

**Untersuchungen zur Wirkungsweise des
Radioprotektors O-Phospho-L-Tyrosin
auf die Zellreparatur und den Metabolismus der Zelle**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Angela Paasch
aus Berlin

Tübingen
2014

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

14.07.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. H. Peter Rodemann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Olaf Rieß

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Rodemann für die Möglichkeit bedanken, dass ich in diesem Labor eine so interessante Arbeit durchführen konnte. Für die gute Betreuung danke ich ebenso wie für die Gespräche und Diskussionen, aus denen ich jedes Mal voller neuer Aufgaben und Ideen ging.

Herrn Prof. Rieß danke ich für die sofortige Bereitschaft der Übernahme der Gesamtbetreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen und der immer sehr freundlichen und angenehmen Gespräche.

Herrn Prof. Dittmann möchte ich für die Ausarbeitung der Fragestellung meiner Arbeit sowie der stets angenehmen und guten wissenschaftlichen Betreuung danken. Genauso wie die immer wieder motivierenden Gesprächen.

Herrn Prof. Huber danke ich für die immer hilfsbereite und geduldige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Durchflusszytometrie-Versuche.

Herzlichen Dank auch an alle Mitglieder der Sektion für Strahlenbiologie und molekulare Umweltforschung für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die spannende und lustige gemeinsame Zeit.

Besonders möchte ich mich dabei bei Elena Hausherr für die regelmäßigen netten Gespräche bedanken, die mich auch fachlich immer mal wieder neue Sichtweisen einschlagen ließ. Genauso wie dafür, dass unser Kontakt weiterhin so stabil ist und sie mir auch bei der Niederschrift dieser Arbeit jederzeit für Fragen und Anregungen zur Verfügung stand.

Mein Dank gilt aber auch Christoph und meiner Familie für die dauerhafte Unterstützung und Motivation in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Einsatz von Radioprotektoren in der Medizin	2
1.1.1 Der Radioprotektor Phosphotyrosin	4
1.2 Die Rolle der Chromatinstruktur für die DNA-Reparatur	6
1.2.1 Die Bedeutung der Acetyltransferase Tip60 für die DNA-Reparatur	8
1.3 Zusammenhang zwischen Glukosemetabolismus und DNA-Reparatur	10
1.4 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Zellen und Zellkulturmedien	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Chemikalien	16
2.1.4 Radiochemikalien	16
2.1.5 Geräte	16
2.1.6 Lösungen und Puffer	17
2.1.7 Detergenzien und SH-RNA	19
2.1.8 Primäre Antikörper	19
2.1.9 Sekundäre Antikörper	20
2.1.10 Kits	20
2.1.11 Farbstoffe für Durchflusszytometer (FACS)	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 Bestrahlung	21
2.2.3 Koloniebildungstest (klonogenes Überleben)	21
2.2.3.1 Koloniebildungstest mit stationären Zellen	21
2.2.3.2 Koloniebildungstest mit wachsenden Zellen	21
2.2.4 Proteinaufbereitung	22

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.1	Aufbereitung von Gesamt-Proteinlysaten	22
2.2.4.2	Aufbereitung der Kern- und cytoplasmatischen Proteinfraction	22
2.2.5	Western-Blot	23
2.2.6	Immunopräzipitation	23
2.2.7	Transduktion von Zellen mit Lentiviren	23
2.2.8	Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$	24
2.2.9	Messung der Mitochondrienzahl	24
2.2.10	Messung der ATP-Konzentration	25
2.2.11	Messung der Glukoseaufnahme	25
2.2.12	Messung der Histon-Acetyltransferaseaktivität von Tip60	25
2.2.13	Densitometrische Auswertung und Statistik	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Phosphotyrosin (pTyr) induziert einen radioprotektiven Effekt in TP53-Wildtyp-Zellen in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit	27
3.2	Abhängigkeit des radioprotektiven Effekts von pTyr auf TP53-Wildtyp-Zellen von der Akkumulation des Ah-Rezeptors	29
3.2.1	Stabilisierung der nukleären AhR-Proteinmenge nach pTyr-Vorbehandlung	30
3.2.2.	Herstellung von A549 AhR-SH Zellen (AhR-knockdown)	31
3.2.3	Einfluss einer AhR-Reduktion durch shRNA auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung	33
3.3	Einfluss von pTyr auf die Chromatinstruktur der DNA durch Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung (K9/S10)	34
3.3.1	Phosphotyrosin-vermittelte Acetylierung/ Phosphorylierung von Histon H3 in	34

Inhaltsverzeichnis

Abhängigkeit des TP53-Status der Zellen	
3.3.2 Identifizierung der Histon H3 Acetyltransferase nach pTyr-Inkubation	37
3.3.3 Phosphotyrosin-vermittelter Anstieg der Tip60-Aktivität	41
3.4 Einfluss einer pTyr-Vorbehandlung auf die ATP-Produktion und Glukoseaufnahme der Zellen	44
3.4.1 Phosphotyrosin beeinflusst die ATP-Konzentration in TP53-Wildtyp und TP53-mutierten Zellen	44
3.4.2 Glukoseaufnahme nach pTyr-Präinkubation in Abhängigkeit des TP53-Statuses	45
3.5 Einfluss des SGLT1-Inhibitors Phloridzin auf die Glukoseaufnahme und ATP-Konzentration nach pTyr-Behandlung	47
3.5.1 Phloridzin wirkt dem pTyr-vermittelten Effekt auf die Glukoseaufnahme in A549-Zellen entgegen	47
3.5.2 Der SGLT-1-Inhibitor Phloridzin kann den Effekt von pTyr auf die Histon H3 (K9/S10) – Acetylierung/ Phosphorylierung verändern	48
3.5.3 SGLT-1-Akkumulation in der Zelle nach pTyr-Inkubation in Abhängigkeit der EGFR-Konzentration	49
3.6 Phosphotyrosin vermittelte Effekte auf Mitochondrien	50
3.6.1 Phosphotyrosin reduziert das Mitochondrienpotential in A549-Zellen	50
3.6.2 Einfluss einer pTyr-Präinkubation auf die Mitochondrienzahl	51
3.6.3 pTyr-Präinkubation führt zum Anstieg von pAMPK	54
3.6.4 Einfluss des SGLT-1-Inhibitors Phloridzin auf den Phosphotyrosin vermittelten Effekt auf die	54

Inhaltsverzeichnis

Mitochondrienzahl	
3.7 Effekte einer pTyr-Behandlung auf mitochondriale Proteine	55
3.7.1 Unterschiedliche Expressionsstärke von COX2 und SCO2 in TP53-wt und TP53-mut-Zellen	55
3.7.2 Effekt von pTyr auf die Proteinexpression der mitochondriale Proteine COX2 und SCO2 in A549	57
4. Diskussion	59
4.1. Für die radioprotektive Wirkung von pTyr ist eine 16-stündige Vorbehandlung notwendig	59
4.2 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist nicht essentiell für die Wirkungsweise des Radioprotektors pTyr	59
4.3 pTyr induzierte Effekte auf die Chromatinstruktur von TP53-Wildtypzellen	60
4.4 pTyr beeinflusst den Metabolismus der Zelle	63
5. Zusammenfassung	70
6. Abkürzungen	72
8. Literaturverzeichnis	74

Einleitung

1. Einleitung:

Krebs ist eine immer häufiger werdende Diagnose in Deutschland. Im Jahr 2008 erkrankten laut Daten des Robert Koch Instituts 470.000 Menschen neu an Krebs, für das Jahr 2012 ist mit einem Anstieg auf 490.000 Neuerkrankungen zu rechnen.

Durch verbesserte Therapien konnte jedoch die Todesrate erheblich gesenkt werden. So starben 1980 noch etwa zwei Drittel der Krebspatienten an ihrer Erkrankung, während die Zahl aktuell weniger als die Hälfte beträgt (Robert-Koch-Institut 2012).

Für die Behandlung von Krebs stellt in der Medizin, neben vielen anderen Methoden, nach wie vor die Strahlentherapie eine wichtige und effektive Behandlungsmethode dar. Etwa die Hälfte aller Krebspatienten erhält im Rahmen der Therapie eine Bestrahlung (Bourgier et al. 2012). Mithilfe von Röntgenstrahlen können mittlerweile Tumore sehr präzise mit einer definierten Dosis bestrahlt werden. Die Strahlung bewirkt therapeutisch vor allem, dass das Erbgut der Krebszellen geschädigt wird, was zu einem Absterben der Zellen führen soll.

Neben den DNA-Doppelstrangbrüchen, die für Zellen eine schwerwiegende und nicht immer reparable Schädigung darstellen, führt ionisierende Strahlung auch zur Bildung freier Radikale im Gewebe, die wiederum die Zelle schädigen und zudem auch die Signalvorgänge in den Zellen behindern können.

Innerhalb des Tumors sind diese Effekte gewollt und erzielen den therapeutischen Nutzen. Jedoch kommt es auch heute trotz sehr begrenzter Strahlungsfelder noch immer zur Schädigung von umliegendem gesundem Gewebe. Diese Schädigung kann von örtlichen Rötungen bis hin zur Entstehung von neuen Tumoren verschiedenste Nebenwirkungen zur Folge haben und ist sowohl dosis- als auch gewebeabhängig.

Ionisierende Strahlung selbst verursacht DNA-Schäden. Diese entstandenen Schäden müssen von der Zelle zuerst registriert und dann entsprechende Signale, meist in Form von bestimmten Signal-Proteinen, die eine Reparatur der Schäden veranlassen weitergegeben werden. Für die Reparatur der DNA ist es notwendig, anschließend den Zellzyklus zu stoppen, um dann die entsprechenden Reparaturprozesse einzuleiten. Ist eine Reparatur aufgrund der Schäden nicht mehr möglich, wird der Zelltod eingeleitet.

DNA-Schäden können grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen treten Basen- und Einzelstrangschäden auf, die durch Exzisionsreparaturmechanismen (BER, NER und MMR) recht schnell und fehlerfrei repariert werden können. Zum anderen treten Doppelstrangbrüche auf, welche mithilfe von homologer Rekombination (HR) oder „Non-Homologen Endjoining“ (NHEJ) deutlich langsamer und zum Teil mit großen Fehlern repariert werden können.

Einleitung

Eine bessere Untersuchung der Effekte von therapeutischer Bestrahlung sowohl in Tumoren als auch im Normalgewebe, soll zukünftig eine noch effektivere Tumorthherapie und gleichzeitig eine Verringerung der Nebenwirkungen im Normalgewebe bewirken.

1.1 Der Einsatz von Radioprotektoren in der Medizin

Da ein Großteil der durch die therapeutische Strahlentherapie ausgelösten Zellschäden über die Bildung von Radikalen ausgelöst werden, wurde schon früh versucht diesen Effekten im gesunden Gewebe entgegenzuwirken (Friedberg 2006). Hierfür wird der Einsatz von Radikalfängern als Radioprotektoren untersucht.

Hanno Krieger definiert Radioprotektoren daher als Substanzen, die die Elektronenentzugsrate durch Neutralisation der Radikale verringern. Solche Stoffe müssen vor der Strahlenexposition ins Gewebe eingebracht werden, da Radikale innerhalb von Mikrosekunden nach Bestrahlung Gewebeschäden verursachen können (Krieger 2009).

Wichtig beim Einsatz von Radioprotektoren ist jedoch, dass sie nicht Krebszellen und Normalgewebe gleichermaßen schützen, da dies einem Therapieerfolg entgegenstünde (Krieger 2009).

Natürlicherweise sind alle unsere Zellen einer geringen natürlichen Strahlenbelastung ausgesetzt, die sie tolerieren (Planel et al. 1987; Liu 2010). Expositionen mit höheren Strahlendosen führen dagegen zu einer erhöhten Rate von Mutationen und Zelltod.

Der medizinische Einsatz von Radioprotektoren könnte daher die Nebenwirkungen und Spätfolgen der Strahlentherapie erheblich verringern und gleichzeitig den Therapieerfolg durch den Einsatz höherer Dosen auf den Tumor steigern. Aktuell sind jedoch nur wenige Radioprotektoren für den medizinischen Einsatz zugelassen. Als Radioprotektoren dienen vor allem einige organische Schwefelverbindungen wie die Thiole, die eine SH-Gruppe als funktionelle Gruppe enthalten (Krieger 2009). Zu den Thiolen gehört auch der klinisch zugelassene Radioprotektor Amifostin (WR2721) (Grdina et al. 1995; Kouvaris et al. 2007). Der zytoprotektive Schutz von Amifostin ist sehr kompliziert, er umfasst das Abfangen freier Radikale und die Beschleunigung der Reparatur. Amifostin ist zugelassen, um die sich häufende Nierenschädigung in Verbindung mit der wiederholten Gabe von Cisplatin an Patienten mit fortgeschrittenem Ovarienkrebs (Eierstockkrebs) zu reduzieren, und zum Senken der Häufigkeit von mittlerer bis schwerer Xerostomie bei Patienten, die postoperativ eine Bestrahlung bei Kopf-Halstumoren erhielten (Kouvaris et al. 2007). Jedoch hat Amifostin auch viele Nebenwirkungen, was den Einsatz eingrenzt (Koukourakis et al. 2000).

Einleitung

Es wird daher weiter nach effektiveren und mit weniger Nebenwirkungen verbundenen Radioprotektoren gesucht. Erste Überlegungen waren, die Regeneration von haematopoetischen Stammzellen zu beeinflussen. Das Ziel war es, in den durch die Bestrahlung geschädigten Stammzellen das Überleben durch Stimulation der Funktion und Regeneration zu verbessern (Whitnall et al. 2000; Landauer et al. 2003). Immunmodulatoren und Zytokine stellten dabei die Hauptsubstanzen dieser Kategorie dar (Hosseinimehr 2007).

Natürlich vorkommende Komponenten, welche als Antioxidantien oder Immunstimulanzien dienen, waren eine weitere Strategie, um Radioprotektoren mit einer geringeren Toxizität zu entwickeln. Als Beispiel hierfür wäre die radioprotektive Wirkung von verschiedenen Vitaminen und Vitamin-Derivaten sowie Enzymen und Mineralien zu nennen, welche jedoch wie viele andere Substanzen nicht normalgewebsspezifisch wirken und daher Krebszellen ebenso schützen. Dieser Effekt verhindert einen klinischen Einsatz (Felemovicius et al. 1995; Nair et al. 2003).

Des Weiteren gibt es die Überlegung Substanzen als Radioprotektoren einzusetzen, die endogene Schutzmechanismen, die eine Zelle natürlicherweise gegenüber Strahlung besitzt, zu verstärken oder zu beschleunigen, um Radioprotektoren mit einer geringeren Toxizität als den Thiolverbindungen zu entwickeln. Am meisten diskutiert werden in diesem Rahmen Wachstumshormone und Interleukine, wie z.B. Interleukin 1 (Braunschweiger et al. 1996).

Zudem stellt der 1985 beschriebene Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) einen erfolgsversprechenden Vertreter dieser Gruppe dar. Bei BBI handelt es sich um einen Proteaseinhibitor, der aus 71 Aminosäuren besteht und in der Sojabohne vorkommt (Birk 1985).

Dittmann et al. konnten 1995 zeigen, dass eine Inkubation von Fibroblasten mit 10 μM BBI vor Bestrahlung mit 0 - 8 Gray zu einem signifikant besseren Überleben führt (Dittmann et al. 1995). Diese *in vitro* Daten konnten dann 2005 auch *in vivo* bestätigt werden (Dittmann et al. 2005).

Hinzu kam die Beobachtung, dass der radioprotektive Effekt von BBI davon abhängig ist, ob ein Wildtyp-TP53 in den Zellen vorhanden ist (Dittmann et al. 1998). Diese Beobachtung ist von großer Bedeutung, da der Tumorsuppressor TP53 in mehr als der Hälfte aller Tumore mutiert ist (Hollstein et al. 1991; Otsuka and Ishioka 2007). Somit wäre bei mehr als 50 % aller Strahlentherapien der Einsatz von BBI denkbar, was BBI zu einem vielversprechenden neuen Radioprotektor macht.

Einleitung

BBI scheint einen positiven Einfluss auf die DNA-Reparatur auszuüben und dadurch die Zelle nach Bestrahlung zu schützen. Es konnte gezeigt werden, dass BBI die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) aktivieren kann und dadurch einen positiven Einfluss auf das „Non-Homologe Endjoining“ (NHEJ) ausübt (Dittmann et al. 2003).

Das NHEJ ist eine der zwei wichtigsten Mechanismen der Zellen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Während die Homologe Rekombination (HR) nur innerhalb der späten S- und der G2-Phase des Zellzyklus und nur bei einer vorhandenen Homologie von mehr als 100 bp Reparaturen an der DNA durchführen kann, werden mit Hilfe des NHEJ zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus Doppelstrangbrüche repariert (Lieber et al. 2010). Zu den bekannten Enzymen der NHEJ gehören beispielsweise Ku, DNA-PK, Polymerase lambda, DNA Ligase IV und noch viele weitere.

Da BBI ein Peptid darstellt, wurde nach dem aktiven Zentrum dieses Polypeptids gesucht und dabei eine Sequenz aus nur 5 Aminosäuren (Ala-Leu-Ser-Tyr-Pro) identifiziert, die einen ähnlich protektiven Effekt auf das Überleben von humanen Hautfibroblasten nach Bestrahlung zeigte, wie das ursprüngliche BBI (Dittmann et al. 2001a).

Aus dieser Sequenz konnte wiederum ein phosphoryliertes Tyrosin identifiziert werden, das vergleichbare protektive Effekte bei gleicher Konzentration auf das klonogene Überleben von TP53-Wildtypzellen hatte (Dittmann et al. 2001b). Auch bei Phosphotyrosin (pTyr) konnte, wie zuvor bei BBI, keine protektive Wirkung auf Zellen mit einem mutierten TP53 beobachtet werden.

Diese Spezifität auf Zellen mit Wildtyp TP53 machen pTyr wie BBI zu vielversprechenden Kandidaten von Radioprotektoren, die vielleicht zukünftig in der Radioonkologie Verwendung finden können.

1.1.1 Der Radioprotektor Phosphotyrosin

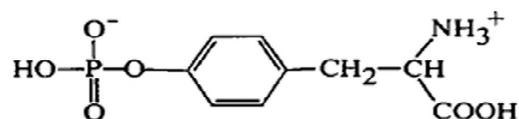


Abb.1.1 Schematische Darstellung von Phosphotyrosin (pTyr) (Wanner 2008)

Als eine erste Wirkung von pTyr veröffentlichten Mishra et al. 1993, dass pTyr bei Konzentrationen über 1 mM die Proliferation von renalen und Brustkrebszellen inhibiert.

Einleitung

Dabei wird das Wachstum in der S-Phase des Zellzyklus gestoppt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es auch zu einer Hemmung der Tyrosinphosphorylierung des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) kam (Mishra and Hamburger 1993b).

Als Ursache für die pTyr-vermittelte Wachstumshemmung vermuteten Mishra et al. eine Unterdrückung der zellulären Tyrosinphosphorylierung. Sowohl die verringerte Aktivität der EGFR-Kinase als auch die Erhöhung der PTPase (Protein Tyrosin Phosphatasen) könnten die Inhibierung des Zellwachstums begründen (Mishra and Hamburger 1993a).

In folgenden Arbeiten unseres Labors konnte dann gezeigt werden, dass pTyr in mikromolaren Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt, jedoch in TP53-Wildtypzellen einen radioprotektiven Effekt zeigt (Dittmann et al. 2001a; Dittmann et al. 2001b). Es konnte auch gezeigt werden, dass pTyr zu einer Stabilisierung von TP53 in Normalgewebszellen führt. Für pTyr sind leider bisher keine *in vivo*-Daten publiziert. Dafür jedoch für das verwandte BBI bei dem man pTyr als aktive Gruppe annimmt. Mithilfe eines Beinverkürzungs-Tests bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Beinverkürzung bei Mäusen, die 100 mg/kg BBI vor Bestrahlung erhalten haben, signifikant reduziert war. Bei diesem Assay wird der Normalgewebsschaden (radiogene Fibrose) erfasst und quantifiziert. Diese Wirkung war jedoch nur im Normalgewebe, nicht bei Tumoren mit TP53-Mutationen zu beobachten (Dittmann et al. 2005). Diese Ergebnisse sind auch für pTyr bereits bestätigt worden, jedoch aktuell noch nicht publiziert (Dittmann, persönliche Mitteilung).

Die Beobachtung von Mishra et al., dass eine pTyr-Inkubation Einfluss auf den EGFR besitzt, konnte 2007 von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Der radioprotektive Effekt von pTyr auf Normalgewebe konnte durch den Einsatz des EGFR-Inhibitors Cetuximab aufgehoben werden. Weitere Untersuchungen des EGFR nach pTyr-Inkubation zeigten, dass der EGFR am Threoninrest 654 (Thr 654) phosphoryliert wird, wie es auch nach Bestrahlung der Fall ist. Die EGFR-Akkumulation im Zellkern nach pTyr-Inkubation ist assoziiert mit der Aktivierung der DNA-PK (Dittmann et al. 2007).

Zudem konnte Gabriele Wanner in ihrer Dissertation 2008 feststellen, dass es nach pTyr-Inkubation nicht nur zu einem Anstieg des EGFR, sondern auch zu einer Akkumulation des Aryl-Hydrokarbon-Rezeptors (AhR) im Zellkern kommt. Der AhR, auch Dioxin-Rezeptor genannt, ist ein zytosolischer Liganden-abhängiger Rezeptor, der vor allem im Zusammenhang mit Toxinen bekannt ist. Er ist in der Lage polyzyklische Aromaten als Liganden zu binden und wurde 1976 über eine Ligandenbindungsanalyse mit radioaktiv markiertem Dioxin identifiziert (Poland et al. 1976b). Der AhR liegt in der Zellmembran im

Einleitung

Komplex mit weiteren Proteinen vor, u.a. der c-Src Kinase. Nach Aktivierung wird c-Src vom AhR-Komplex abgespalten und der AhR translokalisiert, wie der EGFR, nach Aktivierung in den Zellkern, wo er mit ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) ein Dimer bildet (Enan and Matsumura 1996; Levine and Perdew 2001). Im Zellkern wirkt der AhR als Transkriptionsfaktor und ist in der Lage verschiedene Gene zu aktivieren.

Gabriele Wanner vermutete aufgrund ihrer Beobachtungen, dass pTyr zu einer Aktivierung des AhR führt, dass es anschließend zu einer Abspaltung der c-Src Kinase kommt und letztendlich die Proteinkinase C epsilon den EGFR am Threoninrest 654 phosphoryliert. Sowohl der AhR als auch der EGFR akkumulieren anschließend im Zellkern, wo es offenbar auch Interaktionen zwischen beiden gibt (Wanner 2008).

1.2 Die Rolle der Chromatinstruktur für die DNA-Reparatur

Ein wichtiger Faktor für das Zellüberleben nach Bestrahlung stellt die Fähigkeit der Zelle zur effektiven und schnellen Reparatur der entstandenen Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA dar. Da die DNA jedoch nicht offen im Zellkern vorliegt, sondern in einer dynamischen aber schwer zugänglichen Chromatinstruktur aus verschiedenen Histonen und weiteren Proteinen verpackt ist, muss die DNA für die Reparaturproteine erst zugänglich gemacht werden (Kornberg 1974; Kornberg and Thomas 1974). Die Hauptkomponente des Chromatins ist das Nukleosom. Es umfasst die DNA, welche um ein Histon-Oktamer gewickelt ist. Dieses Oktamer besteht aus einem $(H3-H4)_2$ Tetramer, welches wiederum durch zwei H2A-H2B Dimere flankiert ist (Dechassa and Luger 2011). Diese Struktur schützt einerseits die DNA, andererseits ermöglicht sie auch die Steuerung von Transkription und Replikation. Daher sind Histone auch Ziele von verschiedenen posttranslationalen Modifikationen (PTMs), welche Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen beinhalten (Taverna et al. 2007). Die meisten PTMs finden dabei am N-Terminus der Histone statt (Kouzarides 2007).

Die Verpackung des Chromatins ist variabel, Euchromatin repräsentiert dabei beispielsweise eine offene Chromatinstruktur mit transkriptionell aktiven Regionen. Typischerweise sind die Histone im Euchromatin stark acetyliert und an Lysin 4 und 36 vom Histon H3 methyliert (Barski et al. 2007; Guenther et al. 2007). Im Kontrast dazu repräsentiert das Heterochromatin, welches 15-25 % des Säuger-Chromatins ausmacht, kondensierte Regionen mit niedriger Genaktivität (Peng and Karpen 2008; de Wit and van Steensel 2009). Histone im Heterochromatin zeigen einen geringen Acetylierungslevel, dafür eine große Menge von Histon H3, welches am Lysin 9 und 36 methyliert ist (Pokholok et al. 2005; Vakoc et al. 2006; Barski et al. 2007; Peng and Karpen 2008).

Einleitung

Die Acetylierung von Histonen ist demnach verknüpft mit einer offenen Chromatinstruktur, die notwendig ist, um die DNA für Reparaturproteine zugänglich zu machen (Bassing et al. 2002; Celeste et al. 2002; Celeste et al. 2003). Die Acetylierung von Lysinen treibt dabei die Bildung einer gelockerten Chromatinstruktur besonders voran, da durch die Acetylierung die negative Ladung der Lysine neutralisiert wird (Wang and Hayes 2008; Choi and Howe 2009). Die Entdeckung der Phosphorylierung der H2A-Variante H2AX als eines der ersten Ereignisse bei der DNA-Reparatur stellte den ersten Hinweis dar, wie bedeutend die Histon-Modifikation für die DNA-Reparatur ist (Rogakou et al. 1998). Die phosphorylierte Form des H2AX, welche allgemein als γ H2AX bekannt ist, konzentriert sich nach DNA-Doppelstrangbrüchen an den DNA-Bruchstellen (Rogakou et al. 1999). Diese Akkumulation an den Bereichen der DNA-Defekte ist fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar (Rogakou et al. 1999; Paull et al. 2000) und stellt dadurch ein bekanntes Nachweisverfahren für Doppelstrangbrüche (DBSs) dar.

Neben Effekten auf Histon H2A haben DNA-Defekte auch Auswirkungen auf andere Histone, wie beispielsweise Histon H3. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass es nicht nur während der Replikation zum Einbau neuer Histone H3 kommt, sondern auch nach UV-Strahlung an Stellen der DNA-Reparatur (Polo et al. 2006).

1.2.1 Die Bedeutung der Acetyltransferase Tip60 für die DNA-Reparatur

Einige frühere Arbeiten vermuteten einen Umbau der Chromatinstruktur nach DNA-Schäden aufgrund der Beobachtung, dass Chromatin sehr sensitiv gegenüber Nukleasen nach Bestrahlung war (Telford and Stewart 1989; Carrier et al. 1999; Rubbi and Milner 2003; Ziv et al. 2006). Spätere Arbeiten konnten dann zeigen, dass die ATM-abhängige Phosphorylierung des Heterochromatin-Bindeproteins (Kap1) notwendig ist für die globale Chromatin-Relaxation (Ziv et al. 2006).

Kap1 ist ein Repressor der Transkription, welcher Komplexe mit Histon-Deacetylasen, Histon-Methyltransferasen und HP1 bildet (Zeng et al. 2008; Li et al. 2010).

Die ATM-Kinase ist das Produkt des *ataxia telangiectasia* Gens. Patienten mit *ataxia telangiectasia* zeichnen sich durch eine beeinträchtigte Antikörperproduktion, Neurodegenerationen sowie einem erhöhten Risiko an Krebs zu erkranken aus und sind extrem sensitiv gegenüber durch Strahlung verursachten DNA-Schäden (Lavin 2008). Es konnten mittlerweile hunderte von Proteinen identifiziert werden, die von ATM als Reaktion auf DNA-Schäden phosphoryliert werden, darunter Schlüsselproteine der DSB-Reparatursignalwege wie beispielsweise TP53, Nbs1, chk2 oder H2AX (Matsuoka et al. 2007; Lavin 2008; Jackson and Bartek 2009). Die Aktivierung von ATM ist daher ein entscheidender Schritt bei der Detektion und Reparatur von DSBs. Für die Aktivierung der ATM konnten wiederum zwei essenzielle Faktoren identifiziert werden: der MRN-Komplex und die Acetyltransferase Tip60 (Uziel et al. 2003; Falck et al. 2005; Lee and Paull 2007).

Einleitung

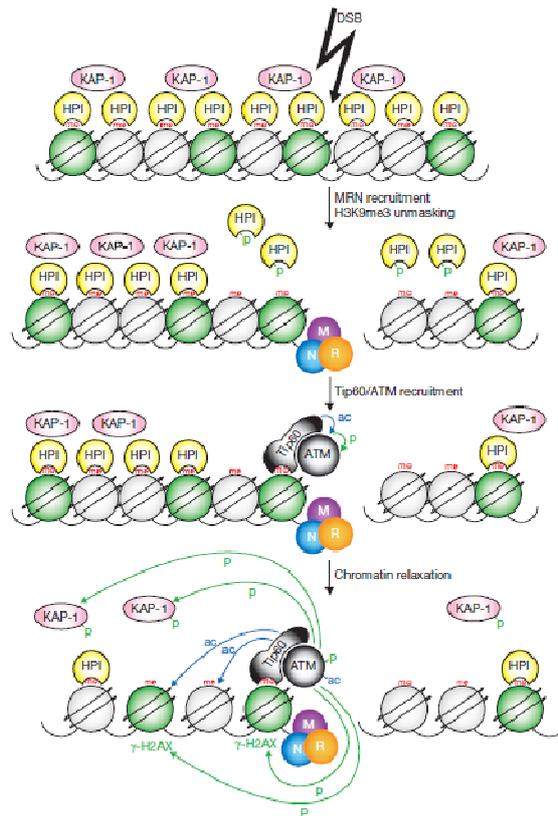


Abb. 1.2 Events der DSB-Erkennung und Reparatur im Heterochromatin. Als Antwort auf DSBs wird die Kasein-Kinase 2 über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert HP1, was dadurch H3K9me3 frei zugänglich macht. Der MRN-Komplex rekrutiert daraufhin den Tip60-ATM-Komplex an diese DSB-Stelle, wo wiederum die HAT-Aktivität von Tip60 durch die Bindung an H3K9me3 aktiviert wird. ATM wird dabei ebenfalls durch Autophosphorylierung aktiviert. Die anschließende Hyperacetylierung von Histon H3 und H4, zusammen mit der Phosphorylierung von KAP-1 und H2AX führen zur Relaxation der Chromatinstruktur und erlauben die DNA-Reparatur. (Fischle 2009)

Der Tumorsuppressor Tip60 (KAT5) ist eine dauerhaft exprimierte Acetyltransferase, welche essentiell für viele Signalwege, wie beispielsweise Transkription, Steroid-Rezeptor-Funktionen, Chromatin-Neuorganisation, Histonacetylierung, DNA-Reparatur und Erhaltung der Stammzellfunktion ist (Carrozza et al. 2003; Squatrito et al. 2006).

Tip60 acetyliert die Lysinreste sowohl von Histonen-, als auch von Nicht-Histon-Proteinen, dazu gehören u.a. die Histone H2A, H3 und H4, TP53, Enzyme des Glukosemetabolismus und auch ATM (Kimura and Horikoshi 1998; Bird et al. 2002; Downs et al. 2004; Kusch et al. 2004; Sun et al. 2005; Murr et al. 2006; Tang et al. 2006; Sun et al. 2007; Lin et al. 2009).

Tip60 wird nach ionisierender Strahlung sehr schnell aktiviert, was wiederum zur Acetylierung und Aktivierung der ATM-Kinase führt. Dabei liegen Tip60 und ATM als Komplex vor (Sun et al. 2005).

Nach DSBs wird der Tip60-ATM-Komplex durch den MRN-Komplex gezielt zum am Lysin 9 trimethylierten Histon H3 geführt. Die anschließende Interaktion zwischen H3K9me3

Einleitung

und Tip60 ist wiederum für die Aktivierung von Tip60 erforderlich (Sun et al. 2009). Dabei wird H3K9me3 erst demethyliert und dann acetyliert, was zur Öffnung der Chromatin-Struktur führt, welche für die anschließenden Reparaturprozesse notwendig ist (Abb. 1.2).

Tip60 ist demnach ein bedeutendes Protein für die DNA-Reparatur, da es ein Schlüsselprotein der DNA-Relaxation darstellt, welche für den Zugang von Reparaturproteinen unabdingbar ist. Dieser wichtige Funktionsschritt könnte einen Ansatzpunkt für einen effektiven Radioprotektor darstellen.

1.3 Zusammenhang zwischen Glukosemetabolismus und DNA-Reparatur

Der Prozess der Erkennung von DNA-Schäden, über die Öffnung dieser, bis hin zur Reparatur sind sehr Energie verbrauchende Prozesse (Kruhlak et al. 2006). In der Zelle steht diesen Prozessen meist Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung.

Für die Generierung von ATP haben aerob wachsende Zellen primär zwei Möglichkeiten: zum einen die mitochondriale Atmungskette, zum anderen die Glykolyse. Die Energiegewinnung über die mitochondriale Atmungskette stellt dabei mit 36 Molekülen ATP/ Glukose die effektivere Form gegenüber der Glykolyse mit nur einer Ausbeute von 2 Molekülen ATP dar (Pelicano et al. 2006), weswegen aerobe Zellen ihre meiste Energie über die mitochondriale Atmungskette gewinnen (Rolfe and Brown 1997).

Im Gegensatz dazu fand O. Warburg bereits in den 1920er Jahren heraus, dass Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen ein gesteigertes Maß an aerober Glykolyse und Milchsäuregärung aufwiesen (Warburg 1956b).

Die Komponenten der mitochondrialen Atmungskette sind an der Mitochondrienmembran lokalisiert. Die zwei wichtigsten Prozesse sind: die Elektronentransportkette, welche sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet und die oxidative Phosphorylierung (Kadenbach 2003). Beide Prozesse sind über einen Protonengradienten, der über der mitochondrialen Membran liegt, aneinander gekoppelt (Mitchell 1961; Mitchell 2011).

Die Reduktionsäquivalente NADH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) und FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinukleotid) leiten Elektronen, die im Citratzyklus gewonnen werden, über verschiedene Redoxvorgänge weiter (Balaban 1990). Die Elektronentransportkette endet dann in der Übertragung der Elektronen auf das Oxidationsmittel Sauerstoff, welcher letztendlich zu Wasser reagiert (Kadenbach 2003). Die dabei freiwerdende Energie wird für die Produktion von ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) genutzt (Pedersen and Amzel 1993).

Einleitung

Die Glykolyse findet im Zytosol in 10 Einzelschritten statt. Dabei wird ein Molekül Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut, die dabei freiwerdende Energie wird zur Gewinnung von ATP genutzt (Pelicano et al. 2006).

Je nach Sauerstoffgehalt gibt es zwei mögliche Wege zum weiteren Abbau des Pyruvats. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat über die Laktatdehydrogenase zu Laktat abgebaut, während unter aeroben Bedingungen Acetyl-CoA entstehen kann, welches anschließend zu CO₂ oxidiert wird (Pelicano et al. 2006; Shaw 2006).

Die Beobachtung von O. Warburg, dass viele Tumore eine erhöhte Glykolyse und einen gesteigerten Laktat-Metabolismus besitzen, konnte auch in späteren Studien bestätigt werden (Pedersen 2007; Yeung et al. 2008). Demnach konnte man feststellen, dass in 70 % aller Krebszellen Gene, die im Zusammenhang mit der Glykolyse stehen, überexprimiert werden und auch eine erhöhte Glukoseaufnahme gemessen werden konnte (Altenberg and Greulich 2004). Dieses Phänomen scheint eine Konsequenz aus Defekten der zellulären Atmung, onkogenen Veränderungen und der Überexpression von glykolytischen Enzymen und metabolischen Transportern zu sein (DeBerardinis 2008). Bedeutend ist dabei die Feststellung, dass die Laktatkonzentration positiv korreliert mit Radioresistenz (Sattler et al. 2010). Es wird vermutet, dass die Korrelation daher zustande kommt, dass Laktat eine antioxidative Funktion besitzt (Groussard et al. 2000).

Wie O. Warburg bereits in den 1920er Jahren beobachtete und 1956 publizierte, zeichnen sich Krebszellen durch ein hohes Maß an Milchsäuregärung auch unter aeroben Bedingungen aus, während sie kaum mitochondriale oxidative Phosphorylierung zeigen (Warburg 1956a; Pedersen 2007; Yeung et al. 2008). Dabei ist der Metabolismus in Krebszellen von bestimmten Schlüsselproteinen, wie TP53 oder HIF-1 abhängig (Bensaad and Vousden 2007; Yeung et al. 2008). TP53 stellt dabei einen positiven Regulator der oxidativen Phosphorylierung durch die Transkription des „Synthesis of Cytochrome-c-Oxidase“-Proteins (SCO2), einem Mitglied der COX-2 Montagefaktoren, dar und gleichzeitig hat TP53 einen negativen Einfluss auf die Glykolyse über die Aktivierung von TIGAR, einem Inhibitor der Fruktose-2,6-biphosphate (Matoba et al. 2006; Bensaad and Vousden 2007; Yeung et al. 2008; Olovnikov et al. 2009).

Es konnte auch mittlerweile gezeigt werden, dass der Verlust von TP53 die Milchsäuregärung in Krebszellen fördert und dies wiederum steht in Verbindung mit einer höheren Aggressivität und Metastasierungswahrscheinlichkeit von Tumoren (Olovnikov et al. 2009; Salminen and Kaarniranta 2010).

Einleitung

TP53 bindet direkt an den SCO2-Promotor und erhöht dadurch dessen Transkription und das SCO2-Proteinlevel. SCO2 wiederum ist notwendig für den Zusammenbau des COX-Komplexes, welcher ein Protein der inneren mitochondrialen Membran darstellt, das aus 13 Untereinheiten besteht (Glerum et al. 1996; Matoba et al. 2006). Es existieren zwei bekannte SCO-Proteine: SCO1 und SCO2. SCO2 liegt vorgeschaltet vor SCO1 und ist zwingend erforderlich für die COX-2-Synthese (Leary et al. 2004; Leary et al. 2009). Mutationen in SCO1 und SCO2 führen zu einer schlechten Formation von COX und dadurch zu einem Funktionsausfall der mitochondrialen Atmung. SCO2-Mutationen verursachen daher gravierende neonatale Defekte (Salviati et al. 2002; Tarnopolsky et al. 2004).

Der Effekt von TP53 auf den zellulären Metabolismus konnte in weiteren Studien in Verbindung mit der Zellalterung gebracht werden. In Krebszellen agiert das TP53-Signalmolekül AMPK (AMP-activated protein kinase) als ein Energiesensor und steigert die Glykolyse (Towler and Hardie 2007; Demidenko et al. 2010). Zudem ist AMPK in der Lage TP53 in einem Feed-back-Loop zu aktivieren, was wiederum das zelluläre Überleben und Altern fördert (Jones et al. 2005).

AMPK ist ein Sensor des zellulären Energiestatus und lässt sich in allen eukaryotischen Zellen nachweisen. Bei Anstieg des AMP:ATP-Verhältnisses wird AMPK durch Phosphorylierung aktiviert. Anschließend ist AMPK in der Lage, energieerzeugende Prozesse (Glukoseaufnahme, Metabolismus etc.) zu aktivieren und gleichzeitig sehr energieverbrauchende Prozesse wie Biosynthese, Zellwachstum und Proliferation zu stoppen (Towler and Hardie 2007).

Zudem gibt es eine Verbindung zwischen AMPK und der Regulation der Autophagie (Huang and Snider 1995; Wang et al. 2001).

Als Initiatorprotein der Autophagie ist AMPK bekannt. AMPK wird bei ATP-Mangel oder Umweltstress phosphoryliert und ist danach in der Lage ULK1 (unc-51-like-kinase 1) durch Phosphorylierung zu aktivieren. ULK1 ist notwendig für die Autophagie-Induktion und es konnte gezeigt werden, dass ULK1-defiziente Mäuse einen gestörten Abbau von Mitochondrien während der Retikulozytenreifung zeigten (Kundu et al. 2008), was für eine spezifische Rolle von ULK1 in der selektiven Aufnahme von Mitochondrien (Mitophagie) spricht.

Die Aktivierung von ULK1 führt zur Phosphorylierung von Atg13, was eine Translokation von Atg13 zu depolarisierten Mitochondrien verursacht (Joo et al. 2011). Die Erzeugung einer nicht-phosphorylierbaren Mutante von Atg13 verhinderte die selektive Beseitigung von

Einleitung

defekten Mitochondrien, hatte aber keinen Einfluss auf die basale Autophagie durch Energiemangel (Joo et al. 2011).

Einleitung

1.4 Zielsetzung

Ein bedeutendes Problem der Strahlentherapie bei Krebspatienten sind die Nebenwirkungen im umliegenden gesunden Gewebe. Diese stellen auch einen limitierenden Faktor für die Strahlendosis dar. Wäre es möglich, diese Nebenwirkungen deutlich zu reduzieren, könnte man sowohl die Lebensqualität der Patienten als auch die Effektivität der Strahlentherapie deutlich verbessern.

Vor einigen Jahren wurde ein potentieller Radioprotektor O-Phospho-L-Tyrosin (pTyr) entdeckt, der bereits in Vorversuchen gute und zielgerichtete Schutzwirkung auf gesunde Zellen zeigte. Es stellte sich heraus, dass der positive Effekt einer pTyr-Vorbehandlung auf Zellen vor einer Bestrahlung vom Vorhandensein des TP53-Wildtyp-Proteins abhängig ist. Da TP53 in den meisten Tumoren mutiert ist, ist dieser Zusammenhang bedeutend für eine selektive Protektion.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die Signalwege und die intrazellulären Effekte von pTyr näher zu untersuchen. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. Kann die bisherige Vorbehandlungszeit von 16 Stunden verkürzt werden, ohne die protektive Wirkung von pTyr auf die Zellen herabzusetzen?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Effekt von pTyr auf das klonogene Überleben von TP53-Wildtypzellen und der Akkumulation des AhR im Zellkern?
3. Welchen Einfluss hat pTyr auf die DNA-Reparatur und DNA-Struktur?
4. Beeinflusst pTyr den Energiestoffwechsel der Zelle im Vorfeld einer Bestrahlung und wie nimmt dieser Effekt Einfluss auf die DNA-Reparatur?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Zellkulturmedien

Für die Versuche wurden folgende Zelllinien verwendet:

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
A549	Lungenkarzinom (human)	ATCC, CCL 185
FaDu	Plattenepithelkarzinom (human)	ATCC; HTB-43
HSF7	Hautfibroblasten (human)	Unser Labor
A549PON-P53-wt/-mut	Lungenkarzinom (human)	(Dittmann et al. 2003)
A549-AhR-SH	Lungenkarzinom (human)	Diese Arbeit Siehe 2.2.7

Zur Kultivierung aller verwendeten Zelllinien wurde „Dullbeco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) von Gibco verwendet. Dieses wurde ergänzt durch 44 mM NaHCO₃ (Biochrom AG) und 10 % fötales Kälberserum (FCS) von PAN Biotech GmbH, sowie 1 % Penicillin und Streptomycin (Gibco).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Nitrocellulose Membran (Optitran)	Whatman, GE Healthcare
Whatman Papier	Whatman, GE Healthcare
96 well Platten	Greiner
Röntgen Filme	AGFA
Sterile Filtertips	Biozym
Zellkulturwaren	BD Falcon

Material und Methoden

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich, Merck, Roth, Applichem, Serva, BioRad, Amersham Biosciences oder Pharmacia Biotech.

Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Produkt	Firma
ECL-Detection Kit	GE Healthcare
Proteinbestimmungs-kit	Bio-Rad
Proteaseinhibitoren complete	Roche
Phosphataseinhibitor-Cocktail III	Sigma-Aldrich
Protein-A-Sepharose	AmershamBiosciences
Geneticin	Invitrogen
Hexadimetrine Bromid	Sigma-Aldrich
Puromycin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich
Trypsin (10x)	Sigma-Aldrich
Ponceau S-Färbelösung	Sigma
BSA	Roth
Protein Standard für SDS-Gele (Kaleidoscope)	Bio-Rad
Scintillator	Packard
Entwickler/ Fixierer (Western-Blot)	Agfa

2.1.4 Radiochemikalien

D-Glukose, [2- ³ H(N)]	21,2Ci/ mmol	Hartmann Analytic
Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) [acetyl- ³ H]	13,1 Ci/mmol	Hartmann Analytic

2.1.5 Geräte

Tab. 2.4: Auflistung der für die Arbeiten verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifugen	Hettich
Tank-Blot-Apparatur	Peqlab
Gelelektrophorese-Kammer	Amersham
Röntgenbestrahlungseinheit (RS-225)	Gulmay

Material und Methoden

Elisa-Reader	Anthos labtec
Beta-Counter	Wallac
Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Modell: FACSCalibur
Netzgerät für Gelelektrophorese	Gibco BRL
Entwicklungsmaschine	Agfa
Medien-Pumpe	KNF Neuberger
Brutschränke	Binder

2.1.6 Lösungen und Puffer

Waschpuffer (für Western-Blot):

13,7 mM NaCl
2,7 mM KCl
80,9 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
0,1 % Tween 20
pH 7,4 (durch HCl)

PBS:

13,7 mM NaCl
2,7 mM KCl
80,9 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,4 (durch HCl)

Stripping Puffer:

0,2 M Glycerin
0,1 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
1,0 % Tween 20
pH 2,2 (durch HCl)

Trenngelbuffer (100 ml):

36,34 g Tris Base
0,8 g SDS
pH 8,8 (durch HCl)

Sammelgelpuffer (100 ml):

12,12 g Tris Base

Material und Methoden

	0,8 g SDS pH 6,8 (durch HCl)
Laufpuffer (5 L) :	30 g Tris Base 144 g Glycin 5 g SDS
Transfer-Puffer (8 L) :	46,4 g Tris Base 23,2 g Glycin 2,96 g SDS 1,6 L Methanol
SDS-Ladepuffer (2x, 100 ml):	20 ml Glycerol 2 g SDS 10 mg Bromphenolblau 25 ml Sammelgelpuffer 5 ml β -Mercaptoethanol
Lyse-Puffer (100 ml):	1 % NP40 0,87 g NaCl 0,6 g Tris Base pH 8,0 (durch HCl)
Kernextraktionspuffer/ Lösung A (10 ml):	100 μ l 1M Hapes (pH 7,9) 40 μ l KCl (2,5 M) 2 μ l EDTA (0,5 M) 10 μ l EGTA (0,1 M) + 100 μ l Phosphatasecocktail III + 1/2 Tablette Complete Mini Proteaseinhibitor
Coomassie-Blau-Färbelösung (500 ml):	0,25 g CoomassieR 20 % Methanol 7,5 % Eisessig

2.1.7 Detergenzien und SH-RNA

Tab. 2.5: Liste der verwendeten Detergenzien und SH-RNA

Name	Beschreibung	Endkonzentration	Lösungsmittel	Firma
Phloridzin	SGLT1-Inhibitor	500 μ M	DMSO	Sigma- Aldrich
AhR-SH (Klon 4-1)	Sequenz: CCGGCGGCATAGAGACCGACTTAATCTCGAGATTAAGTCGGTCTCTATG CCGTTTTT			Sigma- Aldrich
Phosphotyrosin (pTyr)		10 μ M	H ₂ O	Sigma- Aldrich
Ponasteron A	Aktivierung des Ponasteron-induzierbaren Plasmids in A549PON-Zellen	5 μ M	Ethanol	Invitrogen

Bei Verwendung von Substanzen, die in DMSO oder Ethanol gelöst werden, wurden die Kontrollen entsprechend mit der gleichen Konzentration des Lösungsmittels behandelt (Vehikel).

2.1.8 Primäre Antikörper

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Primär-Antikörper

Name des Primär-Antikörpers	Beschreibung	Hersteller
EGFR	Maus, monoklonal	BD Falcon
Lamin B1	Kaninchen, monoklonal	Abcam
Aktin	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich
Ah-Rezeptor	Maus, monoklonal	Abcam
Pan Histon H3 (D1H2)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling
Histon H3 (K9/ S10)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
p 21 (12D1)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling
Pan P300	Maus, monoklonal	Santa Cruz
P300 (Lys 1499)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling

Material und Methoden

Tip60 (C-7)	Maus, monoklonal	Santa Cruz
COX2	Maus, monoklonal	Santa Cruz
SCO2	Kaninchen, polyklonal	Abnova
SGLT-1 (H-85)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
AMPK	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
pAMPK	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling

2.1.9 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.7: Übersicht der verwendeten Sekundär-Antikörper

Sekundärer Antikörper	Herkunft	Hersteller
Anti-Maus-IgG	Schaf	GE-Healthcare
Anti-Kaninchen-IgG	Esel	GE-Healthcare

2.1.10 Kits

Tab. 2.8: Übersicht der verwendeten Kits

Name	Beschreibung	Firma
ATP Assay Kit	Nachweis der ATP-Konzentration	Abnova
HAT Assay Reagent Kit	Messung der Histonacetyltransferase-Aktivität von Tip60	Millipore
Mission Lentiviral Transduction Particles	Kit zur Herstellung der A549-AhR-SH Zelllinie	Sigma-Aldrich

2.1.11 Farbstoffe für Durchflusszytometer (FACS)

Tab. 2.9: Liste der verwendeten FACS-Farbstoffe

Name	Beschreibung	Firma
MitoTracker Green FM	Nachweis der relativen Mitochondrienzahl	Invitrogen
TMRE	Messung des Mitochondrienpotentials	Roth

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in wasserdampfgesättigten Brutschränken der Firma Binder bei 37 °C und 7 % CO₂ kultiviert.

Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet, die sich in der konfluenten Wachstumsphase befanden und die humane Hautfibroblasten Zelllinie HSF7 wurde maximal bis zu einer CPD von 20 verwendet.

2.2.2 Bestrahlung

Für die Röntgenbestrahlung der Zellen wurde der Röntgengenerator R225 der Firma Gulmay (200 kV, 15 mA) mit einer Dosisleistung von 1 Gray pro Minute verwendet.

Um unerwünschte Quench-Effekte zu reduzieren, wurde ein 0,5 mm starker Kupferfilter zusätzlich verwendet. Der Filter wurde benutzt, um niederenergetische Photonen herauszufiltern, die unerwünschte biologische Effekte haben.

2.2.3 Koloniebildungstest (klonogenes Überleben)

2.2.3.1 Koloniebildungstest mit stationären Zellen

Zum Nachweis des klonogenen Überlebens der Zelllinien nach Röntgenbestrahlung und/ oder Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen wurden konfluente Zellen behandelt und mit 0, 1, 2 oder 4 Gray bestrahlt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die Zellen zu je 500 Zellen auf Ø 100 mm Zellkulturschalen (3 Platten pro Bedingung) mit 20 % FCS ausgesät und 10 Tage kultiviert.

Anschließend wurden die gewachsenen Klone mit 70 % Ethanol für 10 Minuten fixiert und mit Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt. Nach 15 Minuten wurde die Färbelösung wieder entfernt und die Platten mit Wasser gewaschen.

Unter dem Binokular wurden alle Kolonien (> 50 Einzel-Zellen) pro Platte ausgezählt und das dosisabhängige klonogene Überleben mittels einer halblogarithmisch aufgetragenen Überlebenskurve dargestellt.

2.2.3.2 Koloniebildungstest mit log-Phase Zellen

Zum Nachweis des klonogenen Überlebens von wachsenden Zellen nach Röntgenbestrahlung und/ oder Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen wurden die Zellen 24 Stunden vor Behandlung bzw. Bestrahlung zu je 500 Zellen auf Ø 100mm Zellkulturschalen (3 Platten pro Bedingung) mit 20 % FCS ausgesät. Nach entsprechenden Behandlungen und anschließender

Material und Methoden

Bestrahlung mit 0, 1, 2 oder 4 Gray wurden die Zellen für 10 Tage kultiviert und dann identisch zum Koloniebildungstest mit stationären Zellen fixiert und ausgewertet.

2.2.4 Proteinaufbereitung

2.2.4.1 Aufbereitung von Gesamt-Proteinlysaten

Konfluente Zellen wurden in der Zellkulturschale mit kaltem PBS gewaschen und zusammen mit 500 µl Lyse-Puffer mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellsuspensionen mithilfe einer kurzen Ultraschallbehandlung lysiert, bei 20.000 g zentrifugiert und die Proteinmenge im Überstand quantifiziert.

Zur Bestimmung der Proteinmenge jeder Probe wurde der BioRad Proteinquantifizierungs-Kit und als Konzentrationsstandard BSA verwendet.

2.2.4.2 Aufbereitung der Kern- und cytoplasmatischen Proteinfraktion

Konfluente Zellen wurden in der Zellkulturschale mit kaltem PBS gewaschen und zusammen mit 400 µl Kernextraktionspuffer mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C wonach den Lysaten 25 µl 10 % iges NP40 zugefügt und alle Proben 10 Sekunden gemischt wurden. Danach wurden die Zellen bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Beim Überstand handelt es sich um die cytoplasmatische Proteinfraktion.

Das Pellet wird dreimal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in 60 µl Kernextraktionspuffer mithilfe einer kurzen Ultraschallbehandlung lysiert und bei 14.000 rpm zentrifugiert. Beim Überstand dieser Fraktion handelt es sich um die Kern-Proteinfraktion.

Für die Kern- und Cytoplasma-Proteinfraktion wurde eine Proteinquantifizierung mit dem BioRad Proteinquantifizierungs-Kit durchgeführt und als Konzentrationsstandard BSA verwendet.

Pro Probe wurden 100 µg Protein für Western-Blot-Analysen und 2000-4000 µg für Immunopräzipitationen verwendet.

2.2.5 Western-Blot

Die quantitative Auftrennung der Proteine erfolgte mithilfe einer SDS-Page (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Die Proteinproben wurden mit der entsprechenden Menge SDS-Ladepuffer gemischt, 5 Minuten bei 100 °C im Wasserbad gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte dann bei 0,1 mA/cm² Gel (Sambrook and Russell 2006). Zur Immunodetektion wurden die Proteine anschließend auf eine Nitrozellulosemembran bei 5,7 mA/cm² und 24 V in einem Tankblot über Nacht transferiert.

Mithilfe einer Ponceau S-Färbelösung wurde die Effektivität der Proteinüberführung überprüft und anschließend die Membran in 3 % BSA-Lösung für eine Stunde abgesättigt.

Für den Proteinnachweis wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit den Primär-Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper-Protein-Bindung wurde durch eine Chemolumineszenzreaktion (ECL-Detection Kit) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.2.6 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden 2000-4000 µg Gesamtprotein (siehe 2.2.4.1) in 600 µl Probenvolumen zusammen mit 5 µl des immunopräzipitierenden Antikörpers für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 60 µl einer 50 % igen Protein-A-Sepharose-Lösung zugegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C erneut inkubiert.

Die Präzipitate wurden danach dreimal mit PBS gewaschen, in 60 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 100 °C im Wasserbad gekocht.

Die Auftrennung der Proteine und deren Nachweis wurde mittels SDS-Page durchgeführt, wie unter 2.2.5 beschrieben.

2.2.7 Transduktion von Zellen mit Lentiviren

Die Herstellung der A549-AhR-SH-Zellen erfolgte mittels Transduktion durch Lentiviren. Die Transduktion wurde anhand des Protokolls von Sigma-Aldrich „MISSION[®] Lentiviral Transduction Particles“ durchgeführt. Dabei wurde eine MOI (Multiplicity of Infection) von 5 und eine Puromycinkonzentration von 1 µg/ml verwendet.

Alle Puromycin-resistenten Klone (insgesamt 12) wurden anschließend auf ihre AhR-Konzentration im Kern mithilfe eines Western-Blots getestet. Die zwei Klone (4-1 und 4-2),

Material und Methoden

die bei der ersten Testung die potentiell niedrigsten AhR-Konzentrationen aufwiesen, wurden danach erneut im Direktvergleich zum A549-Wildtyp und den A549-Leervektor-Zellen auf einem Western-Blot betrachtet.

2.2.8 Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$

Mithilfe des Farbstoffs TMRE (Tetramethylrhodamin-Ethyl-Ester) kann eine Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ von Zellen vorgenommen werden.

TMRE ist ein positiv geladener, rotoranger Farbstoff, der einfach in aktiven Mitochondrien, aufgrund deren negativer Ladung, akkumulieren kann. Der Farbstoff wird durch den Laser im Durchflusszytometer angeregt und emittiert daraufhin Licht. Die Intensität des Signals verkleinert sich mit der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials.

Für die Messung wurden die Zellen mithilfe von Trypsin von den Kulturschalen gelöst, abzentrifugiert (500 x g, 5 Minuten) und dann in einer 25 nM TMRE-Lösung (TMRE in PBS) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden die Messungen im Durchflusszytometer durchgeführt.

Als Positivkontrolle für einen vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, wurden die Zellen mit CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon) behandelt. Es wurde jeweils eine Probe exemplarisch mit 1 μ M CCCP für 15 Minuten inkubiert.

2.2.9 Messung der Mitochondrienzahl

Für die Messung der Mitochondrienzahl von Zellen wurde der Farbstoff MitoTracker Green FM (Invitrogen) verwendet. Der Farbstoff diffundiert über die Plasmamembran und akkumuliert in den Mitochondrien.

Für die Messung wurden konfluente Zellen nach dem jeweiligen Protokoll behandelt und/oder bestrahlt. Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte nach dem Protokoll „MitoTracker[®] Mitochondrion-Selective Probes“ (Invitrogen). Die Färbung der Zellen mit dem Farbstoff MitoTracker Green FM erfolgte nach der Fixierung der Zellen mit 60 % igem Ethanol für 30 Minuten.

Die abschließende Messung der Mitochondrienzahl aufgrund der Intensität des MitoTracker Green FM-Farbstoffs erfolgte mithilfe eines Durchflusszytometers.

2.2.10 Messung der ATP-Konzentration

Für die Messung der ATP-Konzentration wurden die konfluenten Zellen je nach Protokoll behandelt und/ oder bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in der Zellkulturschale kurz mit kaltem PBS gewaschen und dann mithilfe eines Zellschabers in 250 µl ATP-Puffer (Abnova, Catalog Nr. KA0806) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff kurz eingefroren. Die Abtrennung von größeren Proteinen aus dem Zelllysate erfolgte durch Centriconsäulen in der Zentrifuge bei 14.000 x g. Die anschließende Messung wurde anhand des Protokolls des Abnova „ATP Assay Kits“ vorgenommen.

Alle Messwerte jedes Versuchs wurden auf relative Werte umgerechnet, wobei der Messwert der unbehandelten und unbestrahlten Probe immer auf 1 gesetzt wurde.

2.2.11 Messung der Glukoseaufnahme

Zur Messung der Glukoseaufnahme wurde das Wachstumsmedium (DMEM mit 10 % FCS und 4,5 g Glukose) der Zellen drei Tage nach Aussaat gegen ein Wachstumsmedium mit reduziertem Glukosegehalt gewechselt (DMEM mit 10 % FCS und 0,5 g Glukose) und die Zellen weitere drei Tage kultiviert.

Danach wurden die Zellen immer zeitgleich mit pTyr (10 µM) und ³H-D-Glukose (1 µCi/ ml, 2,77 mM D-Glukose) behandelt. Nach entsprechender weiterer Inkubationszeit bei 37 °C und 7 % CO₂ wurde die Glukoseaufnahme durch dreimaliges Waschen mit kaltem PBS gestoppt. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe von 1 mM NaOH.

Anschließend erfolgte die Messung der von den Zellen aufgenommenen Glukose mittels eines Beta-Counters.

2.2.12 Messung der Histon-Acetyltransferaseaktivität von Tip60

Für die Messung wurden konfluente Zellen nach dem jeweiligen Protokoll behandelt und/ oder bestrahlt.

Für die Immunopräzipitation von Tip60 wurden 2000 µg Gesamtprotein (siehe 2.2.4.1) in 600 µl Probenvolumen zusammen mit je 5 µl Tip60-Antikörper für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 60 µl einer 50 % Protein-A-Sepharose-Lösung zugegeben und die Proben für eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Präzipitate wurden danach dreimal mit PBS gewaschen und in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem „HAT Assay Reagent Kit Protokoll“ der Firma Millipore.

2.2.13 Densitometrische Auswertung und Statistik

Für die densitometrische Auswertung von Western-Blots wurde die Software von Scion image (ImageJ) verwendet.

Die statistischen Auswertungen zum Vergleich zweier unabhängiger Datenreihen mit jeweils mindestens drei unabhängigen Messwerten wurden mittels „student’s t-test“ durchgeführt.

Dabei wurden p-Werte, die kleiner waren als 0,05 ($p < 0,05$) als statistisch signifikant bewertet. Zudem werden in den Grafiken alle Messwerte +/- Standardfehler (SE) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Phosphotyrosin (pTyr) induziert einen radioprotektiven Effekt in TP53-Wildtyp-Zellen in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass eine Präinkubation mit 10 μM pTyr über einen Zeitraum von 16 Stunden zu einer Radioprotektion von TP53-Wildtypzellen im klonogenen Überleben führt (Dittmann et al. 2001b).

Um zu überprüfen, ob eine kürzere Behandlung als 16 Stunden mit pTyr in den TP53-Wildtypzellen A549 ausreicht, um eine signifikante Radioprotektion der Zellen zu erreichen, wurden Koloniebildungstests mit Zellen durchgeführt, die 1, 3, 6 oder 16 Stunden mit 10 μM pTyr vor Bestrahlung (mit 0, 1, 2 oder 4 Gray) behandelt wurden.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigen A549-Zellen nur einen radioprotektiven Effekt nach einer 16-stündigen pTyr-Vorbehandlung. Bei kürzeren Vorbehandlungszeiten (1, 3 oder 6 Stunden) konnte hingegen kein signifikanter radioprotektiver Effekt gezeigt werden (Abb. 3.1).

Ergebnisse

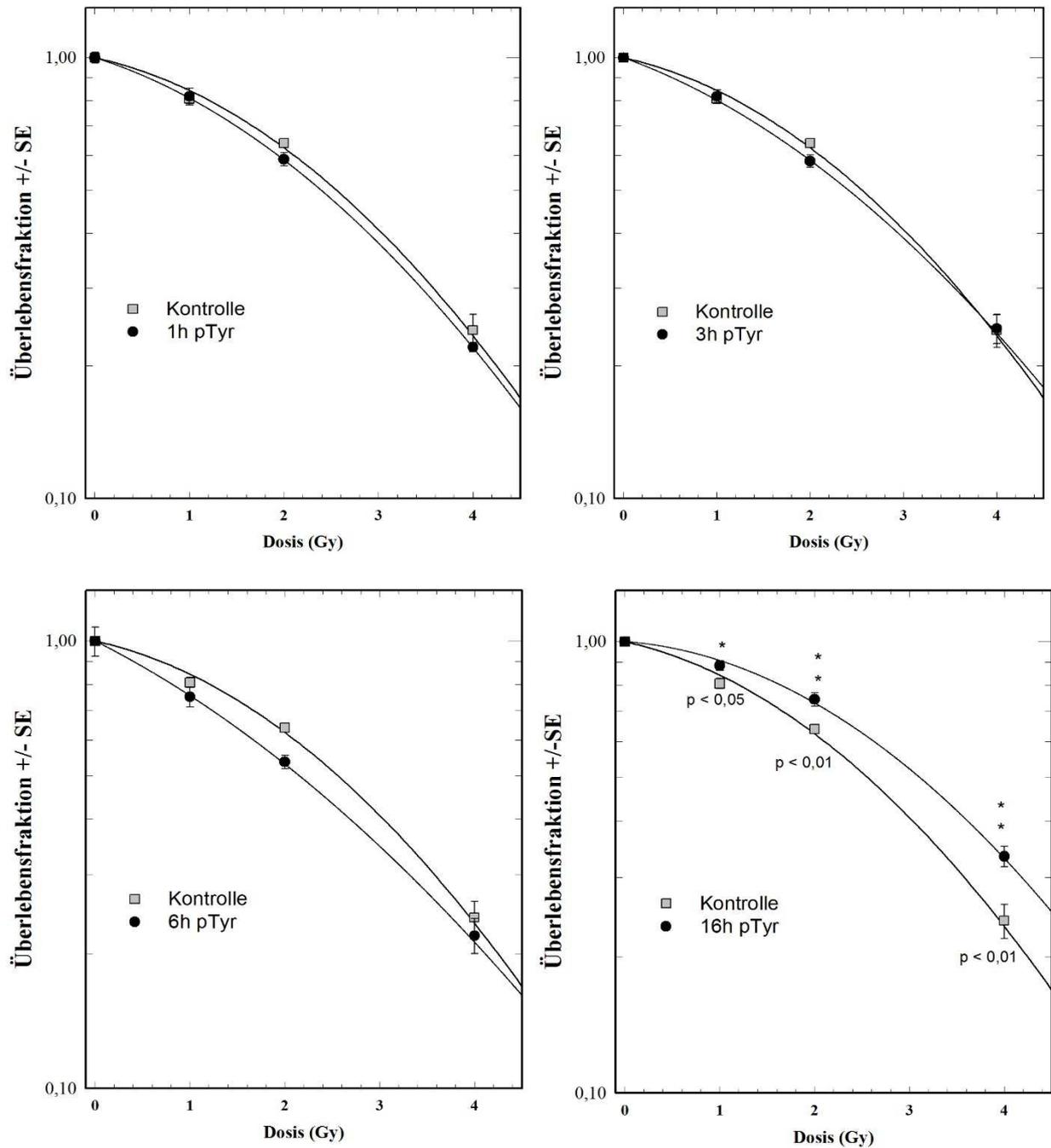


Abb. 3.1: Koloniebildungstest mit Einzeldosisbestrahlung nach unterschiedlich langen pTyr-Präinkubationszeiten in A549-Zellen (wt TP53)

Klonbildungsrate nach Bestrahlung mit 0, 1, 2 und 4 Gy und einer Präinkubation mit 10 μ M pTyr. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit pTyr vorbehandelt und nach entsprechender Inkubationszeit bestrahlt. Nach 10 Tagen wurden die Klone (> 50 Zellen) quantifiziert.

Jeder Wert entspricht dem Mittelwert (+/- SE) aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallelen Ansätzen.

3.2 Abhängigkeit des radioprotektiven Effekts von pTyr auf TP53-Wildtyp-Zellen von der Akkumulation des Ah-Rezeptors

Bereits 2007 konnten Dittmann et al. zeigen, dass es durch eine Behandlung von TP53-Wildtyp-Zellen mit pTyr zur Akkumulation des EGFR im Zellkern kommt. Diese Akkumulation ist zwingend erforderlich für den radioprotektiven Effekt von pTyr. Wird die EGFR-Akkumulation durch Zugabe des EGFR-Inhibitors Cetuximab verhindert, kommt es zu keiner Radioprotektion der Zellen.

Für die Akkumulation im Zellkern wird der EGFR zuvor an der Zellmembran phosphoryliert und wandert danach in den Zellkern (Dittmann et al. 2010). Hierdurch stellte sich die Frage, wie pTyr die Phosphorylierung des EGFR und dadurch die Akkumulation im Zellkern begünstigen kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) über verschiedene Zwischenschritte einen Einfluss auf die cytoplasmatische Aktivierung des EGFR ausüben kann (Kahl et al. 1980; Lombardo et al. 1995; Kohle et al. 1999).

Der AhR ist ein durch Liganden aktivierbarer Transkriptionsfaktor (Poland et al. 1976a). Es ist bekannt, dass auch der AhR nach Aktivierung, beispielsweise durch Bestrahlung oder zellulären Stress, einer Translokation in den Zellkern unterliegt (Levine and Perdew 2001). Außerdem stehen AhR und EGFR im Zusammenhang mit dem Zellüberleben und der DNA-Reparatur nach Bestrahlung (Rothmund 2010). Dies führte zur Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen dem radioprotektiven Effekt von pTyr und dem AhR vorhanden sein könnte.

Um zu untersuchen, ob es zu einer Komplexbildung zwischen dem EGFR und dem AhR nach ionisierender Strahlung oder pTyr-Präinkubation gibt, wurde eine Immunopräzipitation (IP) des AhR aus Gesamtlisat von A549-Zellen durchgeführt.

In der IP zeigte sich, dass es sowohl nach Bestrahlung als auch nach pTyr-Präinkubation zu einem Anstieg der Komplexbildung zwischen AhR und EGFR kommt (Abb. 3.2). Wobei die Komplexbildungseffizienz nach pTyr-Vorbehandlung effektiver zu sein scheint.

Ergebnisse

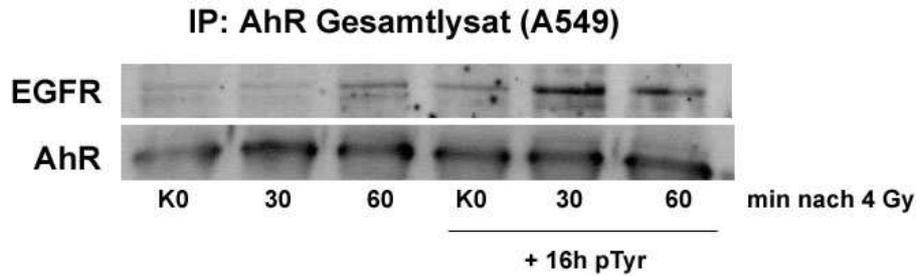


Abb. 3.2: pTyr- und Strahlungseffekte auf die Bindung zwischen EGFR und AhR

A549-Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt und/ oder 16 Stunden mit pTyr vorbehandelt. Der AhR wurde anschließend in Zellen immunopräzipitiert und über SDS-Page analysiert.

Gezeigt ist ein Blot von 3 unabhängigen Blots, die alle die gleiche Tendenz aufwiesen.

3.2.1 Stabilisierung der nukleären AhR-Proteinmenge nach pTyr-Vorbehandlung

Da in der IP eine Komplexbildung zwischen AhR und EGFR in Zusammenhang mit ionisierender Strahlung, als auch mit pTyr-Präinkubation festgestellt wurde, sollte die Akkumulation von AhR und EGFR im Zellkern nach pTyr-Präinkubation näher untersucht werden.

Für alle Western-Blot-Analysen dieser Arbeit wurden konfluente (stationäre) Zellen verwendet, da man dadurch zum einen immer gleiche Versuchsvoraussetzungen (alle Zellen in G0-Phase) gegeben hatte und zum anderen der stationäre Zustand dem der meisten gesunden Zellen des ausgewachsenen Menschen entspricht.

Um den Zusammenhang zwischen der Akkumulation des EGFR und AhR im Zellkern nach pTyr näher zu betrachten, wurden Western-Blot-Analysen der kernständigen Proteinfraktion in A549-Zellen nach 1, 3, 6 und 16 Stunden pTyr-Inkubation durchgeführt.

Nach pTyr-Inkubation von A549-Zellen kommt es bereits nach einer Stunde zu einer erhöhten Akkumulation des EGFR und AhR in der Kernfraktion (Abb. 3.3). Nach 16 Stunden pTyr-Präinkubationszeit wurde die größte signifikante Menge an AhR im Zellkern nachgewiesen ($p_{16} = 0,02$). Beim EGFR lag die maximal akkumulierte Proteinmenge im Zellkern bereits nach drei bzw. sechs Stunden vor.

Ergebnisse

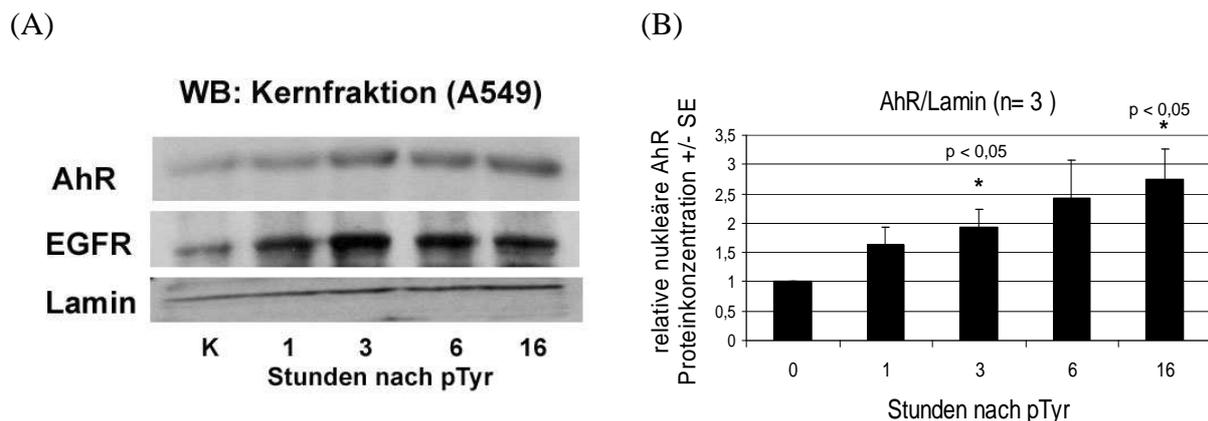


Abb. 3.3: Nukleäre EGFR- und AhR-Akkumulation in A549 (TP53 wt) Zellen nach pTyr-Präinkubation.

(A) A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 10 μ M pTyr behandelt und nach entsprechender Inkubationszeit die Proteine der Kernfraktion isoliert und im Western-Blot analysiert.

(B) Densitometrische Auswertung entspricht den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen +/- Standardfehler (SE). Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Laminkontrolle und anschließend auf den Kontrollwert normiert.

3.2.2. Herstellung von A549 SH-AhR-Zellen (AhR-knockdown)

Durch die Beobachtung, dass der AhR nach pTyr-Behandlung im Zellkern akkumuliert, stellte sich die Frage, ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Effekt von pTyr auf das Überleben nach Bestrahlung und der Akkumulation des AhR im Zellkern vorliegt.

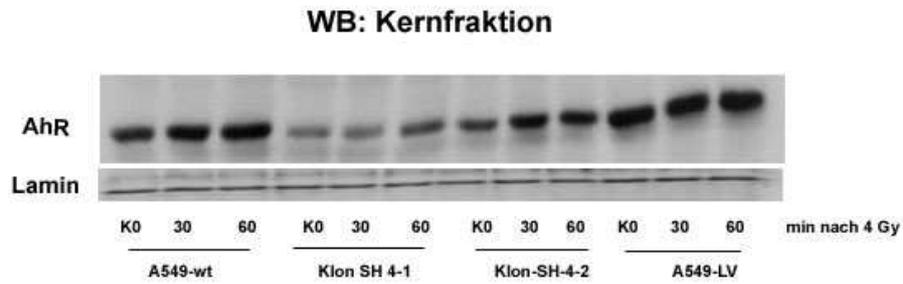
Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem radioprotektiven Effekt von pTyr und dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor wurde die AhR-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) reduziert.

Fünf unterschiedliche shRNA-Sequenzen zur RNAi-vermittelten Degradation von AhR-mRNA-Fragmenten wurden mithilfe von Lentiviren in A549-Zellen transduziert und daraus 12 Klone isoliert. Von diesen erzeugten Klonen wurden die Klone 4-1 und 4-2, die in ersten Testungen die niedrigsten AhR-Level zeigten, noch einmal im Direktvergleich zum A549-Wildtyp (A549-wt) und dem A549-Leervektor-Klon (A549-LV), sowohl nach Bestrahlung mit 4 Gray als auch unbestrahlt, getestet.

Dabei stellte sich heraus, dass der Klon 4-1 die größte AhR-Reduktion im Zellkern zeigte und wurde daher als A549-AhR-SH-Stamm für nachfolgende Experimente ausgewählt (Abb. 3.4).

Ergebnisse

(A)



(B)

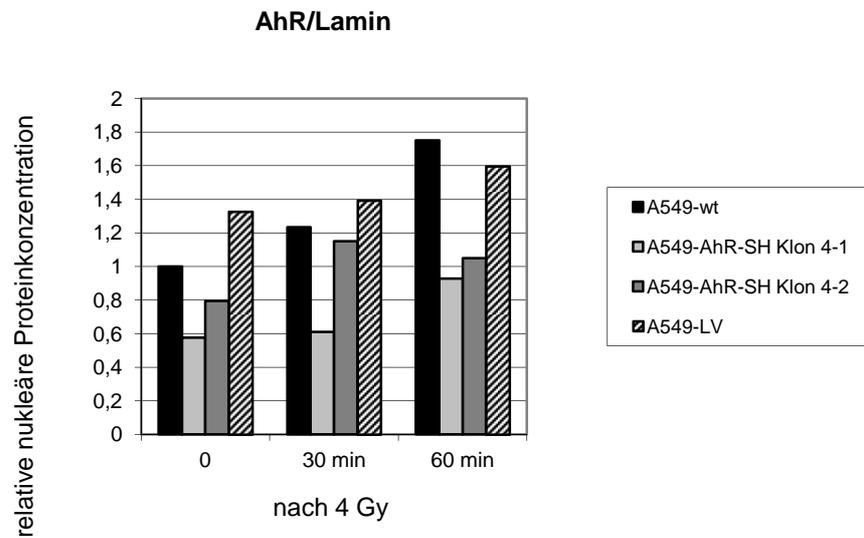


Abb. 3.4: Auswahlverfahren der transduzierten A549-Zellen zur Reduktion der AhR-Proteinkonzentration im Zellkern

(A) Die Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 4 Gy bestrahlt und nach entsprechender Inkubationszeit die Proteine der Kernfraktion isoliert und im Western-Blot analysiert.

(B) Densitometrische Auswertung der AhR-Proteinmenge im Zellkern der verschiedenen Zelllinien. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Laminkontrolle und anschließend auf den Kontrollwert normiert.

3.2.3 Einfluss einer AhR-Reduktion durch shRNA auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung

Zur näheren Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der Akkumulation des AhR im Zellkern nach pTyr-Präinkubation und dem pTyr-induzierten radioprotektiven Effekt wurde der Effekt der pTyr-Behandlung auf die A549-AhR-SH-Zellen im klonogenen Überleben im Vergleich zum A549-LV-Stamm überprüft.

Hierfür wurden die Zellen in der stationären Wachstumsphase mit 10 μ M pTyr für 16 Stunden vorbehandelt und anschließend mit 0, 1, 2 oder 4 Gray bestrahlt. Nach 6 Stunden erfolgte dann die Aussaat von je 500 Zellen pro Kulturplatte. Nach weiteren zehn Tagen wurden die Klone (> 50 Zellen) quantifiziert.

Die Versuchsansätze zeigten, dass der radioprotektive Effekt von pTyr durch die AhR-Reduktion in den A549-AhR-SH-Zellen nicht aufgehoben werden konnte (Abb. 3.5 A), es aber zu einer signifikanten Radiosensitivierung durch den AhR-knockdown im Vergleich zu den A549-LV-Zellen kommt (Abb. 3.5 B).

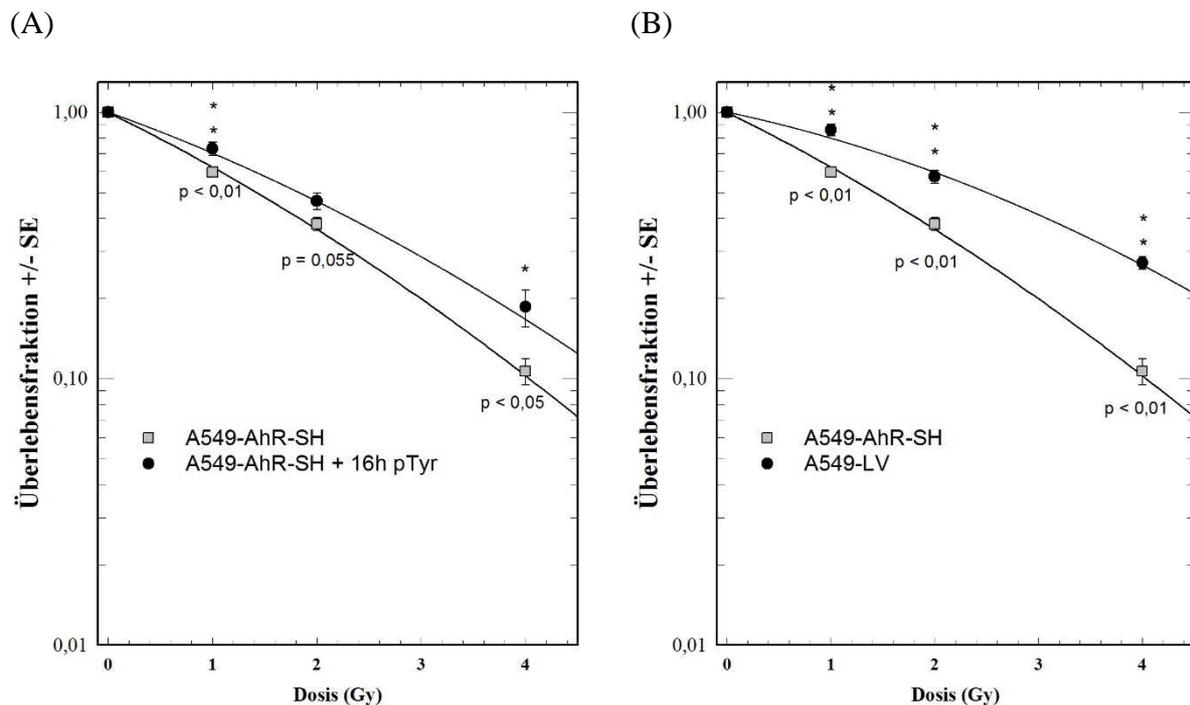


Abb. 3.5: Koloniebildungstest mit Einzeldosisbestrahlung von A549-AhR-SH und A549-LV-Zellen

Koloniebildungsrate nach Bestrahlung mit 1, 2 und 4 Gy. Die konfluenten Zellen wurden für 16 Stunden mit pTyr vorbehandelt und danach bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 6 Stunden im Brutschrank inkubiert und auf drei parallele Platten je 500 Zellen ausgesät. Nach 10 Tagen wurden die Klone (> 50 Zellen) quantifiziert.

(A) Überlebensrate der A549-AhR-SH-Zellen mit pTyr-Präinkubation im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

(B) Überlebensrate der A549-AhR-SH-Zellen im Vergleich zu den A549-Leervektor-Zellen.

Jeder Wert entspricht dem Mittelwert (+/- SE) aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallelen Ansätzen.

3.3 Einfluss von pTyr auf die Chromatinstruktur der DNA durch Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung (K9/S10)

Die Gefahr von Röntgenstrahlung für das Zellüberleben besteht vor allem in den verursachten DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Die effektive Reparatur dieser Brüche ist der entscheidende Faktor für das Zellüberleben nach Bestrahlung.

Es ist bekannt, dass in pTyr-vorbehandelten Zellen eine schnellere DNA-Reparatur möglich ist als in nicht vorbehandelten Zellen. Um einen solchen Effekt auf die DNA-Reparatur zu erzielen, muss pTyr einen globalen Wirkungsansatz in der Zelle besitzen. Als ein solcher Ansatzpunkt stelle sich beispielsweise die Chromatinstruktur dar.

In eukaryotischen Zellen ist die DNA mithilfe von Histonen in eine schwer zugängliche, kompakte aber dynamische Chromatinstruktur verpackt (Kornberg 1974; Kornberg and Thomas 1974). Die Erreichbarkeit der chromosomalen DNA durch Proteine ist aber entscheidend für viele zelluläre Prozesse, inklusive der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Die Acetylierung von Histonen an DSB führt durch Chromatinmodifikationen zur Öffnung der DNA und macht diese für Reparaturvorgänge zugänglich (Bassing et al. 2002; Celeste et al. 2002; Celeste et al. 2003).

3.3.1 Phosphotyrosin-vermittelte Acetylierung/ Phosphorylierung von Histon H3 in Abhängigkeit des TP53-Status der Zellen

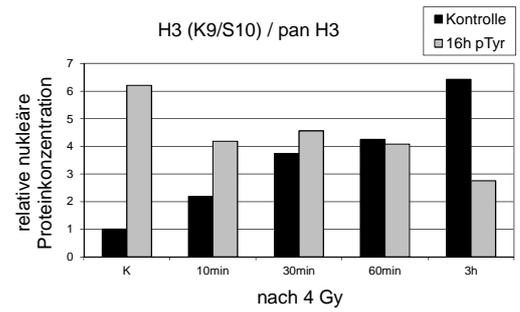
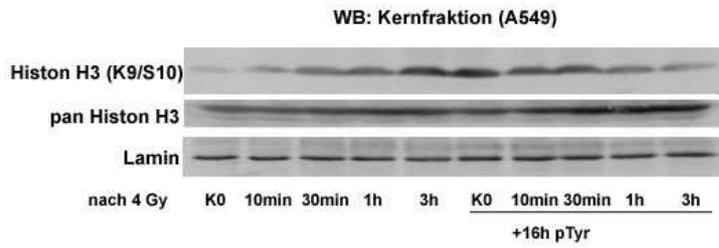
Um zu überprüfen, ob es zu einer Veränderung der Histon H3 (K9/S10) -Acetylierung/ Phosphorylierung nach pTyr-Präinkubation kommt, wurde die Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung nach Bestrahlung sowohl nach pTyr-Vorbehandlung als auch unbehandelt in verschiedenen Zelllinien mithilfe von Western-Blots überprüft.

In allen untersuchten TP53-Wildtyp-Zelllinien (A549, A549-AhR-SH und HSF7) konnte ein Anstieg der Menge an acetyliertem Histon H3 (K9/S10), entweder nach Bestrahlung oder durch 16 Stunden pTyr-Vorbehandlung, beobachtet werden, während die TP53-mutierten Zelllinien (FaDu und A549PON-P53-mut) keinen Anstieg der Histon H3 (K9/S10)-Acetylierung/ Phosphorylierung nach pTyr-Präinkubation zeigten (Abb. 3.6 A-E).

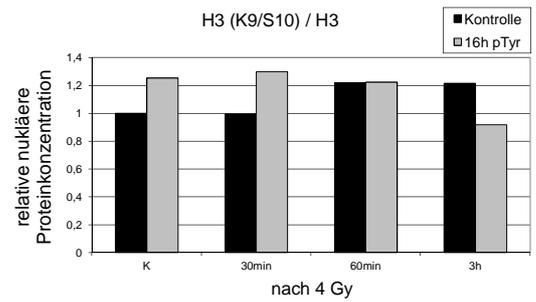
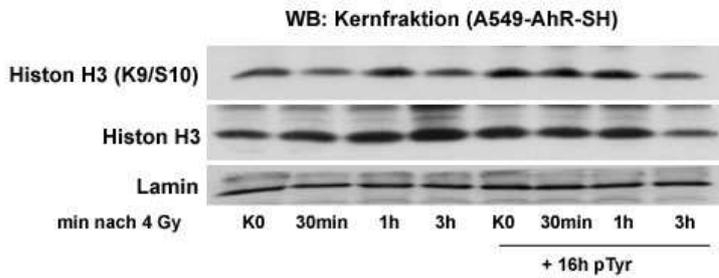
Auffallend ist, dass pTyr eine ebenso starke Acetylierung/ Phosphorylierung des Histons H3 verursacht wie Röntgenstrahlung, eine Kombination von Röntgenstrahlung und pTyr-Vorbehandlung kann dies auch nicht weiter steigern (Abb. 3.6 und 3.7).

Ergebnisse

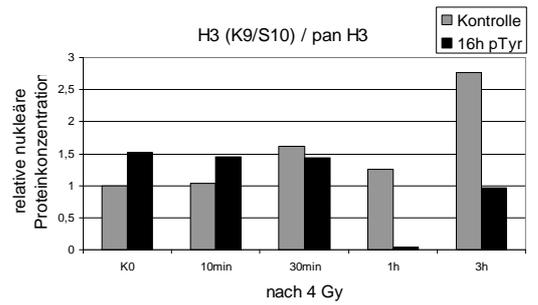
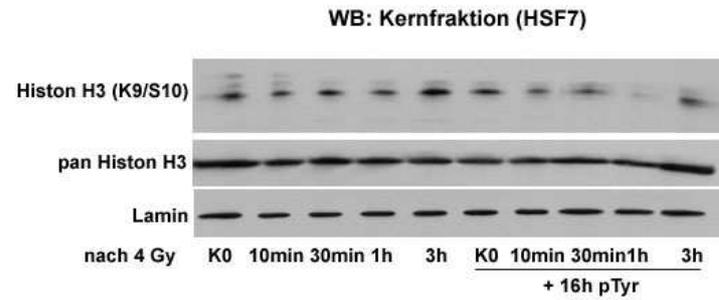
(A) A549



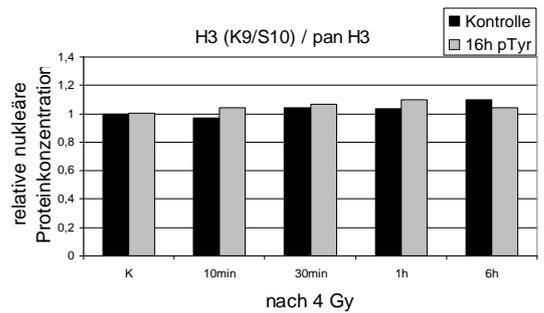
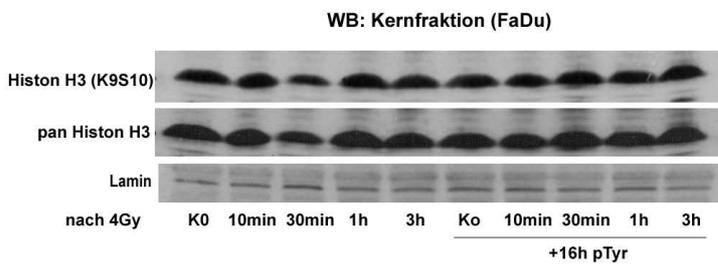
(B) A549-AhR-SH



(C) HSF7



(D) FaDu



Ergebnisse

(E) A549PON-P53wt/mut

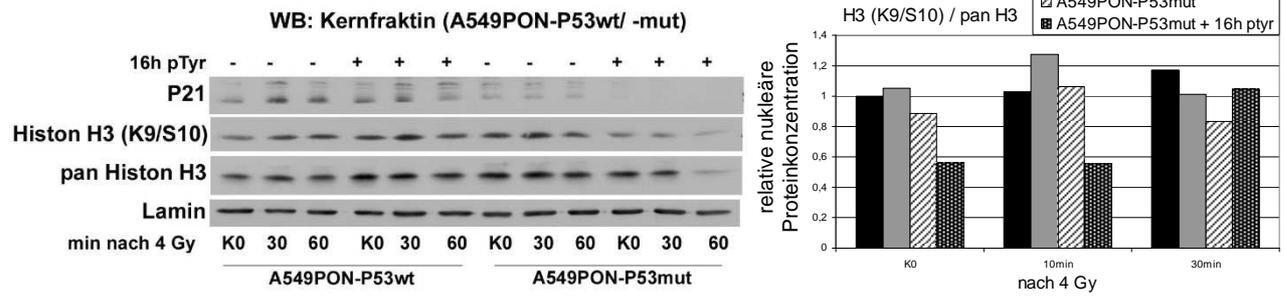


Abb. 3.6: Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung (K9/S10) nach Bestrahlung und pTyr –Präinkubation in TP53-Wildtyp und TP53-mutierten Zelllinien

Die Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 4 Gy bestrahlt und nach entsprechender Inkubationszeit die Proteine der Kernfraktion isoliert und im Western-Blot analysiert

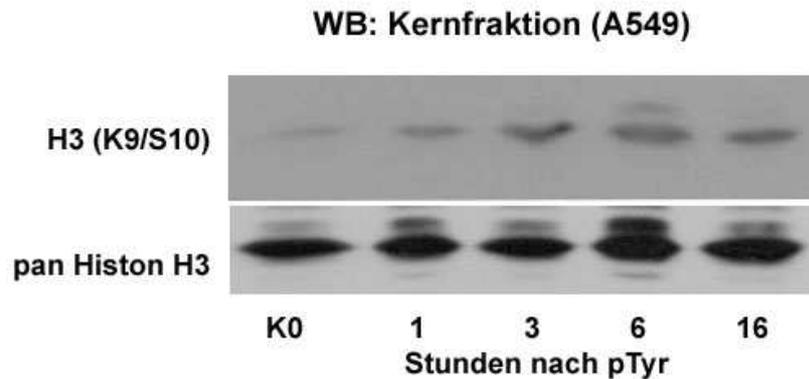
A – C: Menge an acetyliertem/ phosphoryliertem Histon H3 (K9/S10) nach Bestrahlung und 16 Stunden pTyr-Vorbehandlung in TP53-Wildtyp-Zelllinien (A549, A549-AhR-SH und HSF7). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus vier (C) bis fünf (A und B) unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

D + E: Menge an acetyliertem/ phosphoryliertem Histon H3 (K9/S10) nach Bestrahlung und 16 Stunden pTyr-Vorbehandlung in TP53-mutierten Zelllinien (Fadu und A549PON-P53-mut). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei (E) bis vier (D) unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

Alle H3 (K9/S10) -Datenpunkte der densitometrischen Auswertung wurden zuerst auf die zugehörige Gesamtproteinbande (pan Histon H3) und anschließend auf den Kontrollwert normiert.

Ergebnisse

(A)



(B)

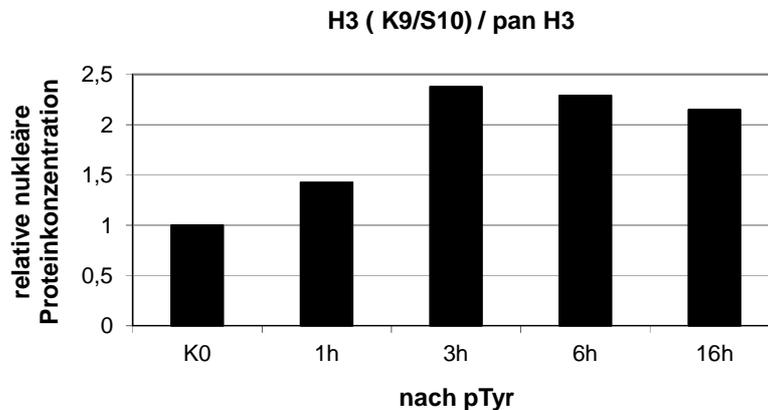


Abb. 3.7: Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung (K9/S10) nach 16 Stunden Präinkubation mit 10 μ M pTyr in A549-Zellen (TP53-Wildtyp)

(A) A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 10 μ M pTyr behandelt und nach entsprechender Inkubationszeit die Proteine der Kernfraktion isoliert und im Western-Blot der Anstieg der Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung analysiert.

(B) Densitometrische Auswertung der Histon H3 (K9/S10) Acetylierung/ Phosphorylierung. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Gesamtproteinbande (pan Histon H3) und anschließend auf den Kontrollwert normiert.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

3.3.2 Identifizierung der Histon H3 Acetyltransferase nach pTyr-Inkubation

Als potentielle Acetyltransferasen für die Histon H3 (K9/S10) –Acetylierung/ Phosphorylierung gab es zwei wahrscheinliche Kandidaten: P300 und Tip60.

P300 ist eine humane Acetyltransferase, die über ihren Einfluss auf die Chromatinstruktur auch als Transkriptionsfaktor betrachtet werden kann. Eine erhöhte Aktivität der Acetyltransferase P300 nach DNA-Schäden im Zusammenhang mit nicht homologem Endjoining (NHEJ) wurde bereits häufiger beschrieben (Ogryzko et al. 1996; Cohen et al.

Ergebnisse

2004; Das et al. 2009), was die Vermutung bestärkte, sie könnte auch an der pTyr-vermittelten Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung (K9/S10) beteiligt sein.

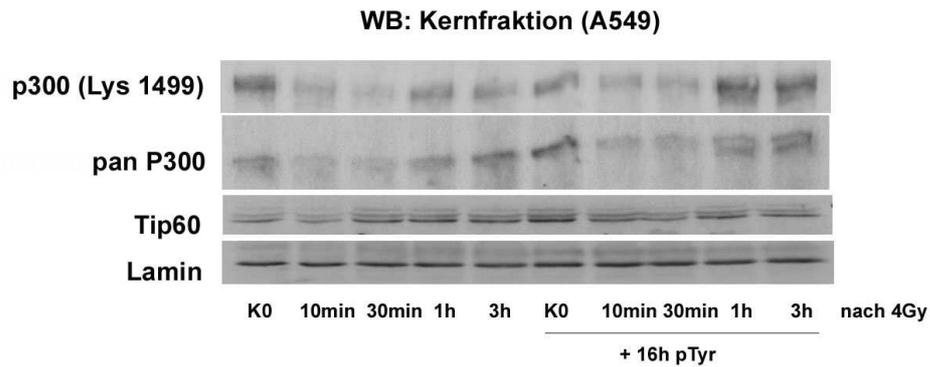
Der zweite Kandidat Tip60 gehört zur größten bekannten Familie an Histon-Acetyltransferasen (HAT-Proteinen), der MYST-Familie, und besitzt nicht nur Histon-Acetyltransferase-Aktivität, sondern gilt auch als Tumorsuppressor. Auch die Tip60-Aktivität wird durch DNA-Schäden verstärkt aktiviert (Hlubek et al. 2001; Nordentoft and Jorgensen 2003).

Um zu überprüfen, ob diese beiden HAT-Kandidaten eine pTyr-abhängige Aktivität bzw. Akkumulation im Zellkern zeigen, wurden konfluente A549-Zellen mit 10 μ M pTyr für 16 Stunden vorbehandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt und auf einem Western-Blot analysiert. Da die HAT-Aktivität von P300 von der Acetylierung an Lys1499 abhängig ist, kann anhand des Verhältnisses von P300 (Lys1499) zu pan P300 die Aktivitätsveränderung analysiert werden (Thompson et al. 2004).

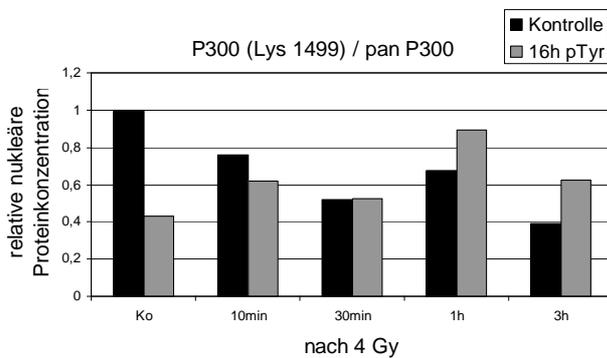
P300 zeigt nach Bestrahlung und 16 Stunden pTyr-Präinkubation keinen Anstieg der Aktivität, sondern eine deutliche Reduktion (Abb. 3.8 A, B). Der Proteinlevel von Tip60 dagegen steigt sowohl nach Bestrahlung, als auch durch alleinige pTyr -Präinkubation an (Abb. 3.8 A, C).

Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

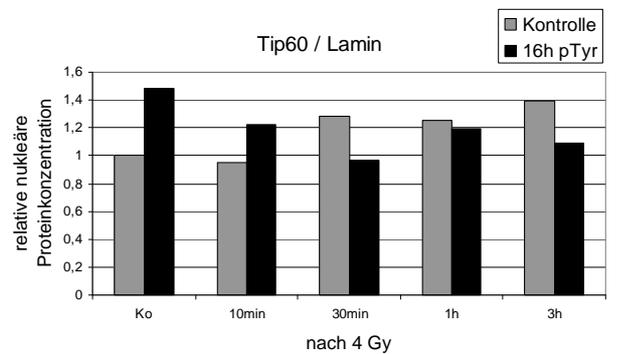


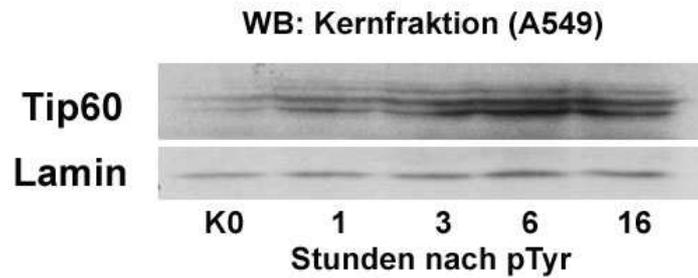
Abb. 3.8: pTyr- und Bestrahlungs-induzierte Effekte auf die P300-Aktivität und Tip60-Akkumulation in A549-Zellen

(A) A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase für 16 Stunden mit 10 μ M pTyr behandelt und anschließend mit 4 Gray bestrahlt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bis 3 Stunden wurden die Proteine der Kernfraktion isoliert und im Western Blot analysiert. (B) Densitometrische Auswertung der P300-Aktivität. Alle P300 (Lys1499)- Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Gesamtproteinbande (pan P300) und anschließend auf den Kontrollwert normiert. (C) Densitometrische Auswertung des Tip60-Levels. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Laminkontrolle und anschließend auf den Kontrollwert normiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

Auch bei Betrachtung des Tip60-Levels nach unterschiedlich langen pTyr-Vorbehandlungszeiten ist ein deutlicher Anstieg zu beobachten. Das maximale Tip60-Level lag, innerhalb der betrachteten Zeitwerte, nach 16 Stunden vor (Abb. 3.9).

Ergebnisse

(A)



(B)

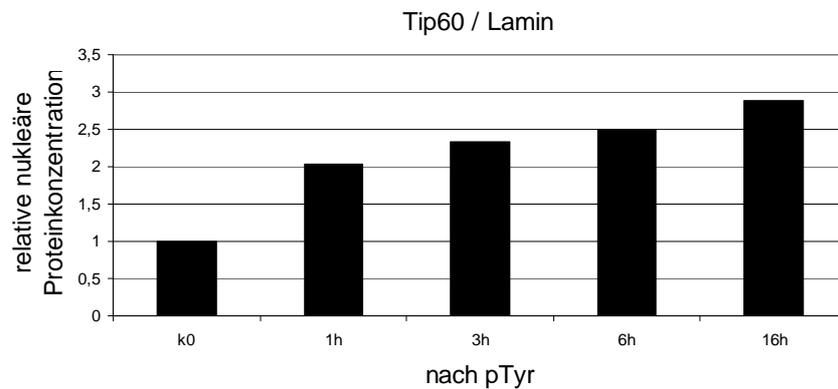


Abb. 3.9: pTyr-induzierte Tip60-Akkumulation im Zellkern

(A) A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 10 μ M pTyr behandelt und nach entsprechender Inkubationszeit die Proteine der Kernfraktion isoliert und im Western-Blot der Anstieg von Tip60 analysiert.

(B) Densitometrische Auswertung der Tip60-Akkumulation. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Laminkontrolle und anschließend auf den Kontrollwert normiert.

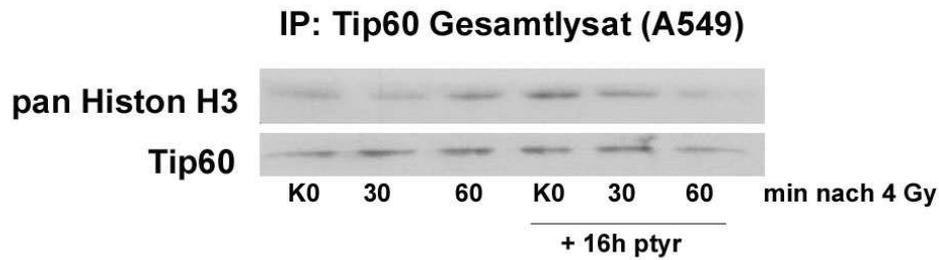
Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

Um zu überprüfen, ob es eine Komplexbildung zwischen der Acetyltransferase Tip60 und dem Histon H3 gibt, wurde eine Immunpräzipitation (IP) aus dem Gesamtlisat von konfluenten A549-Zellen durchgeführt.

In der IP zeigte sich, dass es sowohl nach Bestrahlung zu einem Anstieg der Komplexbildung zwischen Tip60 und Histon H3 kommt, als auch durch eine 16-stündige Präinkubation mit pTyr (Abb. 3.10).

Ergebnisse

(A)



(B)

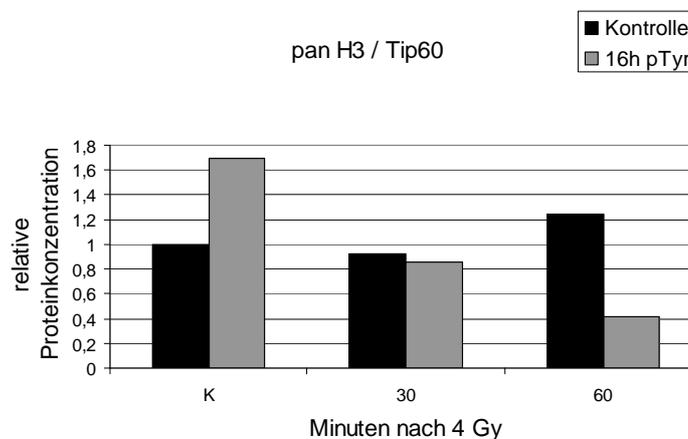


Abb. 3.10: pTyr- und Strahlungseffekte auf die Bindung zwischen Histon H3 und Tip60

(A) A549-Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt und/ oder 16 Stunden mit pTyr vorbehandelt. Tip60 wurde anschließend in den Zellen immunopräzipitiert und über SDS-Page analysiert.

(B) Densitometrische Auswertung der Bindung zwischen Tip60 und Histon H3. Alle Datenpunkte wurden zuerst auf die zugehörige Tip60 -Kontrolle und anschließend auf den Kontrollwert normiert.

Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

3.3.3 Phosphotyrosin-vermittelter Anstieg der Tip60-Aktivität

In den vorangegangenen Western-Blot-Analysen konnte ein Anstieg des Tip60-Proteinlevels in der Kernfraktion von A549-Zellen nach pTyr-Behandlung nachgewiesen werden. Da dieser Anstieg jedoch keine Aussage über die Aktivität von Tip60 nach Bestrahlung und pTyr-Inkubation zulässt, wurde ein radioaktiver Histon-Acetyltransferase-Test (HAT-Test) für Tip60 durchgeführt.

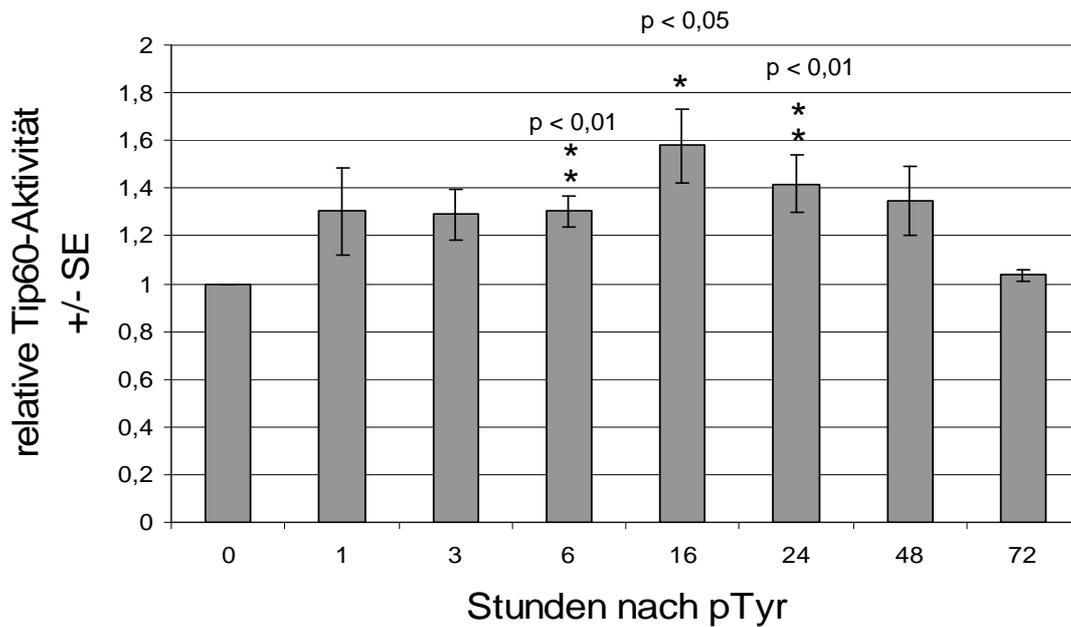
Mithilfe des HAT-Tests konnte gezeigt werden, dass es nach pTyr-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Tip60-Aktivität über einen Zeitraum von 16 Stunden kommt ($p_{6h} = 0,0073$, $p_{16h} = 0,031$, $p_{24h} = 0,016$), danach fällt die Aktivität langsam wieder ab (Abb. 3.11 A).

Ergebnisse

Nach Bestrahlung der Zellen mit 4 Gray zeigten die pTyr-vorbehandelten Zellen innerhalb der ersten 40 Minuten eine höhere Tip60-Aktivität als die Kontrolle, anschließend sank die Aktivität in den pTyr-behandelten Zellen und den Kontrollzellen wieder ab (Abb. 3.11 B).

Ergebnisse

(A)



(B)

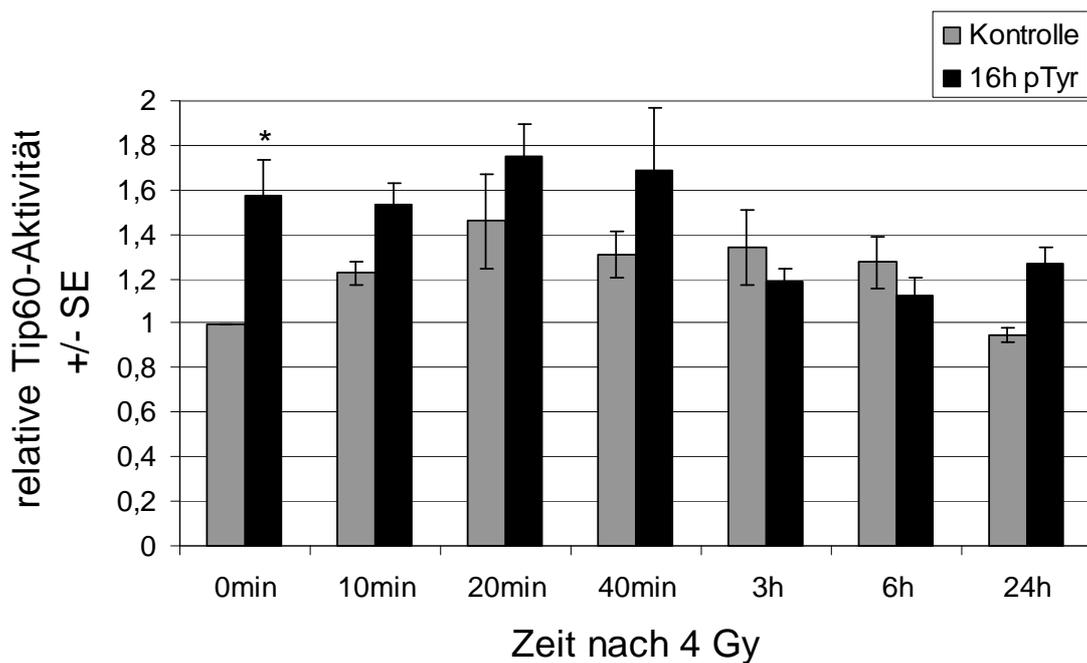


Abb. 3.11: pTyr- und Strahlungs-vermittelter Anstieg der Tip60-Aktivität

(A) A549-Zellen wurden nach entsprechender pTyr-Vorbehandlungszeit mit Tip60 immunopräzipitiert und anschließend die Aktivität in einem HAT-Experiment mithilfe von [³H]-Acetyl-CoA analysiert.

(B) Aktivität von Tip60 in A549-Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy in Kombination mit einer 16-stündigen pTyr-Präinkubation. Anschließend wurde Tip60 in den Proben immunopräzipitiert und in einem HAT-Experiment mithilfe von [³H]-Acetyl-CoA analysiert.

Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) +/- Standardfehler (SE) dar.

3.4 Einfluss einer pTyr-Vorbehandlung auf die ATP-Produktion und Glukoseaufnahme der Zellen

Zellinterne Proteinakkumulationen und Veränderungen der Chromatinstruktur über Histon-Acetylierung/ Phosphorylierung sind Energie aufbrauchende Prozesse in der Zelle. Die hierfür benötigte Energie bezieht die Zelle aus der Verstoffwechslung von Glukose, die sie aus der Umgebung aufnimmt. Die aufgenommene Glukose wird anschließend durch die Zelle in den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt, der eine unmittelbare Energieversorgung von energieverbrauchenden Zellprozessen ermöglicht.

3.4.1 Phosphotyrosin beeinflusst die ATP-Konzentration in TP53-Wildtyp und TP53-mutierten Zellen

Um den Einfluss von pTyr auf den Energiehaushalt der Zelle zu untersuchen, wurden colorimetrische ATP-Messungen (Abnova, KA0806) der Zelllinien A549 und FaDu 1, 3, 6 und 16 Stunden nach pTyr-Gabe durchgeführt.

Bei der Zelllinie A549 wurde zudem auch eine ATP-Messung nach Bestrahlung mit 4 Gray in Kombination mit einer pTyr-Präinkubation von 16 Stunden untersucht (Abb. 3.12).

In allen untersuchten Zelllinien kam es nach pTyr-Behandlung zu einem kurzzeitigen Anstieg der ATP-Konzentration innerhalb der ersten 6 Stunden. Nach 16 Stunden näherte sie sich aber wieder dem Ausgangslevel an (Abb. 3.12 A, B).

Nach Bestrahlung mit 4 Gray kommt es in den untersuchten A549-Zellen innerhalb der ersten 6 Stunden zu einem Absinken der ATP-Konzentration sowohl in den pTyr-vorbehandelten als auch in den unbehandelten Zellen. Dabei ist jedoch auffällig, dass die bestrahlungsinduzierte ATP-Krise in den pTyr-behandelten Zellen etwas flacher verläuft, als in den unbehandelten Zellen. Nach 16 Stunden steigt das ATP-Level sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Zellen wieder an und erreicht nach 48 Stunden annähernd das Ausgangslevel (Abb. 3.12 C).

Ergebnisse

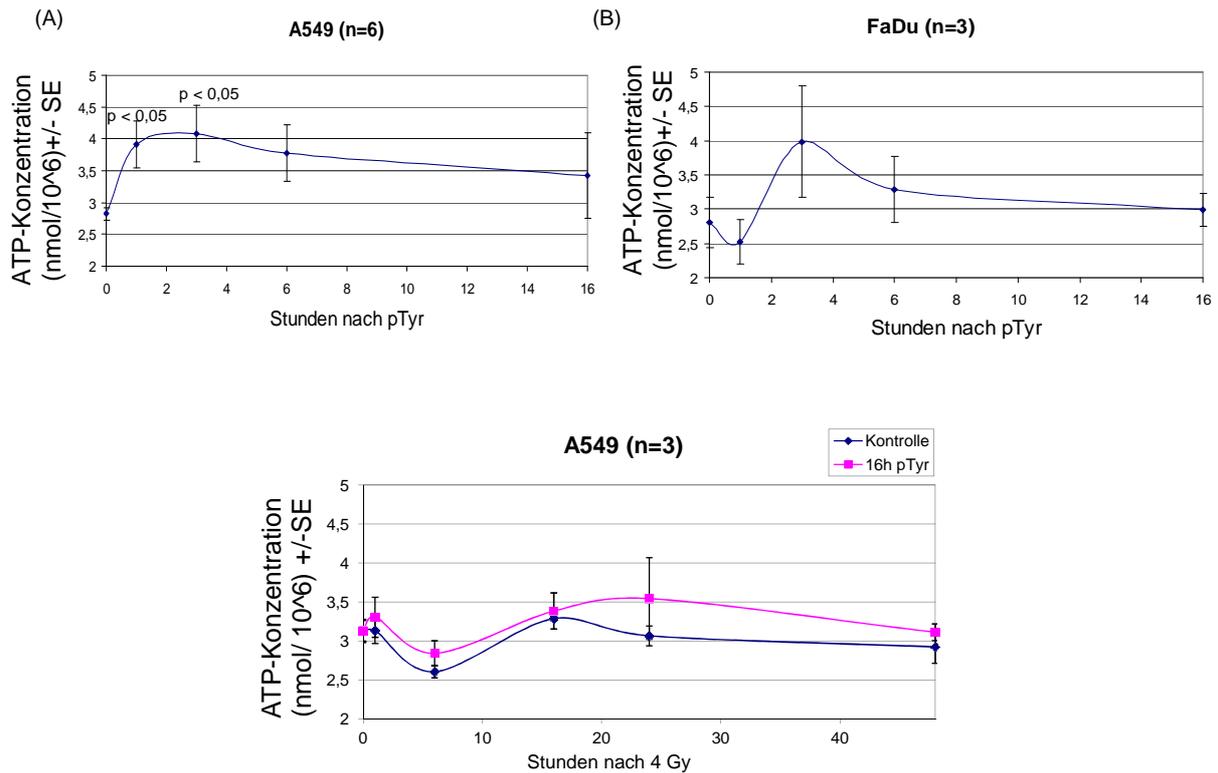


Abb. 3.12: Einfluss von pTyr auf die ATP-Konzentration in verschiedenen Zelllinien

(A) ATP-Konzentration nach unterschiedlich langen pTyr-Präinkubationen in A549-Zellen (TP53-wt).

(B) ATP-Konzentration nach unterschiedlich langen pTyr-Präinkubationen in FaDu-Zellen (TP53-mut).

(C) ATP-Konzentrationen in A549-Zellen nach 4 Gy-Bestrahlung im Zusammenhang mit einer pTyr-Präinkubation.

Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert aus drei (B, C) bzw. sechs (A) unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler (SE) dar.

3.4.2 Glukoseaufnahme nach pTyr-Präinkubation in Abhängigkeit des TP53-Status

Um zu untersuchen, ob der vorübergehende ATP-Anstieg nach pTyr-Behandlung durch eine erhöhte Glukoseaufnahme bewirkt wird, wurde die relative Glukoseaufnahme von A549 und A549PON-P53-wt/ -mut -Zellen nach pTyr-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet.

Für diese Messung wurden die Zellen für drei Tage vor dem Versuchsstart in einem Wachstumsmedium mit reduziertem Glukosegehalt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 μ M pTyr behandelt und bekamen gleichzeitig ³H-Glukose ins Medium.

Nach entsprechender Inkubationszeit (0, 1, 3, 6 oder 16 Stunden) wurde die nicht aufgenommene ³H-Glukose mit dem Medium entfernt, die Zellen gewaschen und anschließend mit Hilfe von NaOH aufgeschlossen und die aufgenommene Menge an ³H-Glukose mit einem Beta-Counter gemessen.

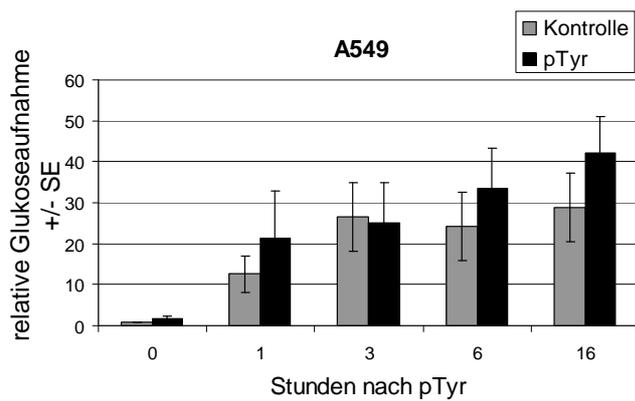
Ergebnisse

In Wildtyp A549-Zellen konnte eine erhöhte Glukoseaufnahme in den pTyr-behandelten Zellen beobachtet werden, deren Differenz zur unbehandelten Kontrolle nach 16 Stunden am größten war (Abb. 3.13 A, B).

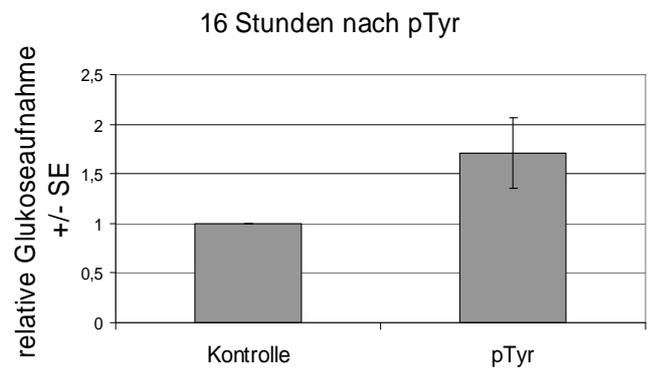
In den A549PON-P53-mut-Zellen konnte dagegen kein Unterschied der Glukoseaufnahmegeschwindigkeit nach pTyr-Behandlung beobachtet werden (Abb. 3.13 C).

Mit FaDu-Zellen war diese Testung nicht möglich, da sie sich bereits durch die Glukosereduktion von der Platte ablösen.

(A)



(B)



(C)

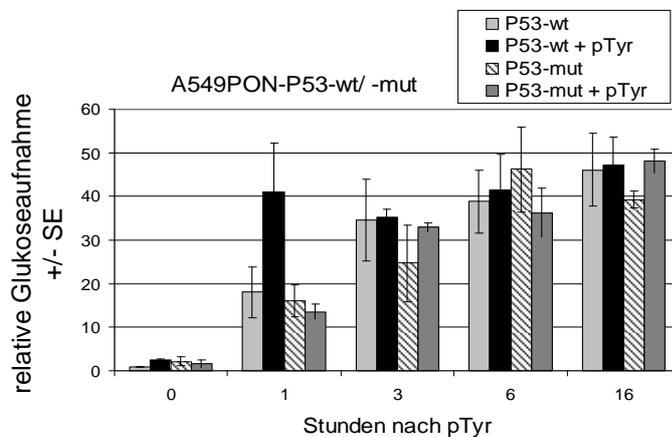


Abb. 3.13: ³H-Glukoseaufnahme nach pTyr-Behandlung

Messung der aufgenommenen Glukosemenge nach unterschiedlichen Zeiten der pTyr-Präinkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in (A, B) A549-Wildtypzellen und (C) A549PON-P53-mut Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen +/- SE.

3.5 Einfluss des SGLT1-Inhibitors Phloridzin auf die Glukoseaufnahme und ATP-Konzentration nach pTyr-Behandlung

Für die Glukoseaufnahme sind in eukaryotischen Zellen zwei Typen von Membrantransporterfamilien bekannt: die Trägerproteinvermittelten Glukose-Uniports (GLUTs), die Glukose entlang des Konzentrationsgradienten transportieren und die Natrium-Glukose-Kotransporter Familie (SGLTs) (Hediger et al. 1995; Olson and Pessin 1996).

Der Glukosetransporter SGLT-1 ist in der Lage, Glukose auch entgegen des chemischen Gradienten mit hoher Affinität, aber geringer Kapazität, zu transportieren.

Weihua et al. zeigten 2008, dass der EGFR kolokalisiert mit dem Glukosetransporter SGLT-1 in der Zellmembran vorliegt.

3.5.1 Phloridzin wirkt dem pTyr-vermittelten Effekt auf die Glukoseaufnahme in A549-Zellen entgegen

Durch die bekannten Effekte von pTyr auf den EGFR ist zu vermuten, dass die erhöhte Glukoseaufnahme nach pTyr-Präinkubation von A549-Zellen durch eine erhöhte Aktivität des Glukosetransporters SGLT-1 erfolgt. Um diese Annahme zu überprüfen wurde die Glukoseaufnahme von A549-Zellen nach Inkubation mit dem SGLT-1-Inhibitor Phloridzin und in Kombination mit pTyr getestet.

Die zuvor beobachtete erhöhte Glukoseaufnahme nach pTyr-Behandlung konnte nach zusätzlicher Phloridzin-Behandlung nicht mehr beobachtet werden. Zellen, die sowohl mit Phloridzin als auch pTyr behandelt wurden, zeigen dabei die geringste Glukoseaufnahme über den beobachteten Zeitraum (Abb. 3.14).

Ergebnisse

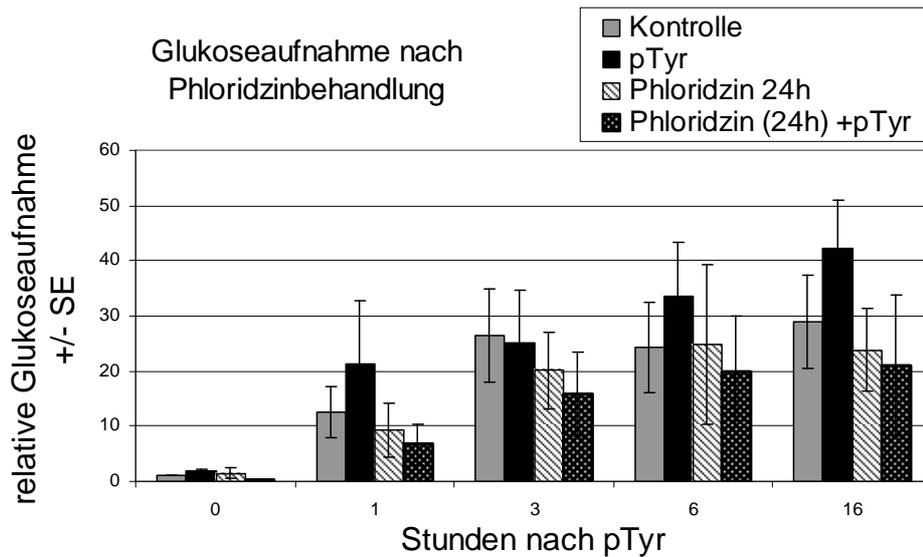


Abb. 3.14. Einfluss von Phloridzin auf die ^3H -Glukoseaufnahme nach pTyr-Behandlung

Messung der aufgenommenen Glukosemenge nach unterschiedlichen Zeiten der pTyr-Präinkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in A549-Zellen in Kombination mit dem SGLT-1-Inhibitor Phloridzin (500 μM , 24 Stunden). Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen +/- SE.

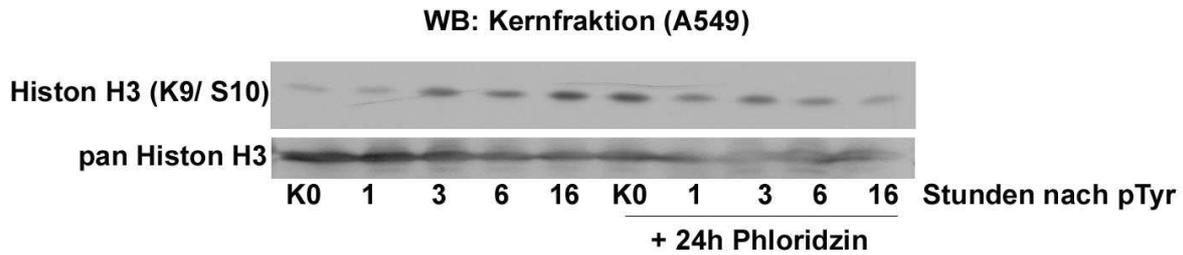
3.5.2 Der SGLT-1-Inhibitor Phloridzin kann den Effekt von pTyr auf die Histon H3 (K9/S10) –Acetylierung/ Phosphorylierung verändern

Nach den Beobachtungen, dass Phloridzin die Glukoseaufnahme der pTyr-Behandlung beeinflussen kann, sollte nun auch überprüft werden, ob Phloridzin auf die Histon H3 (K9/S10)-Acetylierung/ Phosphorylierung nach pTyr-Präinkubation und Bestrahlung einen Einfluss hat.

Im Western-Blot zeigte sich, dass die alleinige Phloridzinvorbehandlung zu einem Anstieg der Histon-Acetylierung/ Phosphorylierung führt, bei einer Kombination aus Phloridzin- und pTyr-Behandlung sinkt die Acetylierung/ Phosphorylierung des Histon H3 (K9/S10) über den Zeitraum von 16 Stunden jedoch wieder deutlich (Abb. 3.15).

Ergebnisse

(A)



(B)

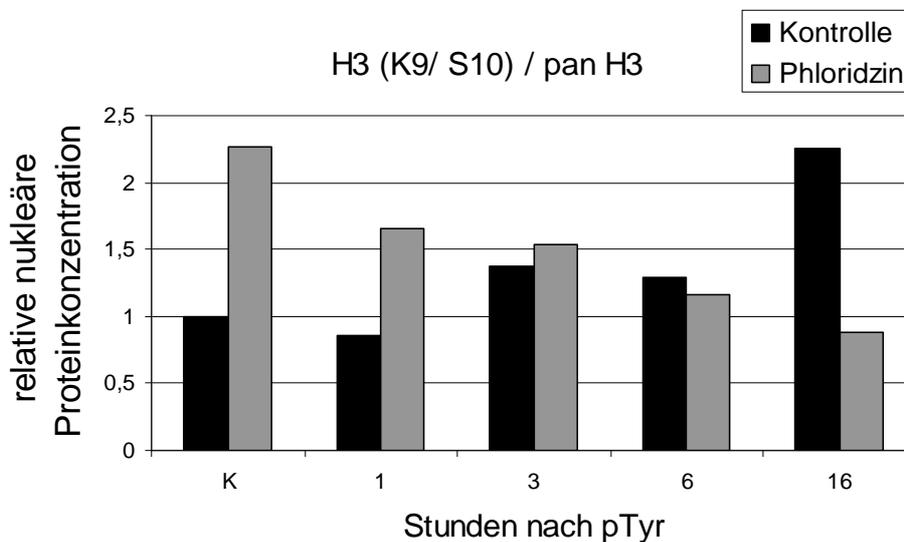


Abb. 3.15 : Histon H3-Acetylierung/ Phosphorylierung (K9/S10) nach pTyr-Präinkubation in Kombination mit dem SGLT-1-Inhibitor Phloridzin

A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 500 μ M Phloridzin oder DMSO für 24 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte eine Präinkubation mit 10 μ M pTyr für 1 bis 16 Stunden und die Isolierung der Proteinkernfraktion, die im Western-Blot analysiert wurde.

Gezeigt ist ein repräsentativer Blot (A) aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

3.5.3 SGLT-1-Akkumulation in der Zelle nach pTyr-Inkubation in Abhängigkeit der EGFR-Konzentration

Da die Behandlung von A549-Zellen mit dem SGLT-1-Inhibitor Phloridzin einen Einfluss auf die verschiedenen zellulären pTyr-Effekte zeigte, sollte überprüft werden, ob es auch zu einer Veränderung des SGLT-1-Levels nach pTyr-Behandlung kommt.

In Western-Blot Analysen konnte jedoch weder in der TP53-Wildtyp Zelllinie A549 noch in der TP53-mutierten Zelllinie FaDu eine Veränderung des SGLT-1-Levels durch pTyr-

Ergebnisse

Präinkubation beobachtet werden. Es ist jedoch auffällig, dass sowohl der SGLT-1-Gehalt als auch die Menge an EGFR in FaDu-Zellen deutlich höher ist als in A549-Zellen (Abb. 3.16).

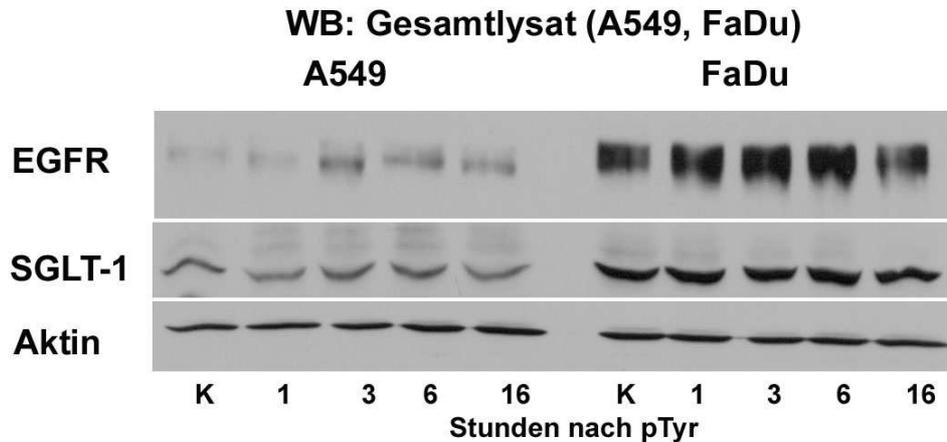


Abb. 3.16: SGLT1-Akkumulation von A549 und FaDu-Zellen nach pTyr-Behandlung

Konfluente A549- und FaDu-Zellen wurden für 1, 3, 6 oder 16 Stunden mit 10 μ M pTyr behandelt und anschließend die Proteine isoliert und mithilfe eines Western-Blots analysiert.

Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

3.6 Phosphotyrosin-vermittelte Effekte auf Mitochondrien

TP53-Wildtyp-Zellen gewinnen einen Großteil ihrer Energie über die Atmungskette, während Tumorzellen mit mutiertem TP53 vermehrt auf die Glykolyse zurückgreifen werden (Pedersen 2007; Yeung et al. 2008).

Da Phosphotyrosin bisher nur bei TP53-Wildtyp-Zellen eine Verbesserung der Überlebensrate nach Bestrahlung gezeigt hat, ist zu vermuten, dass es einen Einfluss von Phosphotyrosin auf die aerobe Atmung über die Mitochondrien gibt.

3.6.1 Phosphotyrosin reduziert das Mitochondrienpotential in A549-Zellen

Die Elektronentransportkette (Atmungskette) und die ATP-Synthase sind an der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert. Der elektrochemische Protonengradient, der über dieser Membran liegt, treibt u.a. die ATP-Synthase zur Bildung von ATP an.

Die meiste Kraft des Protonengradienten ist in Form des mitochondrialen Membranpotential (MMP) gespeichert, welches vereinfacht den Energiestatus eines Mitochondriums darstellt.

Für eine effektive Funktion eines Mitochondriums ist ein stabiles MMP notwendig. Ein sinkendes MMP wird mit der Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität und der daraus resultierenden Apoptoseinduktion in Verbindung gebracht, während ein Anstieg des MMP (Hyperpolarisation) vor allem durch verschiedene Stresssituationen erzeugt wird und mit einer vermehrten ROS-Produktion einhergeht (Gottlieb et al. 2003; Suski et al. 2012).

Ergebnisse

Mit Hilfe des lipophilen, kationischen und potentialsensitiven Farbstoffs Tetramethylrhodamin-Ethyl-Ester (TMRE) kann eine relative Messung des mitochondrialen Membranpotentials in einem Durchflusszytometer vorgenommen werden.

In A549-Zellen konnte nach pTyr-Behandlung, über einen Zeitraum von 16 Stunden ein deutliches Absinken des Membranpotentials beobachtet werden (Abb. 3.17 A).

Bei Kombination einer 16-stündigen pTyr-Präinkubation mit einer anschließenden Bestrahlung von 4 Gray veränderte sich das mitochondriale Membranpotential der pTyr-vorbehandelten Zellen nur minimal, während es in den unbehandelten Zellen zu einem starken Absinken unter das Level der pTyr vorbehandelten Zellen kam (Abb. 3.17 B).

Die Positivkontrolle mit CCCP zeigte einen vollständigen Zusammenbruch des Membranpotentials erst bei einem relativen Membranpotential von $0,52 \pm 0,05$.

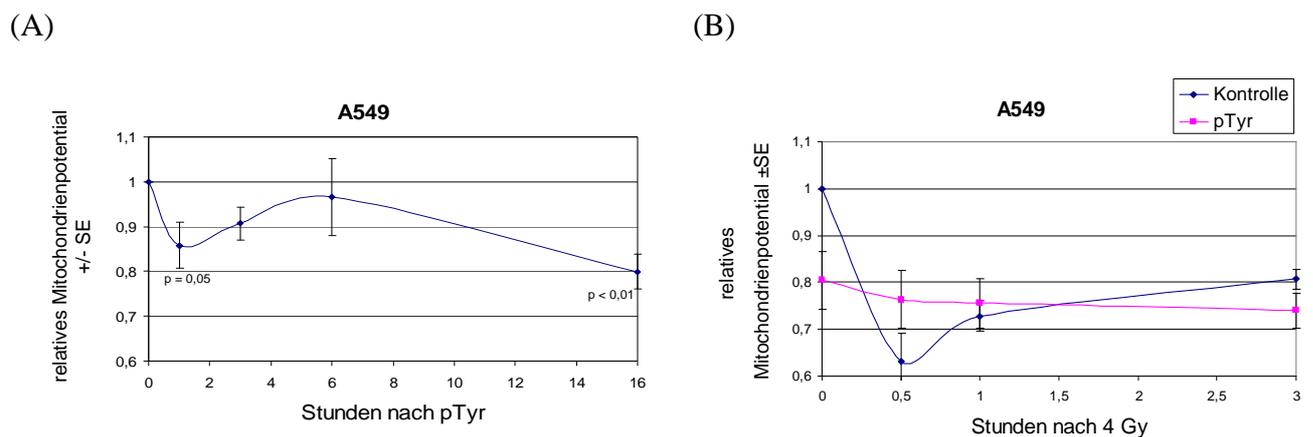


Abb. 3.17 Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials nach pTyr-Behandlung und in Kombination mit Bestrahlung in A549-Zellen

(A) Konfluente Zellen wurden für 1, 3, 6 oder 16 Stunden mit $10 \mu\text{M}$ pTyr behandelt und anschließend mit dem Farbstoff TMRE gefärbt. Die Bestimmung des relativen Mitochondrienpotentials erfolgte dann mithilfe eines Durchflusszytometers.

Die dargestellten Datenpunkte stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE) dar.

(B) Konfluente Zellen wurden für 16 Stunden mit $10 \mu\text{M}$ pTyr behandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Nach entsprechender weiterer Inkubationszeit (0, 0,5, 1 oder 3 Stunden) wurden die Zellen mit dem Farbstoff TMRE gefärbt. Die Bestimmung des relativen Mitochondrienpotentials erfolgte dann mithilfe eines Durchflusszytometers.

Die dargestellten Datenpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE) dar.

Alle Datenpunkte wurden auf die unbestrahlte, unbehandelte Kontrolle normiert.

3.6.2 Einfluss einer pTyr-Präinkubation auf die Mitochondrienzahl

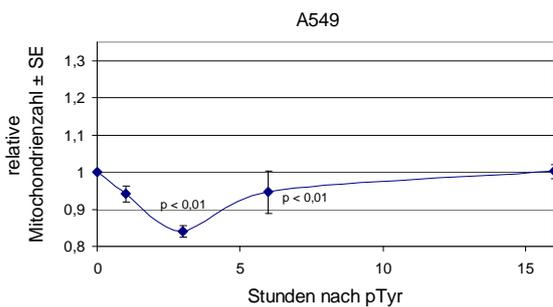
Die relative Zahl der Mitochondrien wurde mithilfe des MitoTracker Green FM Farbstoffs unter Verwendung eines Durchflusszytometers bestimmt.

Ergebnisse

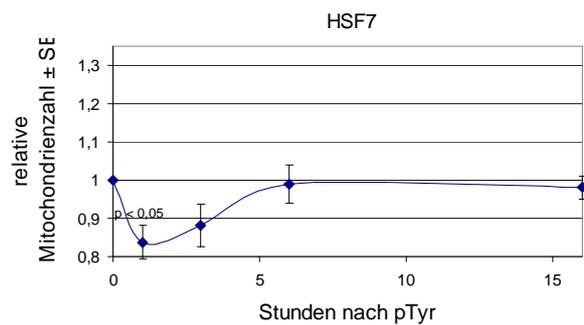
In den TP53-Wildtyp-Zelllinien A549 und HSF7 kommt es nach Behandlung mit pTyr innerhalb der ersten sechs Stunden zu einem Absinken der Mitochondrienzahl, die sich jedoch nach 16 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückbewegt.

FaDu-Zellen, die eine TP53-Mutation besitzen, zeigen dagegen ein tendenziell entgegengesetztes Phänomen mit einem Anstieg der Mitochondrienzahl nach pTyr-Gabe (Abb. 3.18).

(A)



(B)



(C)

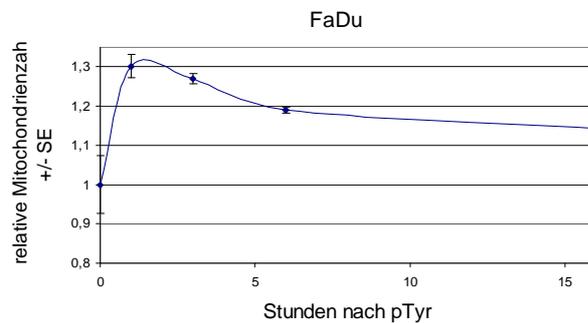


Abb. 3.18 Veränderung der Mitochondrienzahl nach pTyr-Behandlung über einen Zeitraum von 0 bis 16 Stunden.

Konfluente Zellen wurden für 1, 3, 6 oder 16 Stunden mit 10 μ M pTyr behandelt und die fixierten Zellen anschließend mit MitoTracker Green FM gefärbt und mithilfe eines Durchflusszytometers gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei (A, B) bzw. zwei (mit insgesamt 4 Messwerten, C) unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler der Zelllinien A549 (A), HSF7 (B) und FaDu (C).

Alle Datenpunkte wurden auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (0-Wert) normiert.

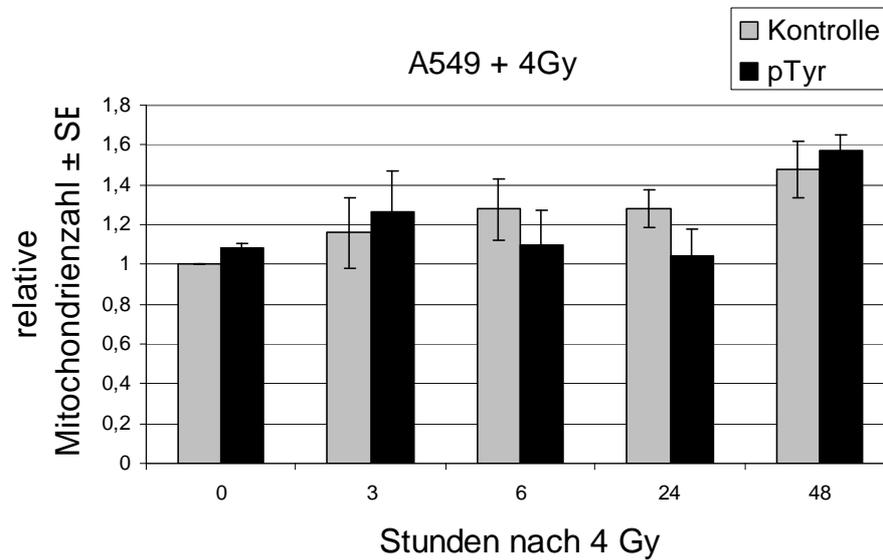
Nach Bestrahlung mit 4 Gray steigt die Mitochondrienzahl in A549-Zellen unabhängig von einer pTyr-Vorbehandlung über den untersuchten Zeitraum von 48 Stunden an (Abb. 3.20 A).

In FaDu-Zellen zeigt sich nur bei den unbestrahlten Zellen ein Unterschied zwischen pTyr-

Ergebnisse

behandelten und unbehandelten Zellen. Nach Bestrahlung sinkt die Mitochondrienzahl dann kurzzeitig etwas ab, bleibt aber relativ konstant (Abb. 3.19 B).

(A)



(B)

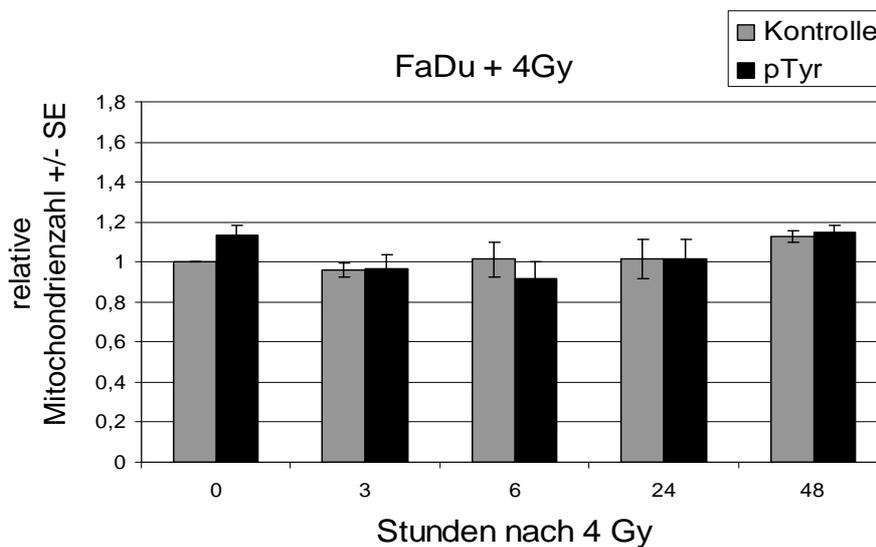


Abb. 3.19: Veränderung der Mitochondrienzahl nach Bestrahlung mit 4 Gray in Kombination mit einer pTyr-Vorbehandlung

Konfluente Zellen wurden für 16 Stunden mit 10 μM pTyr behandelt und die fixierten Zellen anschließend mit MitoTracker Green FM gefärbt und mithilfe eines Durchflusszytometers gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE) der Zelllinien A549 (A) und FaDu (B).

Alle Datenpunkte wurden auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (0-Wert) normiert

Ergebnisse

3.6.3 pTyr-Präinkubation führt zum Anstieg von pAMPK

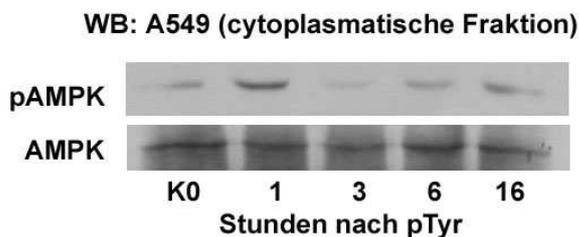
Der Energiesensor AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) wird durch das Absinken des ATP-Levels, Umweltstress oder Glukosemangel aktiviert. Es konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass AMPK über die Phosphorylierung von ULK1 die Autophagie aktivieren kann (Ganley et al. 2009).

Mit Hilfe der Autophagie können in eukaryotischen Zellen unlösliche Proteinaggregate, defekte Mitochondrien oder eingedrungene Pathogene durch Vesikel mit einer Doppelmembran umgeben werden, welche dann mit Lysosomen fusionieren um den Inhalt zu degradieren.

Bei Energiemangel der Zellen dient die Autophagie zur Rückgewinnung von Aminosäuren zur Produktion von essenziellen Proteinen oder zur Generierung von Substrat für die ATP-Produktion.

Nach Behandlung mit pTyr konnte nach einer Stunde im Western Blot bei A549-Zellen ein deutlicher Anstieg von pAMPK beobachtet werden, was auf eine Aktivierung der Autophagie hindeutet (Abb. 3.20).

(A)



(B)

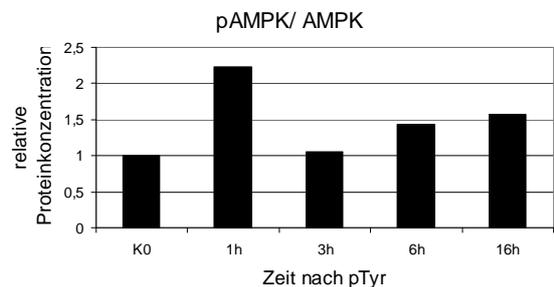


Abb. 3.20 Anstieg von pAMPK in A549 nach pTyr-Behandlung

(A) A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 10 μ M pTyr behandelt und nach entsprechender Inkubationszeit die Proteine der cytoplasmatischen Fraktion isoliert und im Western-Blot der pAMPK und AMPK analysiert.

(B) Alle pAMPK-Datenpunkte der densitometrischen Auswertung wurden zuerst auf die zugehörige Gesamtproteinbande (AMPK) und anschließend auf den Kontrollwert normiert

Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

3.6.4 Einfluss des SGLT-1-Inhibitors Phloridzin auf den Phosphotyrosin-vermittelten Effekt auf die Mitochondrienzahl

Für die Untersuchung von Phloridzin auf den pTyr-induzierten Effekt der Mitochondrienzahl wurden konfluente A549-Zellen mit 500 μ M Phloridzin behandelt und nach 24 Stunden für zusätzliche 1, 3, 6 oder 16 Stunden mit 10 μ M Phosphotyrosin inkubiert. Die relative Zahl der Mitochondrien wurde anschließend mithilfe des MitoTracker Green FM Farbstoffs unter Verwendung eines Durchflusszytometers bestimmt.

Ergebnisse

A549-Zellen, die mit dem SGLT-1-Inhibitor Phloridzin behandelt wurden hatten nach 3 Stunden eine erhöhte Zahl an Mitochondrien, nach einer 16-stündigen zusätzlichen Behandlung mit pTyr lag die Mitochondrienzahl jedoch wieder deutlich niedriger als in der Kontrolle (Abb. 3.21).

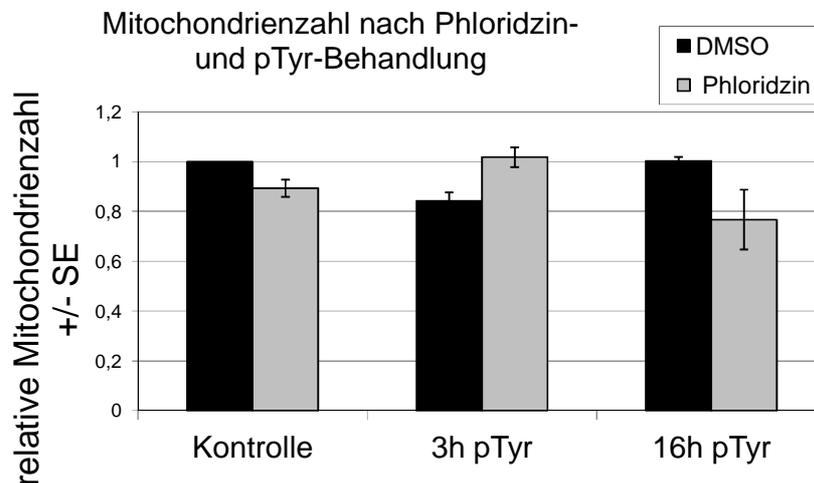


Abb. 3.21 Veränderung der Mitochondrienzahl nach pTyr-Behandlung über einen Zeitraum von 0 bis 16 Stunden in Kombination mit Phloridzin

Konfluente A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit Phloridzin (500 μ M) behandelt und anschließend für 3 oder 16 Stunden mit 10 μ M pTyr inkubiert. Die fixierten Zellen wurden mit MitoTracker Green FM gefärbt und mithilfe eines Durchflusszytometers gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE), die jeweils zur unbehandelten Kontrolle normiert wurden.

3.7 Effekte einer pTyr-Behandlung auf mitochondriale Proteine

Die Cytochrom-C-Oxidase (COX) ist ein wichtiges Protein der mitochondrialen Atmungskette und ist bei Eukaryoten aus 13 Untereinheiten zusammengesetzt. Eine dieser Untereinheiten, das von der mitochondrialen DNA kodierte Protein MTCO2 (COX2), benötigt für den Einbau in den COX-Komplex das TP53-abhängige, kernkodierte Protein SCO2 (Synthesis of Cytochrome C Oxidase 2) (Matoba et al. 2006).

3.7.1 Unterschiedliche Expressionsstärke von COX2 und SCO2 in TP53-wt und TP53-mut-Zellen

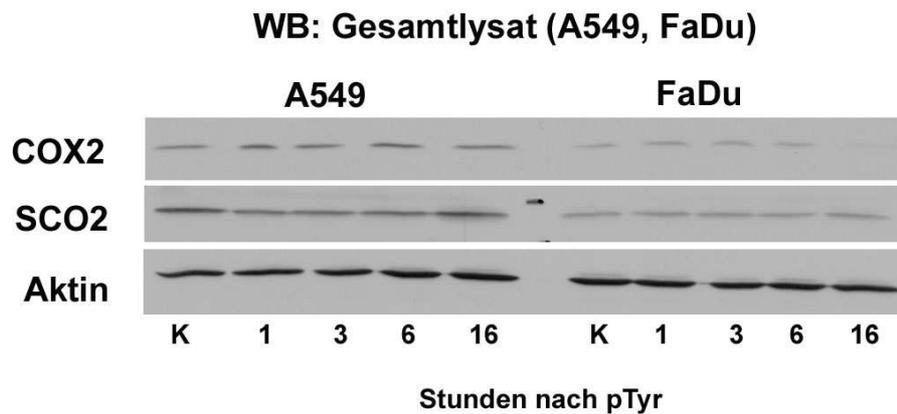
Da TP53-wt Zellen mehr Energie über mitochondriale Atmung erzeugen als TP53-mutierte Zellen, wurde mithilfe eines Western-Blots die Menge an COX2 und SCO2 der TP53-wt-Zelllinie A549 mit der TP53-mut-Zelllinie FaDu verglichen.

Bei der Western-Blot-Analyse stellte sich heraus, dass die COX2- und SCO2-Mengen in A549-Zellen deutlich höher sind als in den FaDu-Zellen (Abb. 3.22 A).

Ergebnisse

Auch in den A549PON-Zellen zeigten sich ähnliche Unterschiede. Während bei den A549PON-P53wt-Zellen die Menge an COX2 nach Bestrahlung, wie auch nach einer 16 stündigen pTyr-Behandlung, anstieg, lag das COX2 Level in den A549PON-P53mut Zellen deutlich niedriger. In den A549PON-P53mut-Zellen stieg das COX2-Level jedoch ebenfalls nach Bestrahlung etwas an, eine 16-stündige pTyr-Vorbehandlung konnte diesen Anstieg jedoch fast vollständig verhindern (Abb. 3.22 B).

(A)



(B)

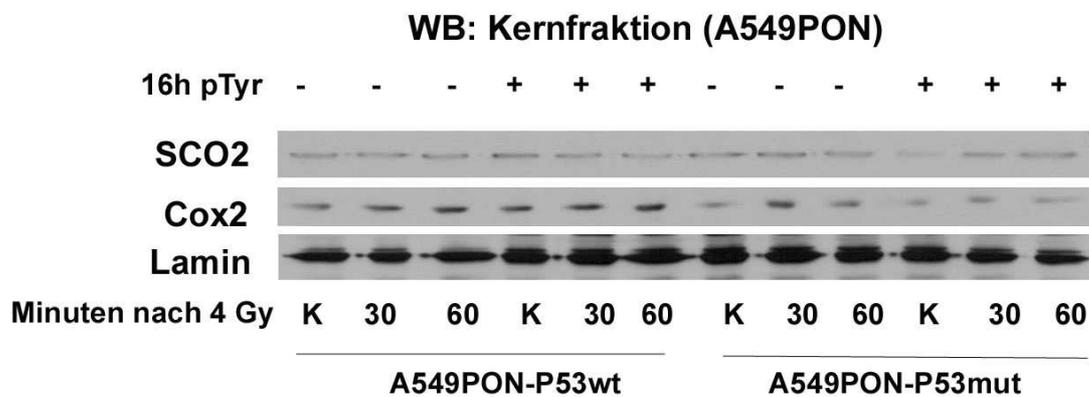


Abb. 3.22 COX2 und SCO2-Konzentration in A549, A549PON und FaDu-Zellen

Konfluente A549, FaDu (A) und A549PON-Zellen (B) wurden für 1, 3, 6 oder 16 Stunden mit 10 μ M pTyr behandelt und anschließend die Proteine isoliert und mithilfe eines Western-Blots analysiert.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

Ergebnisse

3.7.2 Effekt von pTyr auf die Proteinexpression der mitochondrialen Proteine COX2 und SCO2 in A549

Um den Effekt einer pTyr-Behandlung auf die mitochondrialen Proteine COX2 und SCO2 zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es in den ersten 6 Stunden zu Effekten auf die Proteinmengen von COX2 und SCO2 kommt.

In der Kernfraktion von A549 steigt das COX2-Level innerhalb der ersten 6 Stunden an und sinkt dann nach 16 Stunden wieder auf das Ausgangslevel zurück, während SCO2 im selben Zeitraum absinkt und ebenfalls nach 16 Stunden wieder die Ausgangsmenge erreicht (Abb. 3.23 A).

In der cytoplasmatischen Fraktion von A549 sinkt die Proteinkonzentration von COX2 in den ersten 3 Stunden deutlich ab und steigt dann nach 6 Stunden wieder auf den Anfangswert an. Das SCO2-Level liegt dagegen nach pTyr-Behandlung ab einer Stunde nach pTyr-Gabe fast durchgängig über dem Ausgangslevel (Abb. 3.23 B).

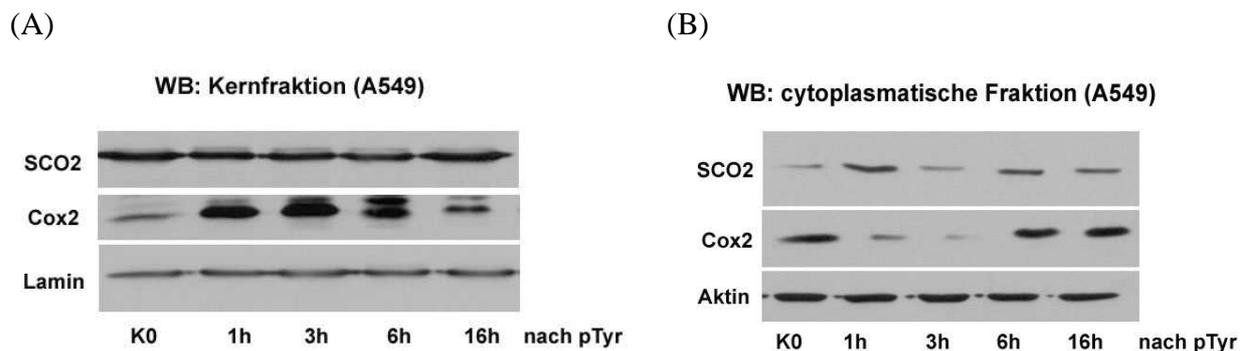


Abb. 3.23 COX2- und SCO2-Proteinkonzentrationen nach pTyr-Behandlung von A549-Zellen

Konfluente A549-Zellen wurden 1 bis 16 Stunden mit 10 μ M pTyr inkubiert und anschließend (A) die kernständige und (B) cytoplasmatische Proteinfraction isoliert und auf einem Western-Blot analysiert.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

In dem Fibroblasten-Zellstamm HSF7 (TP53-wt) zeigt sich in Western-Blot-Analysen ein erhöhter COX2-Level sowohl nach pTyr-Vorbehandlung, als auch nach Bestrahlung mit 4 Gray, in den ersten 3 Stunden. Erst 6 Stunden nach Bestrahlung übersteigt die COX2-Konzentration in den unbehandelten Zellen die der pTyr-vorbehandelten Zellen (Abb. 3.24).

Ergebnisse

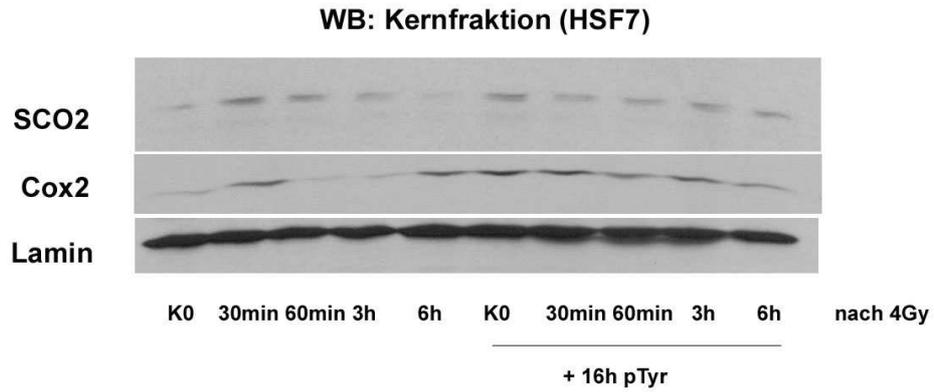


Abb. 3.24 COX2- und SCO2-Proteinkonzentrationen nach pTyr-Behandlung von HSF7-Zellen

Konfluente HSF7-Zellen wurden 16 Stunden mit 10 μ M pTyr inkubiert und anschließend mit 4 Gray bestrahlt. Nach entsprechender Inkubationszeit (30 min, 60 min, 3 Stunden oder 6 Stunden) wurde die kernständige- Proteinfraction isoliert und auf einem Western-Blot analysiert.

Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus zwei unabhängigen Versuchen mit gleicher Tendenz.

4. Diskussion

Radioprotektoren dienen im Bereich der Krebstherapie dazu, bei therapeutischen Bestrahlungen selektiv die gesunden Zellen vor den Auswirkungen der Bestrahlung zu schützen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkungsweise des Radioprotektors O-Phospho-L-Tyrosin (pTyr) auf molekularer Ebene näher untersucht.

4.1. Für die radioprotektive Wirkung von pTyr ist eine 16-stündige Vorbehandlung notwendig

Radioprotektoren sind in der Medizin von besonderer Bedeutung, da sie die Nebenwirkungen von Strahlentherapien deutlich reduzieren und somit die Lebensqualität der Betroffenen verbessern können. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine 16-stündige Vorbehandlung mit 10 μ M pTyr zu einer Radioprotektion von TP53-Wildtyp-Zellen führt (Dittmann et al. 2001b). Veröffentlichungen zu kürzeren Behandlungszeiten mit dieser Konzentration liegen nicht vor. Jedoch zeigte sich in anderen Studien, dass es bereits nach drei bis sechs Stunden zu molekularbiologischen Veränderungen in den behandelten Zellen kommt (Wanner 2008; Wanner et al. 2008).

In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es erst nach 16 Stunden Vorbehandlung mit dem Radioprotektor pTyr zu einer signifikanten Radioprotektion in A549-Zellen kommt. Die bereits früher beobachteten molekularbiologischen Veränderungen, wie die Stabilisierung von TP53 nach drei Stunden Präinkubation, stellen dabei vermutlich nur eine notwendige Teilreaktion der pTyr-Behandlung dar, die allein noch nicht ausreicht, um eine Strahlenprotektion zu ermöglichen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Effekte von pTyr innerhalb der notwendigen 16 Stunden Vorinkubationszeit gelegt.

4.2 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist nicht essentiell für die Wirkungsweise des Radioprotektors pTyr

Ziel dieser Arbeit war es u.a. die Wirkungsweise von pTyr auf die DNA-Reparatur zu untersuchen. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es nach pTyr-Inkubation zu einer Akkumulation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) im Zellkern kommt.

Dabei kommt es nach pTyr-Inkubation von Zellen innerhalb von 16 Stunden zur Phosphorylierung des EGFR am Aminosäurerest T654 und zur Akkumulation des EGFR im Zellkern (Dittmann et al. 2007; Wanner et al. 2008). Wird die Translokation des EGFR durch

Diskussion

Zugabe des EGFR-Inhibitors Cetuximab verhindert, so wird auch der radioprotektive Effekt von pTyr aufgehoben (Dittmann et al. 2007).

In verschiedenen Berichten wird beschrieben, dass die Liganden-unabhängige Modulation des Phosphorylierungsmusters des EGFR Src-abhängig über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) reguliert wird (Enan and Matsumura 1996; Kohle et al. 1999). Der AhR ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Bestrahlung oder durch die Bindung von aromatischen Kohlenwasserstoffen und anderen Chemikalien/ Toxinen aktiviert wird. Nach Aktivierung, ist der AhR in der Lage, eine Src-abhängige Signalkaskade zu aktivieren (Kahl et al. 1980; Enan and Matsumura 1996). Diese Informationen und die Feststellung, dass es nach pTyr-Gabe zu einer Akkumulation des AhR in dem Zellkern kommt, haben Gabriele Wanner in ihrer Dissertation 2008 dazu bewogen, die Vermutung aufzustellen, dass die Wirkungsweise von pTyr über den AhR zu Stande kommt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer pTyr- und strahlungsinduzierten Bindung von EGFR und AhR kommt. Zudem akkumuliert sowohl der EGFR wie auch der AhR nach pTyr-Behandlung im Nukleus.

Ein Knockdown des AhR konnte jedoch die radioprotektive Wirkung von pTyr nicht aufheben, im Gegensatz zum Knockdown des EGFR, wie in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden konnte (Dittmann et al. 2007). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Akkumulation des AhR durch pTyr und dem radioprotektiven Effekt konnte daher nicht gezeigt werden.

Dennoch zeigen die Daten auch deutlich, dass der AhR für das Gesamtüberleben nach Bestrahlung eine wichtige Funktion besitzt, denn der AhR-Knockdown reduzierte das Gesamtüberleben der Zellen nach Bestrahlung signifikant. Es ist daher davon auszugehen, dass die Phosphorylierung des EGFR nach pTyr-Inkubation nicht durch den AhR vermittelt wird.

4.3 pTyr induzierte Effekte auf die Chromatinstruktur von TP53-Wildtypzellen

Es ist bereits bekannt, dass es durch pTyr zu einer beschleunigten DNA-Reparatur nach ionisierender Bestrahlung kommt (Wanner et al. 2008). In diesem Zusammenhang konnte man ebenfalls beobachten, dass pTyr zu einer Akkumulation der DNA-PK, einem Schlüsselprotein der DNA-Reparatur, im Zellkern führt (Dittmann et al. 2007).

Diese Beobachtungen veranlassten uns zu der Annahme, dass pTyr einen direkten Einfluss auf die DNA und die Proteine der DNA-Reparatur hat.

Diskussion

Kommt es nach ionisierender Strahlung zu Schäden an der DNA, muss diese erst für Reparaturproteine zugänglich gemacht werden, denn die eukaryotische DNA ist mithilfe verschiedener Histone in eine kompakte aber dynamische Chromatinstruktur verpackt, welche sie für Proteine schwer zugänglich macht (Kornberg 1974; Kornberg and Thomas 1974).

Eine sehr bekannte Histon-Modifikation nach ionisierender Bestrahlung ist die Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX, welche auch für die Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) genutzt wird. Die Phosphorylierung von H2AX bereitet die Bindestellen für DNA-Reparatur-Proteine an die DNA in einem Bereich von 2 Mbp um einen DSB herum vor. Anschließend kommt es zur Hyperacetylierung der Histone H3 und H4, was zur Öffnung und zur Relaxation der DNA führt. Dies ist für eine effektive Reparatur der DNA-Schäden notwendig (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999; Paull et al. 2000). Die Acetylierung der Histone H3 und H4 stellt somit einen limitierenden Faktor für die DNA-Reparatur dar (Wang and Hayes 2008; Choi and Howe 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einem deutlichen Anstieg der Acetylierung/ Phosphorylierung an Histon H3 (K9 / S10) nach pTyr-Präinkubation oder Bestrahlung in allen untersuchten TP53-Wildtypzellen kam. Dieser Einfluss von pTyr auf die Acetylierung/ Phosphorylierung des Histons H3 ermöglicht eine Öffnung der Chromatinstruktur auch ohne Bestrahlung und dadurch einen schnelleren Zugang für Reparatur-Proteine an die DNA nach ionisierender Strahlung. Jedoch zeigte sich beim zeitlichen Verlauf der Acetylierung/ Phosphorylierung des Histons H3 (K9 / S10) nach pTyr-Behandlung bereits ein starker Anstieg ab drei Stunden Inkubationszeit. Da jedoch im Vorfeld bereits gezeigt werden konnte, dass für den vollständigen protektiven Effekt von pTyr drei Stunden Präinkubation nicht ausreichend sind, scheint auch die Acetylierung/ Phosphorylierung des Histon H3 (K9 / S10) nur ein weiterer Effekt von pTyr in einem komplexen Wirkungsspektrum zu sein und passt vom zeitlichen Auftreten zu bereits bekannten molekularen Effekten von pTyr.

Ein Anstieg der Acetylierung/ Phosphorylierung des Histons H3 (K9 / S10) durch pTyr konnte jedoch nicht in den untersuchten TP53-mutierten Zellen beobachtet werden (FaDu, A549PON-P53mut). Dies könnte darin begründet sein, dass das Grundlevel an Acetylierung in den untersuchten TP53-mutierten Zellen bereits höher lag als in den TP53-Wildtypzellen.

Für die Acetylierung von Histonen an DNA-Schäden oder für die Transkription und Translation der DNA sorgen Histon-Acetyltransferasen (HATs). Diese hyperacetylieren nach Aktivierung spezifische Histone, was zur Entspannung und Öffnung der DNA-Struktur führt und diese für Reparaturproteine zugänglich macht (Yang and Seto 2007).

Diskussion

Aufgrund von Daten anderer Studien war zu vermuten, dass für die Acetylierung des Histons H3 an Lysin 9 am wahrscheinlichsten zwei HATs in Frage kamen: Die Acetyltransferase P300 oder Tip60.

P300 und sein Paralog CBP (CREB binding protein) gehören zur KAT3-Familie der humanen Acetyltransferasen. Defekte in der Acetylasefunktion von P300 haben schwere Auswirkungen für die Zelle, da P300 durch seine Acetylasefähigkeit nicht nur eine wichtige Funktion bei der Reparatur von DSBs besitzt, sondern u. a. auch als Transkriptionsfaktor wirkt (Ogryzko et al. 1996).

Als weiterer Kandidat wurde Tip60 untersucht. Tip60 ist eine Acetyltransferase aus der größten Familie der humanen Acetyltransferasen, der MYST-Familie (Carrozza et al. 2003; Squatrito et al. 2006). Über Tip60 und P300 ist bekannt, dass sie Lysine der Histone H3 und H4 nach DNA-Doppelstrangbrüchen acetylieren und somit u. a. den Reparaturproteinen Ku70, Ku80 und letztlich der DNA-PK den Zugang zu den DSBs ermöglichen (Kimura and Horikoshi 1998; Bird et al. 2002; Downs et al. 2004; Kusch et al. 2004; Sun et al. 2005; Murr et al. 2006; Tang et al. 2006; Sun et al. 2007; Lin et al. 2009).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es weder nach pTyr-Inkubation noch nach Bestrahlung zu einer Steigerung der Aktivität von P300 kommt. Gleichzeitig konnte jedoch festgestellt werden, dass Tip60 nach pTyr-Inkubation oder Bestrahlung sowohl im Zellkern akkumuliert als auch eine gesteigerte Aktivität aufweist. Zudem konnte eine verstärkte Bindung zwischen Histon H3 und Tip60 sowohl nach Bestrahlung als auch pTyr-Präinkubation beobachtet werden.

Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass die gesteigerte Acetylierung von Histon H3 nach pTyr-Inkubation durch die Histon-Acetyltransferase Tip60 verursacht wird.

Dittmann et al. haben 2011 in ihrer Arbeit zeigen können, dass es nach EGFR-Knockout zu keiner strahlungsinduzierten Aktivität von Tip60 und auch nicht zur Histon H3-Acetylierung/-Phosphorylierung an K9/ S10 kommt. Demnach ist zu vermuten, dass die pTyr vermittelte Phosphorylierung des EGFR zur Akkumulation und Aktivierung von Tip60 im Zellkern führt, welches dort für die steigende Acetylierung/ Phosphorylierung von Histon H3 an Lysin 9 bzw. Serin 10 verantwortlich ist.

Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen Tip60 und TP53. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass für die Produktion eines aktiven P21 TP53 am Lysin 120 acetyliert werden muss. Für diese Acetylierung ist Tip60 notwendig (Sho et al. 2011; Naidu et al. 2012).

Diskussion

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Akkumulation und Aktivität von Tip60 nach pTyr-Behandlung in dieser Studie, so sieht man auch hier, dass für die maximale Proteinmenge und Aktivität eine Präinkubationszeit von 16 Stunden notwendig ist. Jedoch ist bereits nach einer Stunde pTyr-Behandlung ein Anstieg der Tip60-Konzentration als auch dessen Aktivität zu beobachten. Diese schnellen Effekte nach pTyr-Behandlung scheinen entweder noch nicht auszureichen für einen signifikanten protektiven Effekt oder es sind noch weitere zelluläre Vorgänge notwendig, um die Zellen ausreichend auf eine Bestrahlung vorzubereiten.

4.4 pTyr beeinflusst den Metabolismus der Zelle

Die bisher schon bekannten Effekte von pTyr auf die Chromatinstruktur, der Transport von Proteinen aus der Zellmembran in den Kern oder auch die Aktivierung von Proteinen sind Energie verbrauchende Prozesse. Es war daher zu erwarten, dass pTyr auch einen starken Einfluss auf den Metabolismus besitzt.

Zellen ziehen Ihre Energie primär aus Glukose, welche sie aus ihrer unmittelbaren Umgebung aufnehmen und diese dann auf verschiedenen Wegen in den Energieträger ATP umwandeln, der für die einzelnen zellulären Effekte als direkter Energielieferant zur Verfügung steht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach pTyr-Inkubation in den ersten Stunden die ATP-Menge in den Zellen signifikant steigt. Diese vermehrte Produktion an ATP kann mehrere Ursachen haben, zum einen kann die Zelle einen erhöhten Bedarf an ATP besitzen oder einen verringerten Abbau. Aufgrund des Anstiegs der AMPK-Phosphorylierung ist aber zu vermuten, dass das Verhältnis von AMP:ATP gestiegen ist. Dies wird durch den Sensor AMPK wahrgenommen und die Produktion von mehr ATP veranlasst (Towler and Hardie 2007). Nach 16 Stunden Vorbehandlung sinkt die ATP-Menge in den Zellen jedoch wieder nahezu auf den Ausgangslevel ab. Dies bestätigt die Vermutung, dass die pTyr-Effekte auf die Zelle, die zur Vorbereitung des radioprotektiven Effekts notwendig sind, nach 16 Stunden abgeschlossen zu sein scheinen.

Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung kommt es zu einem kurzzeitigen Absinken des ATP-Gehalts in den Zellen, der sog. ATP-Krise. Diese verläuft in den Zellen, die zuvor mit pTyr vorbehandelt wurden, etwas flacher als in den unbehandelten Zellen und der ATP-Level liegt auch über den gesamten Untersuchungszeitraum über dem der Kontrolle.

Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die Effekte von pTyr vor der Bestrahlung viele energieaufbrauchende Prozesse, die ansonsten nach der Bestrahlung beginnen, bereits im Vorfeld abgeschlossen waren, wie beispielsweise die Öffnung der Chromatinstruktur.

Diskussion

Durch den steigenden Energiebedarf der Zellen und der dafür notwendigen Bereitstellung von ATP benötigt die Zelle auch eine erhöhte Menge an Glukose als Energielieferanten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach pTyr-Behandlung die Glukoseaufnahme gegenüber den unbehandelten Zellen erhöht war, nach 16 Stunden pTyr-Präinkubation war die Differenz der Glukoseaufnahme zwischen den unbehandelten Zellen und denen mit pTyr-Behandlung am höchsten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine pTyr-Behandlung direkt oder indirekt die Glukoseaufnahme erhöht und somit der Zelle größere Mengen an Energie in Form von ATP für weitere energieaufbrauchende Prozesse der Zelle zur effektiven Vorbereitung auf eine Strahlenexposition zur Verfügung stehen.

Zur Aufnahme von Glukose stehen den Zellen prinzipiell zwei Familien an Glukose-Transportern zur Verfügung. Zum einen die trägerproteinvermittelten Glukose-Uniports (GLUTs), die Glukose entlang des Konzentrationsgradienten transportieren und zum anderen die Natrium-Glukose-Kotransporter-Familie (SGLTs). Über den Glukosetransporter SGLT-1 ist aus anderen Studien bekannt, dass dieser kolokalisiert mit dem EGFR in der Zellmembran vorliegt (Engelman and Cantley 2008; Weihua et al. 2008). Da die Effekte von pTyr auf den EGFR schon lange bekannt sind, wurde vermutet, dass die Erhöhung der Glukoseaufnahme nach pTyr-Behandlung möglicherweise über den SGLT-1 vermittelt wird (Dittmann et al. 2007). Diese Annahme konnte in dieser Arbeit bestärkt werden, da nach Zugabe des SGLT-1-Inhibitors Phloridzin die Glukoseaufnahme nach pTyr reduziert werden konnte. Es ist daher zu vermuten, dass pTyr auf den Gesamtkomplex von EGFR und SGLT-1 aktivierend wirkt, wodurch einerseits über den SGLT-1 mehr Glukose in die Zellen transportiert wird und andererseits der aktivierte EGFR in den Zellkern wandert, wo er Effekte auf die DNA-Reparatur hat. In dieser Arbeit konnten auch die Ergebnisse von Weihua et al. 2008 bestätigt werden, dass in Zellen, in denen der SGLT-1 hoch reguliert ist, ebenfalls die Expression des EGFR verstärkt ist.

Zudem wirkt der SGLT-1-Inhibitor Phloridzin auch negativ auf den Effekt von pTyr auf die Acetylierung/ Phosphorylierung des Histons H3 (K9 / S10). So führt eine 24-stündige Phloridzin-Behandlung allein zwar zu einer Acetylierung des Histons H3 (K9 / S10), in Kombination mit pTyr sinkt diese jedoch sehr schnell ab. Es scheint somit so, als würde Phloridzin dem pTyr-Effekt entgegenwirken. Die Aufnahme von Glukose mithilfe des SGLT-1-Transporters scheint somit essentiell für den pTyr-Effekt zu sein.

Diskussion

Zellen wandeln aufgenommene Glukose unter aeroben Bedingungen primär über zwei mögliche Wege in ATP um: zum einen über die Atmungskette, zum anderen über die Laktatproduktion.

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte von pTyr auf die Atmungskette untersucht, da Zellen mit Wildtyp-TP53 primär ihre Energie über die Atmungskette gewinnen und der radioprotektive pTyr-Effekt bisher nur bei TP53-Wildtypzellen zu beobachten war (Warburg 1956a; Pedersen 2007; Yeung et al. 2008; Madan et al. 2011).

Für die Atmungskette ist die Funktion der Mitochondrien von essentieller Bedeutung, denn sowohl die Elektronentransportkette (Atmungskette) als auch die ATP-Synthase sind an der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert (Kadenbach 2003). Die ATP-Synthase wird dabei von einem Protonengradienten angetrieben, der über der mitochondrialen Membran liegt und dessen Kraft zum größten Teil in Form des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) gespeichert ist. Die effektive Funktion der Mitochondrien ist dabei abhängig von einem stabilen MMP. Sinkt das MMP rapide ab, so führt dies meist zur Induktion der Apoptose, während ein Anstieg zur Hyperpolarisation und somit zu einer erhöhten Produktion von ROS führt (Gottlieb et al. 2003; Suski et al. 2012).

Bei der Untersuchung von Effekten von pTyr auf das MMP konnte ein leichtes Absinken über den Zeitraum von 16 Stunden beobachtet werden. Dieses Absinken ist jedoch noch weit über der Depolarisationskontrolle mit CCCP, einem Blocker der Elektronentransportkette. Es ist daher davon auszugehen, dass dieses erniedrigte MMP noch keine Apoptose einleitet, sondern nur eine Stabilisierung darstellt. Eine Initiation der Apoptose würde auch zu einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit nach pTyr-Inkubation führen, dies konnte jedoch bei der verwendeten Konzentration in vorangegangenen Untersuchungen nicht beobachtet werden.

Das stabilisierte MMP verändert sich auch nach ionisierender Bestrahlung in den durchgeführten Untersuchungen nicht mehr, während es in den unbehandelten Zellen zu einem rapiden Abfall des MMPs nach Bestrahlung kommt und dieses dann wieder auf den Level der mit pTyr-vorbehandelten Zellen ansteigt. Dieser vorübergehende starke Abfall des MMPs in den unbehandelten Zellen erklärt den stärkeren Abfall des ATP-Levels der unbehandelten Zellen nach Bestrahlung. Das reduzierte MMP könnte jedoch auch in einer reduzierten Anzahl von Mitochondrien begründet sein. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit auch die Auswirkungen von pTyr auf die Zahl an Mitochondrien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zahl der Mitochondrien in den ersten drei Stunden nach pTyr-Behandlung sank, nach 16 Stunden jedoch wieder das Ausgangsniveau erreichte. Das stark erniedrigte MMP nach 16 Stunden pTyr-Inkubation resultiert daher nicht aus einer reduzierten

Diskussion

Zahl von Mitochondrien. Eine mögliche Erklärung wäre eine pTyr-assoziierte Abschaltung der Mitochondrien.

Der frühe Effekt auf die Mitochondrienzahl nach pTyr-Inkubation konnte sowohl bei der TP53-Wildtyp-Krebszelllinie A549 als auch bei den Hautfibroblasten HSF7 nachgewiesen werden. Die Krebszelllinie FaDu, die ein mutiertes TP53 besitzt, zeigte dagegen einen Anstieg der Mitochondrienzahl nach pTyr-Behandlung.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Mitochondrienzahl und das MMP in den ersten Stunden sinkt, während der ATP-Level zeitgleich ansteigt, ist davon auszugehen, dass der Anstieg des ATP-Levels nach pTyr-Behandlung nicht über die mitochondriale Atmung erzeugt wird. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass eine Reduktion der mitochondrialen Atmung einen positiven Effekt auf das Zellüberleben nach Bestrahlung hat. Dies scheint vor allem darin begründet zu sein, dass beschädigte oder hyperpolarisierte Mitochondrien zu einer verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen, welche für die Zelle sehr schädliche Folgen haben (Suski et al. 2012). Der beobachtete Einfluss von pTyr auf die Zahl und Aktivität der Mitochondrien verhindert eine erhöhte Produktion von ROS nach Bestrahlung und wirkt dadurch radioprotektiv. Den höheren Glukoseverbrauch, den die Zellen durch eine Umstellung auf Laktatproduktion besitzen, gleichen sie über eine erhöhte Glukoseaufnahme mithilfe des SGLT-1-Transporters aus.

Nach Bestrahlung mit 4 Gray konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass es in A549-Zellen zu einem Anstieg der Mitochondrien über einen Zeitraum von 48 Stunden kam, es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu geben scheint.

Bei den FaDu-Zellen ist nur in der unbestrahlten Kontrolle eine erhöhte Mitochondrienzahl in den pTyr-vorbehandelten Zellen zu beobachten, anschließend sinkt in den pTyr-behandelten Zellen die Mitochondrienzahl auf den Level der unbehandelten ab und bleibt dann über 48 Stunden stabil.

Alle molekularen für die Radioprotektion relevanten Prozesse finden daher vor der Bestrahlung innerhalb der 16-stündigen pTyr-Vorbehandlungszeit statt.

Das Absinken der Mitochondrienzahl innerhalb der ersten 6 Stunden nach pTyr-Gabe kann verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche Ursache des schnellen Absinkens der Mitochondrienzahl kann Mitophagie sein. Bei der Mitophagie handelt es sich um eine selektive Form der Autophagie bei der Mitochondrien abgebaut werden und die Bestandteile zurück in den Stoffwechsel fließen.

Diskussion

Die selektive Elimination von beschädigten oder in Überzahl vorhandenen Mitochondrien durch Mitophagie ist einer der bedeutendsten Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle (Lemasters 2005; Kim et al. 2007).

Als Initiatorprotein der Autophagie ist AMPK bekannt. AMPK wird bei ATP-Mangel oder Umweltstress phosphoryliert und ist danach in der Lage, ULK1 durch Phosphorylierung zu aktivieren. ULK1 gilt als ein Initiatorprotein der allgemeinen Autophagie und, über die Aktivierung von Atg13, im Besonderen auch für die Mitophagie (Huang and Snider 1995; Wang et al. 2001; Kundu et al. 2008; Joo et al. 2011).

Nach pTyr-Inkubation kommt es bereits nach einer Stunde zu einem deutlichen Anstieg von pAMPK in A549-Zellen. Zum selben Zeitpunkt beginnt die Mitochondrienzahl signifikant zu sinken. Diese Korrelation unterstützt die Annahme, dass es nach pTyr-Inkubation anfänglich zu einem Anstieg der Mitophagie kommt, was zum Absinken der Mitochondrienzahl führt.

Eine weitere Bestätigung dieser Annahme lässt sich über die Ergebnisse von Studien zur E3-Ligase Parkin finden. Kommt es zum Absinken des mitochondrialen Membranpotentials (MMP), so führt dies zur Stabilisierung des mitochondrialen Außenmembranproteins PINK1, einer Kinase, deren Signale zur Rekrutierung von Parkin zum Mitochondrium führen (Narendra et al. 2008; Matsuda et al. 2010; Vives-Bauza et al. 2010). Unter physiologischen Bedingungen liegt Parkin inaktiv im Cytosol vor, bei physiologischem und pathologischem Stress translokalisiert es jedoch PINK1-abhängig in die beschädigten Mitochondrien, wo es mitochondriale Proteine wie VDAC1, Mfn1, Mfn2 und weitere Proteine ubiquitiniert (Gegg et al. 2010; Geisler et al. 2010; Matsuda et al. 2010; Poole et al. 2010; Ziviani et al. 2010).

Kommt es in A549-Zellen zu einer Blockierung des SGLT-1 durch den Inhibitor Phloridzin, so sinkt auch die Zahl der Mitochondrien. Die Ursache könnte in einem gedrosselten Stoffwechsel der Zellen aufgrund des Nährstoffmangels liegen oder in einer Induktion der Mitophagie auf Grund des Glukosemangels.

Werden die mit Phloridzin vorbehandelten Zellen zusätzlich mit pTyr inkubiert, so kommt es nach drei Stunden zu einem kurzzeitigen Anstieg der Mitochondrien. Dies lässt sich durch den steigenden Energiebedarf der Zelle erklären. Die Inhibierung des SGLT-1 reduziert die Aufnahme von Glukose in die Zelle stark, so dass diese versucht, vermehrt Energie über die effiziente mitochondriale Atmung zu gewinnen.

Eine Vorbehandlung mit dem SGLT-1-Inhibitor Phloridzin führte in A549-Zellen zu einer Erniedrigung der Mitochondrienzahl. Da es durch die Inhibierung des SGLT-1 zu einer

Diskussion

reduzierten Versorgung der Zellen mit Glukose kommt, könnte dies ein Zeichen dafür sein, dass die Zellen ihren Metabolismus gedrosselt haben.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass pTyr Einfluss auf die mitochondriale Aktivität und Zahl nimmt, wurden auch die molekularen Effekte auf mitochondriale Proteine überprüft.

Die Cytochrom-C-Oxidase (COX) stellt einen bedeutenden Proteinkomplex der mitochondrialen Atmungskette dar. Eine der 13 Untereinheiten dieses Komplexes, COX-2, konnte in dieser Arbeit als TP53-Wildtyp-abhängig beobachtet werden. Dies bestätigt die Studie von Matoba et. al., die 2006 in Ihrer Studie veröffentlichten, dass sie in TP53-Null-Zellen eine um 25 % herabgesetzte COX-Aktivität messen konnten.

Der Faktor SCO2, der für den Einbau von COX2 in den COX-Komplex notwendig ist, wird durch TP53-Wildtyp induziert. Eine TP53-Mutation führt aber nach der Studie von Matoba et. al., 2006 nicht immer zu einer Veränderung des Proteinlevels, was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

Wir konnten in dieser Arbeit zudem zeigen, dass eine Behandlung von TP53-Wildtyp-Zellen mit pTyr auch auf molekularer Ebene Effekte auf das Proteinlevel von COX2 und SCO2 hat. Wie schon bei der Messung der Mitochondrienzahl, die innerhalb der ersten 16 -Stunden-Behandlungszeit zuerst sank und dann wieder das Ausgangslevel erreichte, verläuft das COX2-Proteinlevel in der cytoplasmatischen Fraktion parallel.

Der kurzzeitige Verlust an COX2 wird jedoch von den Zellen schnell durch eine erhöhte Translation von COX2 im Endoplasmatischen Retikulum, welches sich in der gezeigten Kernfraktion befindet, und die steigende Proteinmenge des Einbaufaktors SCO2 im Cytoplasma ausgeglichen.

Dieser Abbau von Mitochondrien durch Mitophagie und die anschließende Neusynthese von Mitochondrien, welche jedoch ein verringertes Potential (geringere Aktivität) aufweisen, senkt das Risiko der Zellen vor erhöhten Mengen an ROS durch defekte oder hyperpolarisierte Mitochondrien. Zusätzlich ist die ATP-Gewinnung über die Laktatatmung deutlich schneller als die der mitochondrialen Atmung.

Der Wechsel von mitochondrialer Atmung zu Laktatatmung wird zudem durch eine erhöhte Menge an Glukosetransportern in der Zellmembran verstärkt. Dies konnte auch in dieser Arbeit durch den Anstieg des Glukosetransporters SGLT-1 beobachtet werden (Liu et al. 2010).

Diskussion

Zellen sind durch pTyr-Behandlung somit in der Lage, nach erfolgter Schädigung der DNA diese schneller zu reparieren und zusätzlich das Risiko vor weiteren Schäden durch ROS zu verringern.

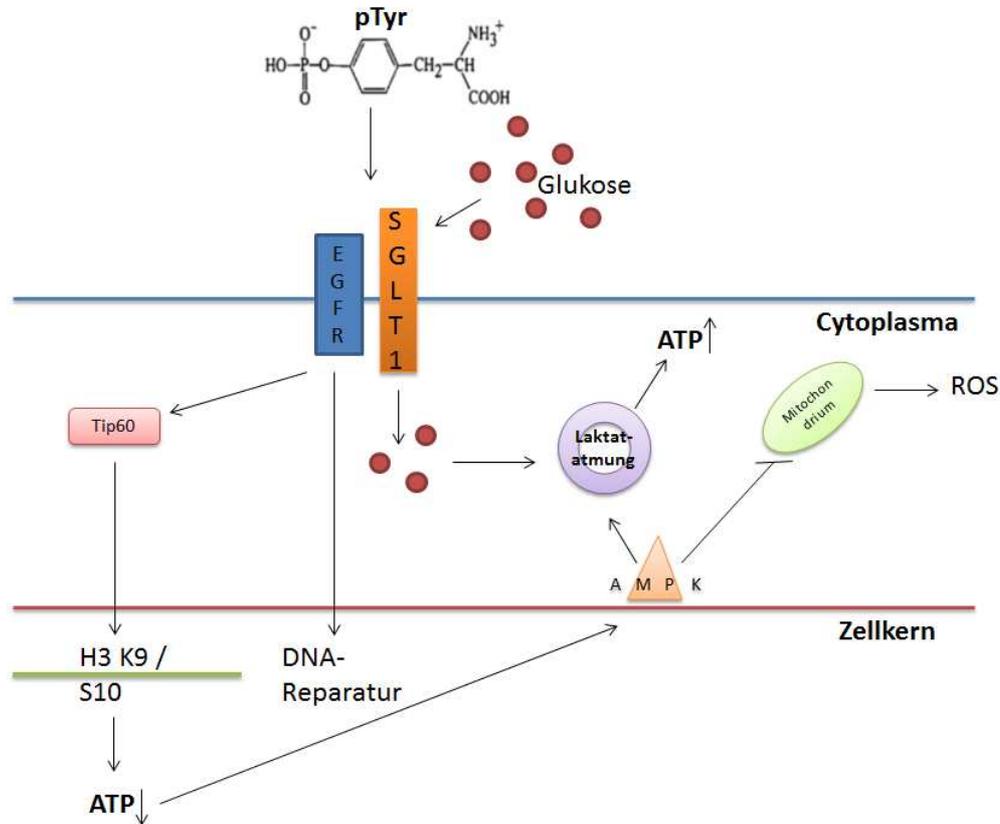


Abb. 4.1: Wirkungsweise von pTyr in TP53-Wildtypzellen

Schematische Darstellung der bisher bekannten Effekte von pTyr in TP53-Wildtypzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen neue und komplexe Wirkungsweisen des Radioprotektors pTyr auf. Dabei sind zwei große Wirkungsspektren besonders hervorzuheben: zum einen die Wirkung auf den Metabolismus der Zelle, der die schon lange bekannte TP53-Abhängigkeit von pTyr erklären kann und zum anderen die Wirkung auf die Chromatinstruktur, welche die ebenfalls schon früher beobachteten Effekte auf die DNA-Reparatur erklären kann.

Diese neuen Erkenntnisse unterstreichen noch einmal das Potential dieses schon länger bekannten Radioprotektors für die Behandlung von Krebspatienten im Vorfeld einer Strahlentherapie. Zukünftig könnte dies die Lebensqualität der Patienten durch eine Verringerung der Nebenwirkungen der Strahlentherapie verbessern und die Therapieerfolge verstärken.

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Krebstherapie stellt die Strahlentherapie einen sehr wichtigen Teil der aktuellen medizinischen Behandlungen dar. Etwa die Hälfte aller Krebspatienten wird neben weiteren therapeutischen Maßnahmen, wie Operationen oder Chemotherapie, mit Strahlung behandelt. Es ist durch verbesserte Algorithmen und Geräte mittlerweile möglich, die Dosis und den zu bestrahlenden Bereich sehr präzise einzugrenzen. Dennoch wird noch immer auch gesundes Gewebe bestrahlt. Um die Nebenwirkungen der Strahlentherapie im umliegenden gesunden Gewebe so niedrig wie möglich zu halten, können Radioprotektoren eingesetzt werden. Ein sehr aussichtsreicher Kandidat ist dabei das in dieser Arbeit näher untersuchte O-Phospho-L-Tyrosin (pTyr).

Es konnte hier gezeigt werden, dass eine 16-stündige Vorinkubation mit pTyr zu einer effektiven Radioprotektion der TP53-Wildtypzelllinie A549 führt. Bei kürzeren Behandlungszeiten konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Vorangegangene Untersuchungen mit pTyr hatten gezeigt, dass es nach einer Inkubation von Zellen mit pTyr zu einer Akkumulation des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) und des Aryl-Hydrokarbon-Rezeptors (AhR) im Zellkern kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung bestätigt werden und außerdem festgestellt werden, dass es zu einer Bindung zwischen dem AhR und dem EGFR nach pTyr-Behandlung kommt.

Jedoch zeigte ein AhR-Knockdown deutlich, dass das durch eine pTyr-Vorbehandlung verbesserte klonogene Überleben nach Bestrahlung nicht vom AhR abhängig ist. Allerdings scheint der AhR bedeutend für das Gesamtüberleben nach ionisierender Strahlung zu sein.

Stattdessen konnte diese Arbeit zeigen, dass eine pTyr-Behandlung in TP53-Wildtypzellen zu einer verstärkten Öffnung der DNA durch eine verstärkte Acetylierung/ Phosphorylierung an Histon H3 (K9/ S10) ohne vorige Bestrahlung führt. Die Öffnung der DNA ist eine wichtige Voraussetzung, damit Reparaturproteine an DNA-Schäden gelangen und diese beheben können. Dieser Effekt konnte bei den untersuchten TP53-mutierten Zelllinien jedoch nicht beobachtet werden, da diese von vornherein ein höheres Acetylierungslevel aufwiesen als die TP53-Wildtypzellen.

Diese Acetylierung an Histon H3 konnte in dieser Arbeit in Zusammenhang mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 gebracht werden. Nach pTyr-Inkubation akkumuliert Tip60 ebenfalls in dem Zellkern und zeigt eine gesteigerte Aktivität, was bei der ebenfalls untersuchten Acetyltransferase P300 nicht beobachtet werden konnte.

Da die bereits bekannten pTyr-Effekte sehr energieaufwendige Signalkaskaden in Gang setzen und zudem auch ein Zusammenhang zwischen TP53 und der mitochondrialen Atmung

Zusammenfassung

bekannt ist, wurden in dieser Arbeit auch die Effekte von pTyr auf den Metabolismus näher untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die TP53-Wildtypzellen nach pTyr-Behandlung eine erhöhte Aufnahme an Glukose aufwiesen, welche über den Glukosetransporter SGLT-1 stattfand und zu einem vorübergehend erhöhten ATP-Level führte. Gleichzeitig sank jedoch das mitochondriale Membranpotential ab, was für eine reduzierte Aktivität der Mitochondrien spricht. Die Anzahl an Mitochondrien sank ebenfalls kurzzeitig ab, stabilisierte sich nach 16 Stunden jedoch wieder.

Die Ursache liegt vermutlich darin, dass die Zellen ihre Energiegewinnung von mitochondrialer Atmung auf die bei Bestrahlung stabilere Laktatfermentation verschieben.

Der vorübergehende Abfall der Mitochondrienzahl ist wahrscheinlich durch Mitophagie bedingt, hierfür spricht auch der beobachtete Anstieg des Autophagie-Initiatorproteins AMPK. Das vorübergehende Absinken der Mitochondrienzahl konnte auch auf molekularer Ebene auf der Basis des Proteinlevels der Cytochrom-C-Oxidase 2 (COX2) und dessen für den Einbau in den COX-Komplex notwendigen Faktor SCO2 bestätigt werden.

Offenbar führt eine pTyr-Inkubation zu einem Abbau von wahrscheinlich älteren oder defekten Mitochondrien und einer anschließenden Neusynthese. Gleichzeitig wird aber die Aktivität der Mitochondrien herabgesetzt, was die Zellen vor einem erhöhten ROS-Level nach Bestrahlung schützt. Die Zelle wird ihre notwendige Energie stattdessen durch die Glykolyse decken, für die sie aufgrund der herabgesetzten Effektivität eine gesteigerte Menge an Glukose aufnimmt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass pTyr sowohl einen positiven Einfluss auf die DNA-Reparatur hat, als auch Einfluss auf den Metabolismus der TP53-Wildtypzellen ausübt und ihnen damit bessere Voraussetzung schafft, wenn es anschließend zu einer Bestrahlung der Zellen kommt.

Es ist zu hoffen, dass diese Erkenntnisse in Zukunft zu einer nebenwirkungsärmeren und sogar effektiveren Strahlentherapie von Krebspatienten führen werden.

6. Abkürzungen

Abb	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AhR	Arylhydrokarbonrezeptor
AMPK	AMP-activated protein kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Arylhydrocarbonreceptor-Nuclear-Translocator
ATP	Adenosintriphosphat
BBI	Bowman-Birk-Proteaseinhibitor
BER	Basen-Excisionsreparatur
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbeccos` s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
ECL	Enhanced Chemolumineszenzreaktion
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzyme linked immunabsorbent assay
FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Foetales Kälberserum
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HEPES	2-(4-2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl1)- Ethansulfonsäure
HSF	Humane Hautfibroblasten
IP	Immunpräzipitation
IR	Ionisierende Strahlung
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	mitochondriales Membranpotential
MMR	Mismatch-Reparatur
Mut	Mutation
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NER	Nukleotid-Excisionsreparatur
NHEJ	nicht homologes Endjoining
M	Molar

Literaturverzeichnis

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PTM	posttranslationale Modifikation
pTyr	O-Phospho-L-Tyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCO2	synthesis of cytochrome-c-oxidase 2
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SE	Standardfehler
SF	Überlebensrate
SGLT	Natrium-Glukose-Kotransporter-Familie
siRNA	small interfering RNA
TEMED	N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TMRE	Tetramethylrhodamin-Ethyl-Ester
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt

7. Literaturverzeichnis

- Altenberg B, Greulich KO (2004) Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84:1014-1020 doi: 10.1016/j.ygeno.2004.08.010
- Balaban RS (1990) Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* 258:C377-389
- Barski A et al. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823-837 doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009
- Bassing CH et al. (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8173-8178 doi: 10.1073/pnas.122228699
- Bensaad K, Vousden KH (2007) p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 17:286-291 doi: 10.1016/j.tcb.2007.04.004
- Bird AW et al. (2002) Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 419:411-415 doi: 10.1038/nature01035
- Birk Y (1985) The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res* 25:113-131
- Bourgier C, Levy A, Vozenin MC, Deutsch E (2012) Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics? *Cancer Metastasis Rev* 31:699-712 doi: 10.1007/s10555-012-9381-9
- Braunschweiger PG, Basrur V, Santos O, Adessa A, Houdek P, Markoe AM (1996) Radioresistance in murine solid tumors induced by interleukin-1. *Radiat Res* 145:150-156
- Carrier F et al. (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 19:1673-1685
- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* 19:321-329 doi: 10.1016/S0168-9525(03)00115-X
- Celeste A et al. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675-679 doi: 10.1038/ncb1004
- Celeste A et al. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296:922-927 doi: 10.1126/science.1069398
- Choi JK, Howe LJ (2009) Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol* 87:139-150 doi: 10.1139/O08-112

Literaturverzeichnis

- Cohen HY et al. (2004) Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 13:627-638
- Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK (2009) CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459:113-117 doi: 10.1038/nature07861
- de Wit E, van Steensel B (2009) Chromatin domains in higher eukaryotes: insights from genome-wide mapping studies. *Chromosoma* 118:25-36 doi: 10.1007/s00412-008-0186-0
- DeBerardinis RJ (2008) Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet Med* 10:767-777 doi: 10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b
- Dechassa ML, Luger K (2011) Nucleosomes as control elements for accessing the genome. In *Genome Organization & Function in the Cell Nucleus*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co:pp. 55–87
- Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV (2010) Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9660-9664 doi: 10.1073/pnas.1002298107
- Dittmann K, Löffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1995) Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiother Oncol* 34:137-143 doi: 016781409401494N [pii]
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Kehlbach R, Rodemann HP (2010) Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654. *FEBS Lett* 584:3878-3884 doi: S0014-5793(10)00641-1 [pii]
10.1016/j.febslet.2010.08.005
- Dittmann K, Mayer C, Wanner G, Kehlbach R, Rodemann HP (2007) The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor- and DNA-dependent kinase phosphorylation. *Radiother Oncol* 84:328-334 doi: S0167-8140(07)00351-9 [pii]
10.1016/j.radonc.2007.07.006
- Dittmann K, Toulany M, Classen J, Heinrich V, Milas L, Rodemann HP (2005) Selective radioprotection of normal tissues by Bowman-birk proteinase inhibitor (BBI) in mice. *Strahlenther Onkol* 181:191-196 doi: 10.1007/s00066-005-1358-y
- Dittmann K, Virsik-Kopp P, Mayer C, Rave-Frank M, Rodemann HP (2003) Bowman-Birk protease inhibitor activates DNA-dependent protein kinase and reduces formation of radiation-induced dicentric chromosomes. *Int J Radiat Biol* 79:801-808 doi: 10.1080/09553000310001610277
Q22DQ4X3N4CPRG2C [pii]
- Dittmann KH et al. (1998) The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts. *Radiat Res* 150:648-655

Literaturverzeichnis

- Dittmann KH, Gueven N, Mayer C, Rodemann HP (2001a) Characterization of the amino acids essential for the photo- and radioprotective effects of a Bowman-Birk protease inhibitor-derived nonapeptide. *Protein Eng* 14:157-160
- Dittmann KH, Mayer C, Rodemann HP (2001b) O-phospho-L-tyrosine protects TP53 wild-type cells against ionizing radiation. *Int J Cancer* 96 Suppl:1-6 doi: 10.1002/ijc.10340
- Downs JA et al. (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* 16:979-990 doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.003
- Enan E, Matsumura F (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* 52:1599-1612
- Engelman JA, Cantley LC (2008) A sweet new role for EGFR in cancer. *Cancer Cell* 13:375-376 doi: S1535-6108(08)00125-6 [pii] 10.1016/j.ccr.2008.04.008
- Falck J, Coates J, Jackson SP (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434:605-611 doi: 10.1038/nature03442
- Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML, Delaney JP (1995) Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Ann Surg* 222:504-508; discussion 508-510
- Fischle W (2009) Tip60-ing the balance in DSB repair. *Nat Cell Biol* 11:1279-1281 doi: 10.1038/ncb1109-1279
- Friedberg EC (2006) DNA Repair And Mutagenesis. Amer Society for Microbiology; 2 edition
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 284:12297-12305 doi: 10.1074/jbc.M900573200
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 19:4861-4870 doi: 10.1093/hmg/ddq419
- Geisler S et al. (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12:119-131 doi: 10.1038/ncb2012
- Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A (1996) SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:20531-20535

Literaturverzeichnis

- Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB (2003) Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:709-717 doi: 10.1038/sj.cdd.4401231
- Grdina DJ, Shigematsu N, Dale P, Newton GL, Aguilera JA, Fahey RC (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* 16:767-774
- Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A (2000) Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 89:169-175
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130:77-88 doi: 10.1016/j.cell.2007.05.042
- Hediger MA, Kanai Y, You G, Nussberger S (1995) Mammalian ion-coupled solute transporters. *J Physiol* 482:7S-17S
- Hlubek F, Lohberg C, Meiler J, Jung A, Kirchner T, Brabletz T (2001) Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *J Biochem* 129:635-641
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53
- Hosseinimehr SJ (2007) Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 12:794-805 doi: 10.1016/j.drudis.2007.07.017
- Huang KM, Snider MD (1995) Isolation of protein glycosylation mutants in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 6:485-496
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071-1078 doi: 10.1038/nature08467
- Jones RG et al. (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18:283-293 doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.027
- Joo JH et al. (2011) Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. *Mol Cell* 43:572-585 doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.018
- Kadenbach B (2003) Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604:77-94
- Kahl GF, Friederici DE, Bigelow SW, Okey AB, Nebert DW (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* 1:137-162

Literaturverzeichnis

- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462:245-253 doi: 10.1016/j.abb.2007.03.034
- Kimura A, Horikoshi M (1998) Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* 3:789-800
- Kohle C, Gschaidmeier H, Lauth D, Topell S, Zitzer H, Bock KW (1999) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Arch Toxicol* 73:152-158
- Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871
- Kornberg RD, Thomas JO (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184:865-868
- Koukourakis MI et al. (2000) Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 18:2226-2233
- Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ (2007) Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist* 12:738-747 doi: 10.1634/theoncologist.12-6-738
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705 doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Krieger H (2009) *Grundlagen Der Strahlungsphysik Und Des Strahlenschutzes*. Vieweg+Teubner Verlag
- Kruhlak MJ et al. (2006) Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 172:823-834 doi: 10.1083/jcb.200510015
- Kundu M et al. (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* 112:1493-1502 doi: 10.1182/blood-2008-02-137398
- Kusch T et al. (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306:2084-2087 doi: 10.1126/science.1103455
- Landauer MR, Srinivasan V, Seed TM (2003) Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury. *J Appl Toxicol* 23:379-385 doi: 10.1002/jat.904
- Lavin MF (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:759-769 doi: 10.1038/nrm2514
- Leary SC et al. (2004) Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet* 13:1839-1848 doi: 10.1093/hmg/ddh197

Literaturverzeichnis

- Leary SC, Sasarman F, Nishimura T, Shoubbridge EA (2009) Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum Mol Genet* 18:2230-2240 doi: 10.1093/hmg/ddp158
- Lee JH, Paull TT (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26:7741-7748 doi: 10.1038/sj.onc.1210872
- Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 8:3-5 doi: 10.1089/rej.2005.8.3
- Levine SL, Perdew GH (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* 59:557-566
- Li X, Lin HH, Chen H, Xu X, Shih HM, Ann DK (2010) SUMOylation of the transcriptional co-repressor KAP1 is regulated by the serine and threonine phosphatase PP1. *Sci Signal* 3:ra32 doi: 10.1126/scisignal.2000781
- Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG (2010) Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem* 50:279-296 doi: 10.1007/978-90-481-3471-7_14
- Lin YY et al. (2009) Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* 136:1073-1084 doi: 10.1016/j.cell.2009.01.033
- Liu SZ (2010) Biological effects of low level exposures to ionizing radiation: theory and practice. *Hum Exp Toxicol* 29:275-281 doi: 10.1177/0960327109363967
- Liu X et al. (2010) Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene* 29:442-450 doi: 10.1038/onc.2009.332
- Lombardo CR, Consler TG, Kassel DB (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* 34:16456-16466
- Madan E, Gogna R, Bhatt M, Pati U, Kuppusamy P, Mahdi AA (2011) Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget* 2:948-957
- Matoba S et al. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-1653 doi: 10.1126/science.1126863
- Matsuda N et al. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189:211-221 doi: 10.1083/jcb.200910140

Literaturverzeichnis

- Matsuoka S et al. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160-1166 doi: 10.1126/science.1140321
- Mishra S, Hamburger AW (1993a) Exogenous phosphotyrosine modulates epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation. *Carcinogenesis* 14:269-273
- Mishra S, Hamburger AW (1993b) O-phospho-L-tyrosine inhibits cellular growth by activating protein tyrosine phosphatases. *Cancer Res* 53:557-563
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148
- Mitchell P (2011) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochim Biophys Acta* 1807:1507-1538 doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.018
- Murr R et al. (2006) Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8:91-99 doi: 10.1038/ncb1343
- Naidu SR, Lakhter AJ, Androphy EJ (2012) PIASy-mediated Tip60 sumoylation regulates p53-induced autophagy. *Cell Cycle* 11:2717-2728 doi: 10.4161/cc.21091
- Nair CK et al. (2003) Water soluble vitamin E (TMG) as a radioprotector. *Indian J Exp Biol* 41:1365-1371
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183:795-803 doi: 10.1083/jcb.200809125
- Nordentoft I, Jorgensen P (2003) The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. *Biochem J* 374:165-173 doi: 10.1042/BJ20030087
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:953-959
- Olovnikov IA, Kravchenko JE, Chumakov PM (2009) Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin Cancer Biol* 19:32-41 doi: 10.1016/j.semcancer.2008.11.005
- Olson AL, Pessin JE (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 16:235-256 doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.001315
- Otsuka K, Ishioka C (2007) [TP53 mutations and molecular epidemiology]. *Gan To Kagaku Ryoho* 34:683-689

Literaturverzeichnis

- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10:886-895
- Pedersen PL (2007) Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 39:211-222 doi: 10.1007/s10863-007-9094-x
- Pedersen PL, Amzel LM (1993) ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J Biol Chem* 268:9937-9940
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633-4646 doi: 10.1038/sj.onc.1209597
- Peng JC, Karpen GH (2008) Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr Opin Genet Dev* 18:204-211 doi: 10.1016/j.gde.2008.01.021
- Planel H et al. (1987) Influence on cell proliferation of background radiation or exposure to very low, chronic gamma radiation. *Health Phys* 52:571-578
- Pokholok DK et al. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122:517-527 doi: 10.1016/j.cell.2005.06.026
- Poland A, Clover E, Kende AS, DeCamp M, Giandomenico CM (1976a) 3,4,3',4'-Tetrachloro azoxybenzene and azobenzene: potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Science* 194:627-630
- Poland A, Glover E, Kende AS (1976b) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251:4936-4946
- Polo SE, Roche D, Almouzni G (2006) New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127:481-493 doi: 10.1016/j.cell.2006.08.049
- Poole AC, Thomas RE, Yu S, Vincow ES, Pallanck L (2010) The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5:e10054 doi: 10.1371/journal.pone.0010054
- Robert-Koch-Institut (2012) Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts. In: <http://www.rki.de>
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868

Literaturverzeichnis

- Rolfe DF, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77:731-758
- Rothmund M-C (2010) Die Rolle des Arylhydrocarbon Rezeptors in der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung (Dissertation). tobias-lib.uni-tuebingen.de
- Rubbi CP, Milner J (2003) p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 22:975-986 doi: 10.1093/emboj/cdg082
- Salminen A, Kaarniranta K (2010) Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling. *Cell Signal* 22:573-577 doi: 10.1016/j.cellsig.2009.10.006
- Salviati L et al. (2002) Cytochrome c oxidase deficiency due to a novel SCO2 mutation mimics Werdnig-Hoffmann disease. *Arch Neurol* 59:862-865
- Sambrook J, Russell DW (2006) Agarose gel electrophoresis. *CSH Protoc* 2006 doi: 10.1101/pdb.prot4020
- Sattler UG et al. (2010) Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 94:102-109 doi: 10.1016/j.radonc.2009.11.007
- Shaw RJ (2006) Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18:598-608 doi: 10.1016/j.ceb.2006.10.005
- Sho T et al. (2011) TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *Biochim Biophys Acta* 1813:1245-1253 doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.018
- Squatrito M, Gorrini C, Amati B (2006) Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* 16:433-442 doi: 10.1016/j.tcb.2006.07.007
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13182-13187 doi: 10.1073/pnas.0504211102
- Sun Y et al. (2009) Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol* 11:1376-1382 doi: 10.1038/ncb1982
- Sun Y, Xu Y, Roy K, Price BD (2007) DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol* 27:8502-8509 doi: 10.1128/MCB.01382-07
- Suski JM, Lebedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR (2012) Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol* 810:183-205 doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_12
- Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W (2006) Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24:827-839 doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.021

Literaturverzeichnis

- Tarnopolsky MA et al. (2004) Novel SCO2 mutation (G1521A) presenting as a spinal muscular atrophy type I phenotype. *Am J Med Genet A* 125A:310-314 doi: 10.1002/ajmg.a.20466
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 14:1025-1040 doi: 10.1038/nsmb1338
- Telford DJ, Stewart BW (1989) Micrococcal nuclease: its specificity and use for chromatin analysis. *Int J Biochem* 21:127-137
- Thompson PR et al. (2004) Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* 11:308-315 doi: 10.1038/nsmb740
- Towler MC, Hardie DG (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100:328-341 doi: 10.1161/01.RES.0000256090.42690.05
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22:5612-5621 doi: 10.1093/emboj/cdg541
- Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA (2006) Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol* 26:9185-9195 doi: 10.1128/MCB.01529-06
- Vives-Bauza C et al. (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:378-383 doi: 10.1073/pnas.0911187107
- Wang X, Hayes JJ (2008) Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol* 28:227-236 doi: 10.1128/MCB.01245-07
- Wang Z, Wilson WA, Fujino MA, Roach PJ (2001) Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol Cell Biol* 21:5742-5752
- Wanner G (2008) Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus des Radioprotektors O-Phospho L-Tyrosin: Wechselwirkungen von Phosphotyrosin mit Aktivierungsprozessen des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors. Dissertation
- Wanner G, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP, Dittmann K (2008) Activation of protein kinase Cepsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation. *Radiother Oncol* 86:383-390 doi: S0167-8140(07)00545-2 [pii] 10.1016/j.radonc.2007.10.041
- Warburg O (1956a) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124:269-270
- Warburg O (1956b) On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314

Literaturverzeichnis

- Weihua Z et al. (2008) Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 13:385-393 doi: 10.1016/j.ccr.2008.03.015
- Whitnall MH et al. (2000) Androstenediol stimulates myelopoiesis and enhances resistance to infection in gamma-irradiated mice. *Int J Immunopharmacol* 22:1-14
- Yang XJ, Seto E (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26:5310-5318 doi: 10.1038/sj.onc.1210599
- Yeung SJ, Pan J, Lee MH (2008) Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65:3981-3999 doi: 10.1007/s00018-008-8224-x
- Zeng L et al. (2008) Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 15:626-633 doi: 10.1038/nsmb.1416
- Ziv Y et al. (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8:870-876 doi: 10.1038/ncb1446
- Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ (2010) *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5018-5023 doi: 10.1073/pnas.0913485107