodicity/ARNT/single-minded (PAS)-region serine residue., *Mol Pharmacol*, 3, 557-566.
- [66] **C. Köhle, H. Gschaidmeier, D. Lauth, S. Topell, H. Zitzer, K. W. Bock** (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells., *Arch Toxicol*, 3, 152-158.
- [67] **Ellen Fritsche, Claudia Schäfer, Christian Calles, Thorsten Bernsmann, Thorsten Bernshausen, Melanie Wurm, Ulrike Hübenthal, Jason E Cline, Hossein Hajimiragha, Peter Schroeder, Lars-Oliver Klotz, Agneta Rannug, Peter Fürst, Helmut Hanenberg, Josef Abel, Jean Krutmann** (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 21, 8851-8856.
- [68] **D. Volonté, F. Galbiati, R. G. Pestell, M. P. Lisanti** (2001). 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., *J Biol Chem*, 11, 8094-8103.
- [69] **Elaine M Khan, Jill M Heidinger, Michal Levy, Michael P Lisanti, Tommer Ravid, Tzipora Goldkorn** (2006). Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking., *J Biol Chem*, 20, 14486-14493.
- [70] **Nima Mosammaparast, Lucy F Pemberton** (2004). Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators., *Trends Cell Biol*, 10, 547-556.

- [71] **Sheng-Chieh Hsu, Mien-Chie Hung** (2007). Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family., *J Biol Chem*, 14, 10432-10440.
- [72] **S. Y. Lin, K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon, M. C. Hung** (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor., *Nat Cell Biol*, 9, 802-808.
- [73] **C. R. Lin, W. S. Chen, C. S. Lazar, C. D. Carpenter, G. N. Gill, R. M. Evans, M. G. Rosenfeld** (1986). Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms., *Cell*, 6, 839-848.
- [74] **E. Skarpen, M. P. Oksvold, H. Grøsvik, C. Widnes, H. S. Huitfeldt** (2005). Altered regulation of EGF receptor signaling following a partial hepatectomy., *J Cell Physiol*, 3, 707-716.
- [75] **Gabriele Wanner, Claus Mayer, Rainer Kehlbach, H. Peter Rodemann, Klaus Dittmann** (2008). Activation of protein kinase Cepsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation., *Radiother Oncol*, 3, 383--390.
- [76] **A. C. Newton** (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation., *J Biol Chem*, 48, 28495-28498.
- [77] **Y. Nishizuka** (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C., *Science*, 5082, 607-614.
- [78] **Alex Toker** (2005). The biology and biochemistry of diacylglycerol signalling. Meeting on molecular advances in diacylglycerol signalling., *EMBO Rep*, 4, 310-314.
- [79] **R. H. Michell** (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function., *Biochim Biophys Acta*, 1, 81-47.
- [80] **M. P. Czech** (2000). PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface., *Cell*, 6, 603-606.
- [81] **P. W. Majerus** (1992). Inositol phosphate biochemistry., *Annu Rev Biochem*, , 225-250.
- [82] **T. Itoh, T. Ijuin, T. Takenawa** (1998). A novel phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase (phosphatidylinositol-phosphate kinase IIgamma) is phosphorylated in the endoplasmic reticulum in response to mitogenic signals., *J Biol Chem*, 32, 20292-20299.
- [83] **L. J. Pike, A. T. Eakes** (1987). Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells., *J Biol Chem*, 4, 1644-1651.
- [84] **T. Sakisaka, T. Itoh, K. Miura, T. Takenawa** (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments., *Mol Cell Biol*, 7, 3841-3849.

Literaturverzeichnis

- [85] **S. P. Halenda, M. B. Feinstein** (1984). Phorbol myristate acetate stimulates formation of phosphatidyl inositol 4-phosphate and phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate in human platelets., *Biochem Biophys Res Commun*, 2, 507-513.
- [86] **B. Payraastre, M. Nievers, J. Boonstra, M. Breton, A. J. Verkleij, P. M. Van Bergen en Henegouwen** (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix., *J Biol Chem*, 8, 5078-5084.
- [87] **G. H. Jenkins, P. L. Fisette, R. A. Anderson** (1994). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid., *J Biol Chem*, 15, 11547-11554.
- [88] **S. G. Rhee, Y. S. Bae** (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes., *J Biol Chem*, 24, 15045-15048.
- [89] **B. Sun, N. R. Murray, A. P. Fields** (1997). A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition., *J Biol Chem*, 42, 26313-26317.
- [90] **Berg** (2006) *Biochemistry. Freeman.*
- [91] **M. K. Topham, S. M. Prescott** (1999). Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions., *J Biol Chem*, 17, 11447-11450.
- [92] **H. Kanoh, K. Yamada, F. Sakane** (1990). Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction?, *Trends Biochem Sci*, 2, 47-50.
- [93] **Takehiro Matsubara, Yasuhito Shirai, Kei Miyasaka, Takuya Murakami, Yasuto Yamaguchi, Takehiko Ueyama, Masahiro Kai, Fumio Sakane, Hideo Kanoh, Toshiaki Hashimoto, Shinji Kamada, Ushio Kikkawa, Naoaki Saito** (2006). Nuclear transportation of diacylglycerol kinase gamma and its possible function in the nucleus., *J Biol Chem*, 10, 6152-6164.
- [94] **W. J. van Blitterswijk, B. Houssa** (1999). Diacylglycerol kinases in signal transduction., *Chem Phys Lipids*, 1-2, 95-108.
- [95] **Tracy Crotty, Jinjin Cai, Fumio Sakane, Akinobu Taketomi, Stephen M Prescott, Matthew K Topham** (2006). Diacylglycerol kinase delta regulates protein kinase C and epidermal growth factor receptor signaling., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 42, 15485-15490.
- [96] **C. J. Carsberg, J. Ohanian, P. S. Friedmann** (1995). Ultraviolet radiation stimulates a biphasic pattern of 1,2-diacylglycerol formation in cultured human melanocytes and keratinocytes by activation of phospholipases C and D., *Biochem J*, 471-477.
- [97] **T. Nakajima, O. Yukawa** (1999). Mechanism of radiation-induced diacylglycerol production in primary cultured rat hepatocytes., *J Radiat Res (Tokyo)*, 2, 135-144.

- [98] **Hong-Jun Liao, Graham Carpenter** (2007). Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression., *Mol Biol Cell*, 3, 1064-1072.
- [99] **Simon Dowler, Gursant Kular, Dario R Alessi** (2002). Protein lipid overlay assay., *Sci STKE*, 129, PL6.
- [100] **M. J. Solomon, A. Varshavsky** (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 19, 6470-6474.
- [101] **G. Levkowitz, H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz, Y. Yarden** (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1., *Mol Cell*, 6, 1029-1040.
- [102] **Annemieke A de Melker, Gerda van der Horst, Jannie Borst** (2004). Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment., *J Biol Chem*, 53, 55465-55473.
- [103] **J. S. Biscardi, M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu, S. J. Parsons** (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function., *J Biol Chem*, 12, 8335-8343.
- [104] **T. Tamaoki, H. Nakano** (1990). Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin., *Biotechnology (N Y)*, 8, 732-735.
- [105] **Vittoria Cenni, Heike Döppler, Erica D Sonnenburg, Nadir Maraldi, Alexandra C Newton, Alex Toker** (2002). Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation., *Biochem J*, Pt 3, 53--545.
- [106] **Y. Jiang, F. Sakane, H. Kanoh, J. P. Walsh** (2000). Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes., *Biochem Pharmacol*, 7, 763-772.
- [107] **Y. Nishizukam** (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion., *Nature*, 5961, 693-698.
- [108] **M. L. Smith, J. M. Ford, M. C. Hollander, R. A. Bortnick, S. A. Amundson, Y. R. Seo, C. X. Deng, P. C. Hanawalt, A. J. Fornace** (2000). p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes., *Mol Cell Biol*, 10, 3705-3714.
- [109] **S. M. Mallya, M. O. Sikpi** (1999). Requirement for p53 in ionizing-radiation-inhibition of double-strand-break rejoining by human lymphoblasts., *Mutat Res*, 2, 119-132.
- [110] **A. Ullrich, J. Schlessinger** (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity., *Cell*, 2, 203-212.

Literaturverzeichnis

- [111] **Lisa-Marie Sturla, George Amorino, Michael S Alexander, Ross B Mikkelsen, Kristoffer Valerie, Rupert K Schmidt-Ullrich** (2005). Requirement of Tyr-992 and Tyr-1173 in phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by ionizing radiation and modulation by SHP2., *J Biol Chem*, 15, 14597-14604.
- [112] **K. A. Lund, C. S. Lazar, W. S. Chen, B. J. Walsh, J. B. Welsh, J. J. Herbst, G. M. Walton, M. G. Rosenfeld, G. N. Gill, H. S. Wiley** (1990). Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation., *J Biol Chem*, 33, 20517-20523.
- [113] **Lucy F Pemberton, Bryce M Paschal** (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export., *Traffic*, 3, 18-198.
- [114] **Ken-ichi Sato, Tomomi Nagao, Tetsushi Iwasaki, Yusuke Nishihira, Yasuo Fukami** (2003). Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21waf1 pathway in A431 cells., *Genes Cells*, 12, 995-1003.
- [115] **Hui-Wen Lo, Sheng-Chieh Hsu, Mien-Chie Hung** (2006). EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization., *Breast Cancer Res Treat*, 3, 211-218.
- [116] **H. Mellor, P. J. Parker** (1998). The extended protein kinase C superfamily., *Biochem J*, , 281-292.
- [117] **U. Rosenberger, M. Shakibaei, K. Buchner** (1995). Localization of non-conventional protein kinase C isoforms in bovine brain cell nuclei., *Biochem J*, 269-275.
- [118] **R. Beckmann, C. Lindschau, H. Haller, F. Hucho, K. Buchner** (1994). Differential nuclear localization of protein kinase C isoforms in neuroblastoma x glioma hybrid cells., *Eur J Biochem*, 2, 335-343.
- [119] **S. Stabel, P. J. Parker** (1991). Protein kinase C., *Pharmacol Ther*, 1, 71-95.
- [120] **L. V. Dekker, P. J. Parker** (1994). Protein kinase C-a question of specificity., *Trends Biochem Sci*, 2, 73-77.
- [121] **S. G. Rhee, K. D. Choi** (1992). Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms., *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 35-61.
- [122] **S. G. Rhee, K. D. Choi** (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes., *J Biol Chem*, 18, 12393-12396.
- [123] **A. C. Newton** (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions., *Chem Rev*, 8, 2353-2364.
- [124] **Y. Jiang, W. Qian, J. W. Hawes, J. P. Walsh** (2000). A domain with homology to neuronal calcium sensors is required for calcium-dependent activation of diacylglycerol kinase alpha., *J Biol Chem*, 44, 34092-34099.

- [125] **J. P. Walsh, R. Suen, J. A. Glomset** (1995). Arachidonoyl-diacylglycerol kinase. Specific in vitro inhibition by polyphosphoinositides suggests a mechanism for regulation of phosphatidylinositol biosynthesis., *J Biol Chem*, 48, 28647-28653.
- [126] **Bai Luo, Stephen M Prescott, Matthew K Topham** (2003). Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta., *J Biol Chem*, 41, 39542-39547.
- [127] **M. K. Topham, M. Bunting, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, P. J. Blackshear, S. M. Prescott** (1998). Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta., *Nature*, 6694, 697-700.
- [128] **Yong-chun Su, Di Lu, Xiao-dan Tan, Ai-rong Dong, Hui-yong Tian, Shen-qiu Luo, Qin-kai Deng** (2006). Mathematical model of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis mediated by epidermal growth factor receptor generating diacylglycerol., *J Biotechnol*, 3, 574-591.
- [129] **C. Cochet, O. Filhol, B. Payrastre, T. Hunter, G. N. Gill** (1991). Interaction between the epidermal growth factor receptor and phosphoinositide kinases., *J Biol Chem*, 1, 637-644.
- [130] **M. G. Waugh, D. Lawson, S. K. Tan, J. J. Hsuan** (1998). Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveolae-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes., *J Biol Chem*, 27, 17115-17121.
- [131] **T. Nakajima, O. Yukawa** (1996). Radiation-induced translocation of protein kinase C through membrane lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes., *Int J Radiat Biol*, 4, 473-480.
- [132] **Spencer J Collis, Theodore L DeWeese, Penelope A Jeggo, Antony R Parker** (2005). The life and death of DNA-PK., *Oncogene*, 6, 949-961.
- [133] **P. A. Jeggo** (1998). DNA breakage and repair., *Adv Genet*, , 185-218.
- [134] **Benjamin P C Chen, Doug W Chan, Junya Kobayashi, Sandeep Burma, Aroumougame Asaithamby, Keiko Morotomi-Yano, Elliot Botvinick, Jun Qin, David J Chen** (2005). Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks., *J Biol Chem*, 15, 14709-14715.
- [135] **Benjamin J Friedmann, Martyn Caplin, Boris Savic, Tahir Shah , Christopher J Lord, Alan Ashworth, John A Hartley, Daniel Hochhauser** (2006). Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment., *Mol Cancer Ther*, 2, 209-218.

Curriculum vitae

Name: Gabriele Wanner

Geburtsdatum (-ort): 06. Oktober 1977, Böblingen

Akademischer Werdegang und Ausbildung:

2005 bis 2008 Promotion an der Universität Hohenheim, Abschluss zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
Thema: „Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus des Radioprotektors *O-Phospho L-Tyrosin*“

Abschluss: Dr.rer.nat., Abschlussnote 1,2 (magna cum laude)

Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin,
Universitätsklinikum Tübingen, Sektion für Strahlenbiologie & Molekulare Umweltforschung

2000 bis 2005: Studium der Biologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
Vertiefungen: Zoologie, Zelluläre Mikrobiologie, Virologie
Diplomarbeit am radiobiologischen Institut der Bundeswehr, München
Thema: „Untersuchung zum Einfluss von Mastzellfaktoren auf die Proliferation und Migration von Fibroblasten“
Abschluss: Diplom Biologin, Abschlussnote: 1,4

1998 bis 2000: Ausbildung zur Tanzlehrerin ADTV, ADTV Tanzschule Kaiser, Esslingen
Abschluss: Tanzlehrerin ADTV, Abschlussnote: 1,3

1997 bis 1998: Ausbildung zur Hotelfachfrau, Copthorne Hotel International, Stuttgart/Möhringen

Schulbildung:

1988 bis 1997: Albert-Einstein-Gymnasium, Böblingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Abschlussnote: 2,5