

**Prävention genotoxischer und karzinogener Effekte
kosmischer Strahlung durch den Radioprotektor
Ortho-Phospho-L-Tyrosin**

Dissertation

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

vorgelegt von
Elena Elisabeth Hausherr
aus Forchheim

Tübingen

2015

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

Tag der mündlichen Qualifikation: 24.07.2015

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Rieß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Peter Rodemann

Inhaltsverzeichnis

0	Zusammenfassung	1
1	Einleitung	3
1.1	Einfluss der Strahlenqualität auf die Zellschädigung	4
1.2	Reparaturmechanismen	5
1.3	Einsatz von Radioprotektoren	8
1.4	Bedeutung der Chromatinstruktur	11
1.5	Energiemetabolismus	12
1.6	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Zelllinien und Zellkulturmedien	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Geräte	17
2.1.5	Lösungen und Puffer	17
2.1.6	Antikörper	20
2.1.7	Farbstoffe	21
2.1.8	Kits	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.2	Bestrahlung	22
2.2.3	Koloniebildungstest – Klonogenes Überleben konfluenter Zellen	23
2.2.4	Proteinanalyse mittels Westen Blot	24
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von γ H2AX-Foci	25
2.2.6	Bestimmung der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies	26
2.2.7	Bestimmung des Cytochrom-C-Gehalts	26
2.2.8	Bestimmung des Zellzyklus	27
2.2.9	Bestimmung der ATP-Konzentration	27
2.2.10	Bestimmung der Laktat-Konzentration	27
2.2.11	Densitometrische und statistische Auswertung	28
3	Ergebnisse	29
3.1	pTyr wirkt radioprotektiv gegenüber Hoch- und Nieder-LET-Strahlung	29
3.1.1	pTyr verbessert klonogenes Überleben nach Nieder-LET	29
3.1.2	pTyr verbessert klonogenes Überleben nach Hoch-LET	31
3.2	pTyr modifiziert Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind	32
3.2.1	Eine pTyr-Vorbehandlung hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus	32
3.2.2	pTyr stabilisiert die Ataxia telangiectasia mutated (ATM)	33
3.2.3	pTyr induziert die Phosphorylierung der DNA-PKcs	34
3.2.4	pTyr führt zu einer Aktivierung von AKT	36

Inhaltsverzeichnis

3.2.5	Einfluss der PI3-Kinase auf den pTyr-Effekt	38
3.3	pTyr beschleunigt die DNA-Reparatur	39
3.3.1	pTyr beschleunigt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und vermindert die Anzahl bleibender Schäden nach γ -Strahlung	39
3.3.2	pTyr beschleunigt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und vermindert die Anzahl bleibender Schäden nach α -Teilchen-Strahlung	44
3.3.3	pTyr bewirkt eine Relaxation des Chromatins in Abwesenheit von DNA-Schäden	46
3.4	pTyr erhöht die Energie, die Zellen vor Bestrahlung zur Verfügung steht	47
3.4.1	pTyr-Vorbehandlung führt zu erhöhtem ATP-Gehalt	47
3.4.2	Der ATP-Gehalt verhält sich nach Bestrahlung wie in den Kontrollzellen	48
3.5	Die mitochondriale Atmung wird durch pTyr nicht verstärkt	50
3.5.1	pTyr-Vorbehandlung hat keinen Einfluss auf die Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies	50
3.5.2	pTyr hat keinen Einfluss auf die Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies nach Bestrahlung	52
3.5.3	pTyr induziert eine Inhibition der Pyruvat-Dehydrogenase und reduziert somit die mitochondriale Atmung	53
3.6	Der ATP-Gewinn durch pTyr basiert zu Teilen auf Abbau beschädigter Mitochondrien durch Mitophagie	55
3.6.1	pTyr-Behandlung führt zu Umwandlung von LC3-I zu LC3-II	55
3.6.2	pTyr-Vorbehandlung reduziert die Cytochrom C-Konzentration	56
3.6.3	Die Inhibierung der Autophagie reduziert den protektiven pTyr-Effekt	58
3.7	pTyr-Vorbehandlung resultiert in verstärkter Glykolyse	59
3.7.1	pTyr-Vorbehandlung führt zu verstärkter Laktatproduktion	59
3.7.2	pTyr-Vorbehandlung führt zu verringerter Laktatproduktion nach Bestrahlung	60
4	Diskussion	64
4.1	pTyr wirkt radioprotektiv auf Wildtyp-TP53-Zellen bei unterschiedlichen Strahlenqualitäten	64
4.2	pTyr führt trotz Abwesenheit von DNA-Schäden zu einer Aktivierung von Reparaturproteinen ohne den Zellzyklus zu beeinflussen	66
4.3	pTyr bewirkt einen Anstieg des zellulären ATP-Gehalts	71
4.4	pTyr drosselt die mitochondriale Atmung und bewirkt eine Erneuerung der Mitochondrien	72
4.5	pTyr vermittelt eine kurzfristige Steigerung der Glykolyse	75
5	Literaturverzeichnis	80

0 Zusammenfassung

Zur Optimierung der Radiotherapie von soliden Tumoren werden selektiv radioprotektive Substanzen gesucht, die eine höhere Strahlendosis im Tumorgewebe bei gleichzeitigem Schutz des umliegenden Normalgewebes erlauben. Darüber hinaus sind solche radioprotektiv wirksamen Stoffe auch in Hinblick auf Strahlenexposition in Umwelt und Beruf und der Minimierung der daraus resultierenden Schäden von Interesse.

In dieser Arbeit wurde Ortho-Phospho-L-Tyrosin (pTyr) eingehender untersucht. Es handelt sich dabei um ein Aminosäurederivat, das auch beim Verdau des Bowman-Birk-Inhibitors (BBI) aus der Sojabohne entsteht und welches selektiv radioprotektive Eigenschaften in Zellen mit Wildtyp-TP53 aufweist.

Eine 16-stündige pTyr-Behandlung vor Bestrahlung verbesserte sowohl nach niederenergetischer γ -Strahlung, als auch nach hochenergetischer α -Teilchen-Strahlung das klonogene Überleben der TP53-Wildtyp-Zelllinien A549 und HSF4. Dabei zeigte sich eine beschleunigte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB), ersichtlich an einer schnelleren Abnahme der mit DNA-DSB assoziierten γ H2AX-positiven Foci. In Zellen mit mutiertem TP53 bewirkte pTyr im Gegensatz dazu ein reduziertes Überleben und eine verlangsamte Reparatur.

Da bislang lediglich bekannt war, dass pTyr TP53-abhängig wirkt und dabei eine Phosphorylierung und nukleäre Translokation des EGFR bewirkt, wurde untersucht, über welche Signalketten eine verbesserte DNA-Reparatur eingeleitet wird und welche molekularen Veränderungen dies nach sich zieht.

Es konnte gezeigt werden, dass pTyr eine Reihe reparaturrelevanter Proteine beeinflusst. So kommt es zu einer Stabilisierung der ATM, einer EGFR-vermittelten Aktivierung des PI3-Kinase/ AKT-Signalwegs und einer damit verknüpften Aktivierung der DNA-PK sowie einer Inhibierung des AKT-Substrats GSK3. Gleichzeitig bewirkt pTyr eine Öffnung des Chromatins, sodass die rekrutierten Reparaturproteine Schäden leichter erkennen und beheben können.

Eine Behandlung mit pTyr bewirkte darüber hinaus einen kurzfristigen Wechsel zur aeroben Glykolyse, was einen Anstieg der zellulären Laktatkonzentration mit sich brachte. In

Zusammenfassung

bestimmten Konzentrationen wirkt Laktat antioxidativ und radioprotektiv. Da TP53-mutierte Zellen bereits eine höhere Glykolyserate als Normalgewebszellen aufweisen, könnte dies erklären, warum sich eine pTyr-Behandlung gar nicht oder sogar eher negativ auf diese Zellen auswirkt, da durch die pTyr-Behandlung eventuell eine kritische Konzentration an Laktat überschritten wird, beziehungsweise keine Steigerung des Laktats mehr möglich ist.

Gleichzeitig kam es in den behandelten Zellen zu einer Erneuerung der Mitochondrien durch Mitophagie, so dass die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies, die für gewöhnlich im Laufe der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien entstehen, reduziert wurde und es zu einer Verjüngung der Mitochondrienpopulation kam. Der Wechsel zur Milchsäuregärung zeigte sich auch anhand einer Phosphorylierung der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), die ein Eintreten des Pyruvats in die mitochondriale Atmungskette verhindert.

Der Wirkmechanismus von pTyr beruht also auf einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Durch die Aktivierung von Reparaturproteinen, der Relaxation des Chromatins und einer Umstellung der Energiegewinnung werden TP53-Wildtyp-Zellen optimal auf eine Schädigung der DNA vorbereitet und können somit schneller und effizienter Schäden reparieren. Somit besitzt pTyr nicht nur ein großes Potenzial als Radioprotektor bei therapeutisch eingesetzter Strahlung zum Schutz des umliegenden Normalgewebes, sondern es spricht vieles dafür, dass pTyr auch präventiv eingenommen einen Schutz gegen verschiedene Arten von Strahlung bieten kann, denen man in der Umwelt oder im Beruf ungewollt ausgesetzt ist.

1 Einleitung

Laut Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. lag die Anzahl der Krebsneuerkrankungen im Jahr 2010 allein in Deutschland bei 477.300, das sind ca. 1,6 % mehr als noch im Jahre 2008. Für das Jahr 2014 ergibt die Hochrechnung einen Anstieg auf 500.900 Neuerkrankungen. Mit 218.258 Todesfällen in Deutschland im Jahr 2010 ist Krebs verantwortlich für etwa 25 % aller Sterbefälle (Kaatsch *et al.* 2013). Während in einigen Fällen eine operative Entfernung des Tumorgewebes bereits genügt, ist in den meisten Fällen zusätzlich eine weitere Therapie nötig, um eine vollständige Eliminierung aller Krebszellen zu erreichen beziehungsweise ein erneutes Wachstum verbliebener Tumorzellen zu minimieren. Hierzu wird je nach Ausgangslage entweder Chemotherapie, Strahlentherapie oder eine Kombination aus beidem angewandt.

Neben dem Einsatz von Strahlung in der Medizin erfolgt auch eine Exposition gegenüber natürlich auftretender Strahlung. Diese schwankt in Deutschland zwischen 2 und 5 mSv/a, nur in Einzelfällen werden Werte von 10 mSv/a gemessen. Dabei wird ca. 33 % der Strahlung von außen aufgenommen, ca. 14 % durch Nahrung und über 50 % durch Einatmen von natürlichen radioaktiven Substanzen, wie etwa Radon (BfS 2013). Während diese Werte noch unbedenklich sind, kann wie im Falle von Fukushima Daiichi oder Tschernobyl die Strahlenbelastung diesen unbedenklichen Wert aber auch akut um ein Vielfaches überschreiten und durch umfassende Schädigung des Organismus zu der lebensgefährlichen Strahlenkrankheit sowie langfristig zu einem erhöhten Krebsrisiko führen. Des Weiteren sind bestimmte Berufsgruppen, wie beispielsweise Piloten, Astronauten und medizinisches Personal, aber auch Personen, die an der Produktion oder Verarbeitung von radioaktiven Substanzen beteiligt sind, generell einer höheren Umgebungsstrahlung ausgesetzt, was stochastisch ein höheres Risiko bedeutet, an Krebs zu erkranken. Die erhöhte Strahlenbelastung bestimmter Berufsgruppen führt außerdem zu einem erhöhten Risiko für das ungeborene Leben und macht zusätzliche pränatale Diagnostik und Beratung notwendig.

Die in der Strahlentherapie bislang am häufigsten eingesetzte Art der Strahlung ist elektromagnetische γ -Strahlung bzw. Röntgenstrahlung. Diese besitzt einen niedrigen linearen Energietransfer (Low-LET). Bislang seltener eingesetzt wird Strahlung mit einem hohen linearen Energietransfer (High-LET), wie sie α -Teilchen- oder Protonenstrahlung besitzt.

Auch die nur indirekt ionisierende Neutronenstrahlung verursacht Strahlenschäden. Durch die Unterschiede in der Freisetzung der auf die Zellen übertragenen Energie treten auch unterschiedliche Schadensmuster in Abhängigkeit von der Strahlungsqualität auf.

Strahlung kann direkt Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA hervorrufen (DNA single strand breaks, DNA-SSB bzw. DNA double strand breaks, DNA-DSB). Darüber hinaus spielt die indirekte Bildung von freien Radikalen, welche wiederum zur Bildung reaktiver Sauerstoff- (reactive oxygen species, ROS) und Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) führen, eine wesentliche Rolle bei der strahlenvermittelten Schädigung der DNA. Sind die aufgetretenen Schäden zu gravierend, um korrekt repariert zu werden, führt dies zum Absterben der Zelle oder auch zur Tumorentstehung. In der Tumorthherapie sind durch Strahlung vermittelte Schäden im Tumor, die zum Absterben der Zellen führen, wünschenswert. Einen limitierenden Faktor bildet dagegen die unerwünschte Auswirkung der Strahlung auf das umliegende Normalgewebe. Im Falle einer natürlichen Strahlenexposition ist ebenfalls eine Minimierung der Schäden erstrebenswert.

Daraus ergibt sich die Frage, wie man Normalgewebe optimal vor Strahlenschäden schützen kann beziehungsweise mit welchen Mitteln man eine effizientere Schadensreparatur hervorrufen kann.

1.1 Einfluss der Strahlenqualität auf die Zellschädigung

Das Ausmaß des Schadens, der durch Strahlung auftritt, hängt zum einen von der Dosis ab, mit der Gewebe bestrahlt wird, zum anderen von der Art der Strahlung. Röntgen- bzw. γ -Strahlung, die oft therapeutisch oder auch diagnostisch eingesetzt wird, besitzt einen Low-LET, bei dem die Strahlungsenergie über einen größeren Bereich hinweg abgegeben wird. Dahingegen ist bei der High-LET-Strahlung von α -Teilchen die Energie an die Masse des Teilchens gebunden und wird bei Transmission in einem sehr begrenzten Umfeld abgegeben. Selbst bei gleicher Energie bewirkt also γ -Strahlung ein anderes Absorptionsspektrum und damit Schadensspektrum im Gewebe als α -Teilchen-Strahlung.

Durch die Unterschiede in der Energieübertragung lässt sich auch ein unterschiedliches Schadensmuster und unterschiedliche Reparaturkinetiken beobachten (Rydberg 1996, Hill *et al.* 2011, Mognato *et al.* 2011, Wu *et al.* 2012). Die durch Radikalbildung verursachten Schäden sind bei γ -Strahlung stärker abhängig von der Sauerstoffkonzentration als bei

α -Teilchen-Strahlung (Frankenberg *et al.* 1990). Durch Teilchenstrahlung können DNA-Moleküle direkt geschädigt werden. Auch wird die Energie hier in einem stark begrenzten Raum abgegeben, so dass eine höhere Schadensdichte, ein sogenannter Cluster-Schaden, auftritt. Dabei können einzelne Basen beschädigt werden, aber auch Einzelstrangbrüche und schwer zu reparierende Doppelstrangbrüche auftreten. Während defekte Basen und Einzelstrangbrüche oft relativ leicht vom Reparaturmechanismus der Zelle behoben werden können, solange die Information auf dem komplementären DNA-Strang noch erhalten ist, stellen DNA-DSB ein erhebliches Reparatur-Hindernis dar. In Abhängigkeit der Art und der Komplexität der Schäden treten verschiedene Reparaturmechanismen der Zelle in Kraft (Barendsen 1994, Pinto *et al.* 2005, Obe *et al.* 2010, Tommasino *et al.* 2013).

Ein hoher LET führt bei gleicher Dosis zu einem drastisch verringerten Zellüberleben im Gegensatz zu niedrigem LET. Auch auf molekularer Ebene lassen sich Unterschiede feststellen. So weisen Zellen, die mit High-LET bestrahlt wurden, eine deutlich erhöhte Apoptoserate auf, was sich anhand einer verstärkten Phosphorylierung des Proteins TP53 an Serinrest 37 nachweisen lässt (Niemantsverdriet *et al.* 2012).

Um Strahlungseffekte verschiedener Strahlenqualitäten vergleichen zu können, wurde die relative biologische Wirksamkeit (relative biological effectiveness, RBE) eingeführt. Dieser Faktor beschreibt das Verhältnis der Dosis einer untersuchten Strahlung, die einen bestimmten Effekt hervorruft, im Vergleich zur Dosis von Röntgenstrahlung, die benötigt wird, um denselben Effekt hervorzurufen (Friedrich *et al.* 2013). Dieser RBE kann je nach biologischem Endpunkt erheblich variieren (Barendsen 1994, Barendsen 1994), etwa bei α -Teilchen-Strahlung im Vergleich zu γ -Strahlung von 1.0 ± 0.3 für die Induktion von γ H2AX-Foci bis zu 15.3 ± 5.9 für die strahleninduzierte Bildung von Chromosomfragmenten (Franken *et al.* 2011).

1.2 Reparaturmechanismen

Zellen besitzen mehrere Wege, DNA-Schäden zu reparieren. Welcher dieser unterschiedlichen Reparaturmechanismen im einzelnen Fall eingeleitet wird, ist unter anderem abhängig von der Art des Schadens sowie der Zellzyklusphase der geschädigten Zelle. Die Reparatur weniger fehlerhafter Basen kann mithilfe der Basenexzisionsreparatur (BER), der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sowie mittels Mismatch-Reparatur bzw. Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) erfolgen. Dabei können durch BER kleine Basenschäden

von bis zu 30 Nukleotiden, welche die Helixstruktur nicht beeinflussen, herausgeschnitten und erneuert werden. NER beseitigt auch größere, die Helixstruktur störende Läsionen, wie zum Beispiel Pyridindimere oder 6,4-Photoprodukte. Die MMR beruht auf der Fähigkeit der Korrekturlesung der DNA-Polymerase bereits während der Synthese eines Strangs, wodurch vor allem fehlgepaarte Watson-Crick-Basenpaare erkannt und korrigiert werden (Ciccia und Elledge 2010).

Da in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf durch Strahlung induzierte gravierendere DNA-Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche gerichtet war, sollen im Folgenden die dafür notwendigen DNA-Reparaturmechanismen, nämlich die homologe Rekombination (HR) sowie vor allem das Non-homologe End-Joining (NHEJ) in eukaryotischen Zellen ausführlicher beschrieben werden.

Die homologe Rekombination (HR) stellt die genaueste Möglichkeit zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen dar, die nahezu fehlerfrei abläuft. Jedoch ist dieser Reparaturweg abhängig vom Zellzyklus, kann also nicht in jeder Phase angewandt werden. Des Weiteren benötigt die Zelle hierfür ein entsprechendes Schwesterchromatid als Vorlage. DNA-DSB können durch den MRN-Komplex erkannt werden, der sich aus Mre11, Rad50 und Nbs1 zusammensetzt. Dabei ist Mre11 sowohl eine Endo- als auch eine Exonuklease, die direkt an Nbs1, Rad 50 und die DNA binden kann. Rad50, ein Protein aus der SMC-Familie (structural maintenance of chromosome), besitzt eine ATPase-Domäne, über welche es an die DNA binden kann. So bewirkt dieser Komplex eine Stabilisierung der DNA-Enden. Darüber rekrutiert Nbs1 ATM an die Bruchstelle (Williams *et al.* 2007). Der MRN-Komplex bewirkt eine Ansammlung von kurzen einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden, die eine Aktivierung der ATM bewirken, welche wiederum TP53 und Chk2 phosphoryliert und somit einen Zellzyklusarrest bewirkt (Lee und Paull 2005, Jazayeri *et al.* 2008). Der MRN-Komplex interagiert des Weiteren mit CtIP, einem Protein welches Homologie zu Sae2 aufweist, das an der Mre11-abhängigen Reparatur in Hefe beteiligt ist (Sartori *et al.* 2007). Beim Eintritt in die S-Phase wird CtIP an Serinrest 327 phosphoryliert und BRCA1 rekrutiert. Dieser Schritt scheint entscheidend dafür zu sein, dass die Zelle eine Reparatur über den HR-Reparaturweg ausführt (Yun und Hiom 2009). Der MRN-CtIP-Komplex startet die Resektion der einzelsträngigen DNA. Diese wird von RPA (replication protein A) umschlossen, welches im weiteren Verlauf mithilfe von BRCA2 durch Rad51 ersetzt wird. Der Strang wird über einen

D-Loop am homologen Schwesterchromatid eingeführt und erneuert (Sharan *et al.* 1997, Pellegrini *et al.* 2002, Sung und Klein 2006).

Während HR vor allem in der S-Phase zum Einsatz kommt, ist die Aktivität dieses Reparaturwegs in G2/M stark reduziert und tritt in G1 gar nicht zu Tage. In diesen Phasen repariert die Zelle Schäden vor allem bzw. ausschließlich über den NHEJ-Reparaturweg (Mao *et al.* 2008). Das Non-homologe End-Joining ist dabei zwar weitaus fehleranfälliger als die HR, und birgt das Risiko von Insertionen oder Deletionen, bewahrt die Zelle jedoch vor dem Verlust wichtiger DNA-Abschnitte und ermöglicht somit das Überleben. Der erste Schritt zur Reparatur besteht darin, dass Ku70/ Ku80-Heterodimere (Ku) an die Enden eines DNA-DSB binden. Ku rekrutiert daraufhin die katalytische Untereinheit von DNA-PK, die DNA-PKcs, sowie Artemis, eine Endonuklease, die auch ohne DNA-Schäden an die DNA-PK binden kann. Die DNA-PKcs kann zwar auch ohne das Heterodimers an die Stelle des DNA-Schadens binden, jedoch ist die Affinität durch vorherige Bindung von Ku um ein Hundertfaches größer (West *et al.* 1998). Durch die Bindung wird die Phosphorylierungsaktivität der DNA-PKcs initiiert. Dabei wird sowohl Artemis als auch die DNA-PK selbst phosphoryliert. Die Kinaseaktivität der DNA-PKcs ist nicht nur ein wichtiger Faktor bei der Reparatur von Schäden, die durch ionisierende Strahlung entstanden sind, sondern auch bei der Immunantwort zur Verknüpfung der Segmente bei der V(D)J-Rekombination von B-Zell und T-Zell-Rezeptoren (Kurimasa *et al.* 1999). Die Autophosphorylierung der DNA-PK führt zu einer Konformationsänderung, sodass die DNA-Enden für Artemis zugänglich gemacht werden und bearbeitet werden können (Yoo und Dynan 1999, Hammarsten *et al.* 2000, Ma *et al.* 2002). Dabei besitzt Artemis die Fähigkeit, Hairpin-Loops zu öffnen, falls sich solche durch die Schädigung der DNA gebildet haben, und schneidet einzelsträngige DNA-Überhänge weg (Ma *et al.* 2002, Ma *et al.* 2005, Niewolik *et al.* 2006). An diesem Schritt sind auch weitere Nukleasen bzw. Polymerasen (Pol μ , Pol λ) beteiligt, abhängig von der Art der Enden des beschädigten DNA-Strangs (Ma *et al.* 2004, Nick McElhinny *et al.* 2005, Gu *et al.* 2007). Auch spielt Ku eine Rolle bei der Verarbeitung der Enden, da es eine effektive 5'-dRP/AP Lyase darstellt (Roberts *et al.* 2010). Ein Ligationskomplex aus XRCC4, DNA-Ligase und XLF (XRCC4-like factor, Cernunnos), der ebenfalls durch Ku rekrutiert wird, verschließt letztendlich die Bruchstelle (Grawunder *et al.* 1997, Nick McElhinny *et al.* 2000, Yano *et al.* 2008). Dabei ist eine funktionelle DNA-Ligase IV essenziell für die Ku-abhängige Reparatur durch NHEJ (Adachi *et al.* 2001).

Auch Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1), welches normalerweise an BER und Einzelstrangbruchreparatur beteiligt ist, kann DNA-DSB registrieren. Dabei konkurriert es bei der Bindung an die DNA-Enden mit Ku, wobei die Bindungsaffinität von Ku nach Bestrahlung deutlich höher ist als die von PARP-1. Wenn wichtige Komponenten des zuvor beschriebenen klassischen NHEJ-Reparaturwegs fehlen oder durch Mutation eine eingeschränkte Funktion aufweisen, kann PARP-1 einen alternativen NHEJ-Reparaturweg einleiten, in dem anstatt des XRCC4-DNA-Ligase IV-Komplexes ein Komplex aus XRCC1-DNA-Ligase III eine Hauptrolle spielt (Audebert *et al.* 2004, Wang *et al.* 2006).

1.3 Einsatz von Radioprotektoren

Radiomodulatoren im Allgemeinen sind Stoffe, die die Wirkung von Strahlung auf Zellen verändern. Dabei gibt es sowohl radiosensibilisierende Substanzen, die den strahleninduzierten Schaden verstärken und somit bereits bei geringerer Dosis zu einer letalen Schädigung des Tumorgewebes führen, als auch radioprotektive Substanzen die entweder spezifisch oder unspezifisch das Zellüberleben nach Bestrahlung verbessern.

Ein Ansatz der Radioprotektion ist der Einsatz von Cytokinen und Immunmodulatoren. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass Interferon gamma eine Immunantwort hervorruft, wobei vor allem Monocyten stimuliert werden (Pujol *et al.* 1993). Auch die Cytokine Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α vermögen eine Verringerung der Nebenwirkungen von Strahlung zu vermitteln, indem sie körpereigene Prozesse aktivieren (Neta *et al.* 1986, Braunschweiger *et al.* 1996, Nair *et al.* 2001).

Zu den unspezifisch protektiv wirkenden Substanzen gehören Radikalfänger, die einer Bildung von freien Radikalen entgegenwirken. Dieser Gruppe gehören die unterschiedlichsten Vertreter an – Hormone, wie Melatonin (Pieri *et al.* 1994, Vijayalaxmi *et al.* 1998), eine Reihe von Pflanzenextrakten, wie Traubenkernextrakt (Castillo *et al.* 2000) oder ein Extrakt aus der Pflanze *Terminalia chebula* (Naik *et al.* 2004), verschiedene Vitamine (Harapanhalli *et al.* 1994, Narra *et al.* 1994, Sert *et al.* 2000), Enzyme wie Superoxid-Dismutasen (Fridovich 1978) – sie alle teilen die Eigenschaft, dass sie freie Radikale binden und somit die Schädigung der DNA durch Ionisierungsereignisse reduzieren. Um umweltbedingten Strahlenschäden entgegenzuwirken spielt die Selektivität der eingesetzten Substanz eine untergeordnete Rolle, jedoch muss der Radioprotektor meist zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits appliziert sein, um seinen protektiven Effekt zu entfalten. Hier ist entscheidend, dass

die angewendete Substanz auch über einen längeren Zeitraum keine gravierenden Nebenwirkungen besitzt, so dass potente Radikalfänger wie Ethanol oder Glycerin aufgrund ihrer in der benötigten Konzentration toxischen Wirkung auf den Organismus als Radioprotektoren ausscheiden (Nair *et al.* 2001). Während antioxidative Substanzen hilfreich sind zum Schutz vor ungeplanter Strahlenexposition, bieten sie keinen Vorteil in der Tumorthherapie, da sie Tumorzellen und Normalgewebszellen in gleichem Maße schützen.

Neben den Radikalfängern werden daher auch Substanzen untersucht, die auf den Reparaturweg einwirken und somit zur Reparatur aller DNA-Schäden beitragen können. Um in der Strahlentherapie eine verbesserte Zerstörung der Tumorzellen bei minimaler Schädigung des Normalgewebes zu erreichen, sind Radioprotektoren wünschenswert, die selektiv das Normalgewebe schützen.

Verschiedene selektive Radioprotektoren wurden in den vergangenen Jahren getestet. So konnte beispielsweise in präklinischen Studien gezeigt werden, dass Curcumin radiosensibilisierend auf viele Tumoren wirkt, während das Normalgewebe geschützt wird. Die Sensibilisierung beruht unter anderem auf einer Inhibierung der Histon-Acetyltransferase-Aktivität von p300 (Goel und Aggarwal 2010). Allerdings gibt es bislang nur einen einzigen klinisch eingesetzten selektiven Radioprotektor, Amifostin. Dieser stammt aus der Gruppe der Thiole, wobei Amifostin (WR2721) die inaktive Form ist, die durch alkalische Phosphatasen im Endothel dephosphoryliert und somit in ein aktives Thiol (WR1065) umgewandelt wird (Yuhas und Storer 1969, Grdina *et al.* 1985, Kouvaris *et al.* 2007). Die Selektivität beruht vor allem auf dem oft sauren Milieu und der mangelnden Durchblutung von Tumoren sowie der zu Normalgewebe abweichenden Expression der für die Aktivierung benötigten sauren Phosphatasen. Neben seiner Eigenschaft als Radikalfänger wirkt dieser Radioprotektor auch auf die Reparatur ein (Travis 1984, Kouvaris *et al.* 2007). In klinischen Studien mit Patienten mit Oro-/ Hypopharynx- oder Larynxkarzinom bzw. Hals- und Kopftumoren zeigte sich eine signifikante Reduktion der Xerostomie. Beim Einfluss auf das Auftreten von Mukositis zeigten sich jedoch starke Unterschiede zwischen den jeweiligen Studien (Brizel *et al.* 2000, Antonadou *et al.* 2002, Vacha *et al.* 2003). Jedoch zeigt Amifostin nicht in allen Studien die erwünschte Wirkung und ist mit teils erheblichen Nebenwirkungen verbunden (Bogo *et al.* 1985, Koukourakis *et al.* 2000, Sagowski *et al.* 2002).

Ein weiterer vielversprechender Vertreter der Gruppe selektiver Radioprotektoren ist der 1985 von Y. Birk ausführlich beschriebene Bowman-Birk-Inhibitor (BBI), ein bereits in den

vierziger Jahren aus der Sojabohne isolierter Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitor (Birk 1985). BBI beziehungsweise ein mit BBI angereichertes Sojabohnenkonzentrat (BBIC) wirkt unter anderem als Radikalfänger (Baturay und Roque 1991, Arbogast *et al.* 2007) und unterbindet die Transformation, die Zellen als Reaktion auf ionisierende Strahlung durchlaufen (Kennedy und Little 1978, Yavelow *et al.* 1983, Yavelow *et al.* 1985). Darüber hinaus zeigt BBI einen protektiven Effekt gegen γ -Strahlung in Fibroblasten (Dittmann *et al.* 1995), stabilisiert TP53 und wirft die zelleigene Reparaturmaschinerie an, wobei dieser Effekt abhängig von der Expression des Wildtyps des Tumorsuppressors TP53 ist (Dittmann 1998, Dittmann *et al.* 1998). Durch eine Behandlung mit BBI wird der EGFR phosphoryliert und in den Zellkern transloziert. BBI bewirkt weiter eine Komplexbildung des nukleären EGFR mit TP53 und MDC1 (mediator of damage checkpoint 1), welches essenziell ist für die weitere Rekrutierung von Reparaturproteinen bei DNA-DSB (Dittmann *et al.* 2008). Außerdem zeigt sich nach Inkubation mit BBI eine Aktivierung der DNA-PK, einem Schlüsselprotein in der Reparatur via Non-homologem End-Joining (NHEJ) (Dittmann *et al.* 2003). Der protektive Effekt von BBI bzw. BBIC konnte in *in vivo*-Experimenten bestätigt werden (Dittmann *et al.* 2005, Guan *et al.* 2006).

Dittmann *et al.* (2001) konnten nachweisen, dass bereits ein kleines aus BBI isoliertes Aminosäurederivat, Ortho-Phospho-L-Tyrosin (pTyr) (Abb. 1.1), einen radioprotektiven Effekt zeigt, der wie bei BBI selektiv in TP53-Wildtyp-Zellen auftritt. Entgegen früherer Beobachtungen von Mishra und Hamburger (1993), die pTyr in millimolaren Konzentrationen und über einen längeren Zeitraum einsetzten, führt eine 16-stündige Inkubation mit pTyr im mikromolaren Bereich nicht zu einer verlangsamten Zellproliferation. Des Weiteren bewirkt auch pTyr alleine eine Stabilisierung von TP53 (Dittmann *et al.* 2001). Auch diese pTyr-vermittelte Radioprotektion ist assoziiert mit einer nukleären Translokation des EGFR und dessen durch Proteinkinase C ϵ vermittelten Phosphorylierung an T 654 sowie mit einer Schaden-unabhängigen Aktivierung der DNA-PK durch Phosphorylierung an T 2609, welche in Folge von DNA-DSB schneller an DNA binden kann und somit eine schnellere Reparatur bewirkt (Dittmann *et al.* 2007, Wanner *et al.* 2008).

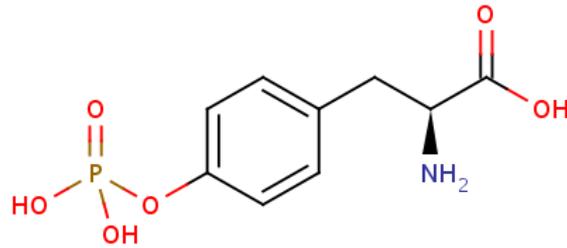


Abbildung 1.1: Struktur des Radioprotektors O-Phospho-L-Tyrosin (pTyr)

1.4 Bedeutung der Chromatinstruktur

Die Reparatur von DNA-DSB setzt voraus, dass diese von der Zelle erkannt werden und den nötigen Reparaturproteinen der Zugang zu diesen betroffenen DNA-Regionen möglich ist. Die genetische Information in eukaryotischen Zellen ist durch Chromatin geschützt, einem dynamischen Nukleoprotein-Komplex, dessen zentrales Element das Nukleosom darstellt, ein DNA-Abschnitt aus 146 bp, der sich um ein Histonoktamer windet. Dieses Oktamer setzt sich aus einem (H3-H4)₂-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren zusammen (Kornberg 1974, Luger *et al.* 1997). Histone unterliegen einer Reihe posttranslationaler Modifikationen, wie etwa Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung, die für die Dynamik der Chromatinstruktur verantwortlich sind und je nach Bedarf der Zelle den Kondensationsstatus des Chromatins regulieren, um Reparatur, Replikation, Rekombination oder Transkription zu ermöglichen (Fukuda *et al.* 2006, Taverna *et al.* 2007, Karlič *et al.* 2010, Simon *et al.* 2011).

Beim Chromatin unterscheidet man locker kondensiertes Euchromatin, welches sich vor allem in transkriptionell aktiven Genabschnitten findet und sich durch eine starke Acetylierung der Histone und Methylierung des Histons H3 an Lysinrest 4 bzw. 36 auszeichnet (Noma *et al.* 2001, Barski *et al.* 2007, Guenther *et al.* 2007) und stark kondensiertes Heterochromatin, welches ca. 20 % des menschlichen Genoms ausmacht und vor allem hypoacetylierte Histone sowie an Lysinrest 9 di- bzw. tri-methyliertes Histon H3 aufweist (Noma *et al.* 2001, Barski *et al.* 2007, Peng und Karpen 2008). Dabei steuert das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) bei Bedarf eine gezielte Dekondensation des Heterochromatins (Cheutin *et al.* 2003).

Die stärkere Kondensation des Heterochromatins resultiert in einer verminderten Bildung freier Radikale und damit einer geringeren Rate an DNA-DSB nach Bestrahlung (Takata *et al.*

2013). DNA-Schäden, die trotz verstärkter Kondensation im Heterochromatin auftreten, müssen den nötigen Reparaturproteinen im Gegensatz zu Schäden im lockeren Euchromatin jedoch erst zugänglich gemacht werden. Dies wird durch eine Dekondensation des Chromatins ermöglicht, die als Reaktion auf Bestrahlung erfolgt. Während man davon ausgeht, dass Reparaturproteine wie Nbs1 und 53BP1 ohne Energieaufwand Schäden registrieren können, ist die Relaxation des Chromatins und die Bindung der Reparaturproteine an die betroffenen DNA-Stellen ein Prozess, der ATP benötigt (Kruhlak *et al.* 2006, Hargreaves und Crabtree 2011, Wu 2012).

1.5 Energiemetabolismus

Um eine zuverlässige Reparatur von DNA-Schäden zu gewährleisten, muss der geschädigte DNA-Abschnitt für Reparaturproteine zugänglich gemacht werden, wofür die Zellen Energie benötigen. Ein Phänomen, das Krebszellen auszeichnet, ist die Art ihrer Energiegewinnung. Etwa dreiviertel des von Normalgewebszellen aufgenommenen Sauerstoffs ist an die mitochondriale ATP-Produktion gekoppelt (Rolfe und Brown 1997). Über diesen Weg der Energiegewinnung kann die Zelle, im Gegensatz zur anaeroben Glykolyse bzw. Milchsäuregärung, wo pro Glukosemolekül lediglich 2 Moleküle ATP gewonnen werden, 36 Moleküle ATP pro Glukosemolekül generieren (Pelicano *et al.* 2006).

Die mitochondriale Atmung erfolgt über oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), die an eine Elektronentransportkette an der inneren Mitochondrienmembran gekoppelt ist. Dabei wird zunächst Glukose in Pyruvat umgewandelt, welches oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert wird. Dieses wird über den Citratzyklus in den Mitochondrien verarbeitet, wodurch die Reduktionsäquivalente NADH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), reduced) und FADH₂ (flavin adenine dinucleotide (FAD), reduced) entstehen. Die an diese Produkte gebundenen Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen, wobei ein elektrochemischer Protonengradient über der Mitochondrienmembran entsteht, der die Phosphorylierung von ADP zu ATP steuert (Vander Heiden *et al.* 2009).

Anders als Normalgewebszellen, die ATP vor allem mittels oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien gewinnen, betreiben Tumorzellen Glykolyse, selbst wenn eine ausreichende Sauerstoffkonzentration vorliegt (Warburg 1956). Diese „aerobe“ Glykolyse benötigt, anders als der Name vermuten lässt, keinen Sauerstoff. Dabei wird Pyruvat nicht in den Citratzyklus geschleust, sondern im Cytosol zu Laktat fermentiert, wobei lediglich 4

Moleküle ATP pro Glukosemolekül gewonnen werden. Während Warburg noch postulierte, dass Tumorzellen diesen – energetisch scheinbar ungünstigen – Wechsel eventuell aufgrund eines Defekts der Mitochondrien vollziehen, wird heute davon ausgegangen, dass diese Art der Energiegewinnung trotz geringerer ATP-Ausbeute Vorteile für die Zelle bringt. So zeigen auch proliferierende Normalgewebszellen einen, durch Wachstumsfaktoren initiierten, vorübergehenden Wechsel zur Fermentation der Glukose, da somit zusätzlich zu dem gewonnenen ATP alle benötigten Bausteine zur Generierung von neuer Biomasse gewonnen werden können, wie beispielsweise NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), reduced) und Pyruvat (Kilburn *et al.* 1969, Vander Heiden *et al.* 2001, Lunt und Vander Heiden 2011). Des Weiteren korreliert eine erhöhte Serum-Laktatkonzentration bei schweren Kopfverletzungen mit einer besseren Regeneration und geringeren Spätfolgen, was sich durch eine schnellere Verfügbarkeit benötigter Energie für den Heilungsprozess erklären lässt (Cureton *et al.* 2010).

Außerdem besitzt das durch die Fermentation gewonnene Laktat antioxidative Wirkung, so dass Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies verringert werden (Herz *et al.* 1997, Groussard *et al.* 2000, Sattler *et al.* 2010). Seymour und Mothersill (1981) konnten nachweisen, dass eine erhöhte Laktatkonzentration einen radioprotektiven Effekt vermitteln kann. Jedoch ist dafür ausschlaggebend, wie lange Zellen diesen erhöhten Werten ausgesetzt sind. Bei länger andauernder Erhöhung besitzt Laktat eine sensibilisierende Wirkung. Ein ausgewogenes Maß an Laktat scheint jedoch vorteilhaft für das Zellüberleben zu sein. Auch *in vivo* konnte eine Korrelation des Laktatgehalts mit gesteigerter Radioresistenz nachgewiesen werden (Quennet *et al.* 2006).

1.6 Zielsetzung

Ortho-Phospho-L-Tyrosin (pTyr), ein Aminosäurederivat, stellt einen Vertreter der selektiven Radioprotektoren dar. Durch die Besonderheit, dass er seine protektive Wirkung nur in Zellen mit einem Wildtyp des TP53-Proteins zeigt, Zellen mit einem mutierten TP53 jedoch nicht schützt beziehungsweise sogar gegenüber Strahlung sensibilisiert, ist er vor allem in der Radiotherapie von Interesse, da ein Großteil der soliden Tumoren eine Mutation in dem Tumorsuppressor TP53 aufweist. Eine Behandlung mit pTyr vor Bestrahlung kann somit ermöglichen, die applizierte Strahlendosis auf das Tumorgewebe zu erhöhen bei gleichbleibender bzw. sogar reduzierter Nebenwirkung auf das umliegende Normalgewebe.

Doch nicht nur beim gezielten therapeutischen Einsatz von Strahlung kann dieser Radioprotektor die Schädigung des Normalgewebes reduzieren, auch in Hinsicht auf ungeplante Strahlung, wie etwa durch berufliche Exposition oder nukleare Unfälle, birgt pTyr ein hohes Potenzial, strahleninduzierte DNA-Schäden zu minimieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die protektive Wirkung von pTyr auch bei anderen Strahlenqualitäten entfaltet. Hierzu wurden die Effekte von pTyr nach α -Teilchen-Bestrahlung untersucht, einer Strahlung die, im Gegensatz zum nieder-energetischem Energietransfer von γ -Strahlung, einen hohen linearen Energietransfer aufweist und somit ein anderes Schadensspektrum in der Zelle bewirkt.

Darüber hinaus sollte der molekulare Wirkmechanismus von pTyr eingehender untersucht werden, da dieser bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die verwendeten Zelllinien (Tab. 2.1) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit 44 mM NaHCO₃ (Biochrom AG) kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium je nach Versuch 10 % - 20 % fötales Kälberserum (FCS, PAN Biotech GmbH), sowie 1 % Penicillin/ Streptomycin (Gibco) zugegeben. A549PON-Zellen wurden alle drei Tage mit Geneticin behandelt, um sicherzustellen, dass nur Zellen mit TP53mut-Plasmid, an welches eine entsprechende Resistenz gekoppelt ist, überleben. Die Expression des mutierten TP53-Proteins wurde durch Zugabe von 5 µl Ponasteron/ ml Medium aktiviert.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	TP53-Status
A549	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (human)	ATCC	Wildtyp
HSF4	Hautfibroblasten (human)	Tübingen	Wildtyp
FaDu	Plattenepithelkarzinom (human)	ATCC	Mutiert: R248L
A549PON	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (human)	Dittmann <i>et al</i> , 2003	Ponasteron-induzierbare Expression eines mutierten TP53-Proteins, welches das Wildtyp-Protein inhibiert

DMEM-Medium:

12,04 g Mediapulver (DMEM, low glucose)

3,3 g NaHCO₃

10 ml Penicillin/ Streptomycin

ad 900 ml ddH₂O

pH 7,2

100 ml bzw. 200 ml FCS (10 % bzw. 20 %)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Zellkulturwaren	BD Falcon
Whatman-Papier	Whatman, GE Healthcare
Nitrocellulose-Membran (Optitran)	Whatman, GE Healthcare
PVDF-Membran	Roth
Röntgenfilme	AGFA
Klonierungsringe	Fisher Scientific

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die benötigten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences, Applichem, BioRad, Merck, Roth, Serva, Sigma-Aldrich, Pharmacia Biotech.

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Produkt	Firma
BSA	Roth
Entwickler/ Fixierer (Western-Blot)	Agfa
Geneticin	Invitrogen
Phosphataseinhibitor-Cocktail III	Sigma-Aldrich
Ponasteron A	Invitrogen
Ponceau S-Färbelösung	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor complete	Roche
Protein Standard für SDS-Gele (Kaleidoscope)	Bio-Rad
Trypsin (10 x)	Sigma-Aldrich

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell/Hersteller
Zentrifugen	Hettich Universal 30 RF (r = 142 mm) Hettich Mikro 200R, Rotor 2424 (r = 85 mm)
SDS-Page-Kammer	Hoefer SE 600 Ruby, Amersham Biosciences Rotiphorese PRO clamp MINI, Roth
Inkubator Zellkultur	Binder
Tank-Blotting-Apparatur	PEQ-Lab/ OWL Separation Systems/ Roth
pH-Meter	WTW Digital pH Meter pH 525
Röntgenbestrahlungsgerät	Gulmay Medical RS225 Research System (March 2004) Comet MXR-225/22, Nom Volt 225 kV, Power 640-3000 W, Focal Spot 1-5,5 mm Filament A (V) 4,1 (3,0)-4,2 (5,5), Inh. Filtration 0,8 mm
Zyklotron	Physikalisch Technische Bundesanstalt, Braunschweig
Entwicklungsmaschine	AGFA
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson

2.1.5 Lösungen und Puffer

Coomassie-Färbelösung:

- 0,5 g Coomassie G250
- 200 ml Methanol (20 %)
- 75 ml Eisessig (7,5 %)
- ad 1 l H₂O

Kernisolationspuffer:

- 100 µl Hepes (pH 7,9)
- 40 µl KCl (2,5 M)
- 12 µl EDTA (0,5 M)
- ½ Tablette Proteaseinhibitor
- 100 µl Phosphataseinhibitor
- ad 10 ml H₂O

Material und Methoden

Labeling-Medium (LM):	3 g FCS (2 %) 3 ml 10 % ige NaAzid (0,2 %) 750 µl TritonX (0,5 %) ad 150 ml PBS
Ladepuffer (2 x, SDS-Page):	25 ml 4 x Sammelgel-Puffer 20 ml 10 % SDS 20 ml Glycerin 2,5 mg Bromphenolblau ad 95 ml ddH ₂ O Aliquots à 0,5 ml 5 % Mercaptoethanol vor Gebrauch
Laufpuffer (SDS-Page):	72,05 g Glycin 15,15 g Tris base 5,0 g SDS ad 5 l ddH ₂ O
Lysepuffer (LP) Gesamtlysat:	50 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM Glycerolphosphat 150 mM NaCl 10 % Glycerin 1 % Tween20 pro 10 ml LP: 100 µl Phosphataseinhibitor ½ Tablette Proteaseinhibitor
Mitochondrien-Medium:	125 mM Sucrose 65 mM KCl 10 mM Hepes pH 7.2 0,5 mM EGTA 1 mM MgCl ₂ 2 mM KH ₂ PO ₄

Material und Methoden

PBS:	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Sammelgel-Puffer:	30,3 g Tris base 20 ml 10 % SDS pH 6,8 ad 500 ml ddH ₂ O
Stripping-Puffer:	0,2 M Glycin 0,1 % SDS 1,0 % Tween20 pH 2,2
TBST-Waschpuffer:	7,88 g Tris-HCl, pH 7,5 29,22 g NaCl 5 ml Tween20 ad 5 l ddH ₂ O
Transfer-Puffer:	46,4 g Tris base 23,2 g Glycin 2,96 g SDS 1,6 l Methanol ad 8 l H ₂ O
Trenngel-Puffer:	90,85 g Tris base 20 ml 10 % SDS pH 8,8 ad 500 ml ddH ₂ O

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Antikörper.

Primäre Antikörper

Name	Herkunft	Firma
Phospho-ATM (Ser1981) (10H11.E12)	Maus, monoklonal	Cell Signaling
ATM (D2E2)	Kaninchen, monoklonal	Abcam
Rabbit polyclonal to DNA-PKcs (phospho S 2056)	Kaninchen, polyklonal	Abcam
P-DNA-PK-T 2609	Kaninchen, polyklonal	BD Biosciences
Anti-DNA-PK (Ab-2) Mouse mAb (18-2)	Maus, monoklonal	Calbiochem
Phospho-AKT (S274) Antibody	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Phospho-AKT (Thr308) Antibody	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
AKT	Maus, monoklonal	BD Biosciences
Aktin	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich
Lamin B1	Kaninchen, polyklonal	Abcam
Acetyl- and Phospho-Histone H3 (Lys9/ Ser10) Antibody	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Histon H3 (D1H2)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling
Phospho- GSK-3 α/β (Ser21/ 9) (37F11) Rabbit mAb (GSK-3 α Preferred)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
GSK-3 α/β (D75D3) Rabbit mAb	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
PhosphoDetect TM Anti-PDH-E1 α (pSer293) Rabbit pAb	Kaninchen, polyklonal	Calbiochem
PDH-E1 α (9H9): sc-65242	Maus, monoklonal	Santa Cruz
Anti-Cytochrom-C Purified (6H2)	Maus, monoklonal	eBioscience
P-H2AX-S139 (γ H2AX) clone JBW301	Maus, monoklonal	Millipore

Sekundäre Antikörper

Name	Herkunft	Firma
Anti-Maus-IgG	Schaf	GE-Healthcare
Anti-Kaninchen-IgG	Esel	GE-Healthcare
Anti-Maus-Alexa Fluor488	Ziege	MolecularProbes

2.1.7 Farbstoffe

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Farbstoffe.

Anwendung	Produkt	Firma
Nachweis der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies	MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator *for live-cell imaging* (M36008)	Invitrogen
DNA-Färbung für Microbeam-Scan	Hoechst33342	Sigma-Aldrich
DNA-Färbung für γ H2AX-Assay	VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories
Zellzyklusanalyse	Propidiumiodid (PI),	Sigma-Aldrich

2.1.8 Kits

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Kits.

Anwendung	Kit	Firma
Detektion Western Blot	ECL-Detection Kit	GE Healthcare
Proteinbestimmung	Bio-Rad DC™ Protein Assay	Bio-Rad
ATP-Messung	ATP Assay Kit (Colorimetric/ Fluorometric)	Abnova
Laktat-Messung	Lactate Assay Kit II	Bio Vision

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die in Tabelle 2.1 aufgeführten Zelllinien wurden unter 7 % CO₂ und bei 37° C in einer feuchten Atmosphäre in einem Brutschrank der Firma Binder kultiviert. Für Versuche wurden ausschließlich Zellen aus konfluenten Massenkulturen ausgesät. Die Versuchsdurchführung erfolgte ebenfalls mit konfluenten Zellen. Die Hautfibroblastenzelllinie HSF4 wurde bis zu einer CPD (cumulative population doublings, Summe der Populations-Verdopplungen) von 20 verwendet.

2.2.2 Bestrahlung

2.2.2.1 Bestrahlung mit γ -Strahlung (Low-LET)

Die Röntgenbestrahlung wurde mit dem Röntgenerators R225 (Gulmay) mit 200 kV und 15 mA durchgeführt. Die Dosisleistung betrug 1 Gy/ min. Um unerwünschte Nebeneffekte von gestreuten niederenergetischen Photonen zu reduzieren, wurde ein 0,5 mm dicker Kupferfilter eingesetzt.

2.2.2.2 Bestrahlung mit α -Teilchen (Hoch-LET)

Die Bestrahlung mit α -Teilchen wurde an der Mikro-Ionenstrahl- (Microbeam-) Einrichtung der Physikalisch Technischen Bundesanstalt (PTB), Braunschweig, mittels Zyklotron durchgeführt (Greif *et al.* 2004, Greif *et al.* 2006). Dabei wurde gezielt der Zellkern bestrahlt.

Hierzu wurden Zellen in einem Volumen von 20 μ l auf mit BioFoil beschichtete Metallträger getropft. Nach Adhäsion der Zellen wurde der Träger mit Medium befüllt. Eine Stunde vor Bestrahlung wurde das Medium abgenommen, die Zellkerne mit Hoechst33342 (Endkonzentration 150 nmol) gefärbt, nach der Färbung das alte Medium wieder zugegeben, der Träger in die Microbeam-Vorrichtung eingespannt und die Zellen gescannt, um eine gezielte Bestrahlung der Zellkerne zu ermöglichen.

Die Energie des Strahls betrug 10 MeV α . Da der Strahl durch Luft, Trägerfolie und Wasser (Medium, Cytoplasma) Energie verliert, wurde im Zellkern ein LET von 140-170 keV/ μ m

erreicht. Unter Berücksichtigung der relativen biologischen Wirksamkeit ergab sich eine Dosis von ca. 1 Gy bei Bestrahlung mit 3 α -Teilchen pro Zellkern.

2.2.3 Koloniebildungstest – Klonogenes Überleben konfluenter Zellen

Zellen wurden in T12,5-Flaschen ausgesät. Die Zellen wurden in stationärer Phase mit den zu testenden Reagenzien behandelt und mit 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt. Die Aussaat erfolgte 6 Stunden nach Bestrahlung. Dabei wurden je 500 Zellen pro 10 cm-Platte in Medium mit 20 % FCS ausgesät. Es wurden jeweils 4 Replikate angefertigt. Nach 10 (A549, A549PON, FaDu) bis 14 (HSF4) Tagen Wachstum wurden die Kolonien mit Ethanol fixiert und mit Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt. Es wurden Kolonien mit mindestens 50 Zellen gezählt. Das Überleben wurde auf die jeweilige unbestrahlte Kontrolle normiert:

Die Überlebensfraktion SF (survival fraction) errechnet sich wie folgt:

$$SF_{(x \text{ Gy})} [\%] = \# \text{ Kolonien } (>50 \text{ Klone})_{(x \text{ Gy})} / (\# \text{ ausgesäter Zellen} \times \text{PE})$$

Dabei gibt x Gy die jeweilige Dosis und PE die Plattiereffizienz an, das heißt, wie viele der ausgesäten Zellen ohne Bestrahlung die Fähigkeit besitzen, Kolonien mit über 50 Klonen zu bilden:

$$\text{PE} [\%] = SF_{(0 \text{ Gy})} = \# \text{ Kolonien } (>50 \text{ Klone})_{(0 \text{ Gy})} / \# \text{ ausgesäter Zellen} \times 100$$

Da in den Versuchen für alle Ansätze die gleiche Zellzahl ausgesät wurde, vereinfacht sich diese Formel folgendermaßen:

$$SF_{(x \text{ Gy})} [\%] = \# \text{ Kolonien } (>50 \text{ Klone})_{(x \text{ Gy})} / \# \text{ Kolonien } (>50 \text{ Klone})_{(0 \text{ Gy})} \times 100$$

Die Fraktion der überlebenden Klone wurde in einer interpolierten Überlebensfunktion halblogarithmisch dargestellt:

$$SF = SF_{(0 \text{ Gy})} \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

Dabei beschreibt D die applizierte Dosis, die lineare Komponente $-\alpha D$ die Anfangsneigung der Kurve und die quadratische Komponente $-\beta D^2$ die Krümmung. Die beiden Faktoren α und β stellen zell- bzw. gewebespezifische Komponenten dar.

2.2.4 Proteinanalyse mittels Westen Blot

2.2.4.1 Aufbereitung von Gesamtlysat-Proteinen

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert und bei 20.000 x g abzentrifugiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe des Bio-Rad DC™ Protein Assays nach Anweisung des Herstellers. Als Standard wurde BSA verwendet. Es wurden 5 µl Probe in dreifachen Ansätzen gemessen.

Für die Proteinisolierung nach Bestrahlung mit α -Partikeln wurden je Kondition vier Träger gepoolt, um genügend Protein für die Western-Blot-Analyse zu erhalten.

2.2.4.2 Aufbereitung der Proteine aus Kern- und Cytoplasmafraktion

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in Kernisolationspuffer mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspensionen wurden 30 min bei 4° C auf dem Schwenktisch inkubiert, anschließend wurde 1 % NP-40 zugegeben und die Proben 10 sec gevortext. Durch Zentrifugation bei 20.000 x g wurden die Kerne (Pellet) von der cytoplasmatischen Fraktion (Überstand) getrennt. Die Kernfraktion wurde weitere drei Male mit kaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert. Dem Pellet wurde wieder Kernisolationspuffer zugegeben, die Kerne mittels Ultraschall lysiert und bei 20.000 x g zentrifugiert. Die Konzentration der im Überstand enthaltenen Kernproteine und der cytoplasmatischen Proteine wurde mit dem Bio-Rad DC™ Protein Assay nach Anweisungen des Herstellers bestimmt. Als Standard wurde BSA verwendet. Es wurden 5 µl (Cytoplasma) bzw. 3 µl (Kern) Probe in dreifachen Ansätzen gemessen.

2.2.4.3 Western Blot

Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) der Größe nach aufgetrennt und im Anschluss durch Tank-Blotting auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Dabei war die Verwendung der PVDF-Membran für den Nachweis des Proteins LC3 nötig, alle weiteren Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membran untersucht.

Proben wurden zu gleichen Teilen mit Ladepuffer gemischt, 5 min bei 100° C im Wasserbad aufgeköcht und je Kondition 100 µg Protein auf ein Gel aufgetragen. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei 0,1 mA/ cm² und der Proteintransfer auf die Membran bei 5,7 mA/ cm².

Die übertragenen Proteine wurden mittels Ponceau-S-Färbung sichtbar gemacht und dokumentiert. Die Membran wurde, je nach Antikörper, mit 5 % BSA oder 5 % Milch abgesättigt und über Nacht bei 4° C mit Primär-Antikörper in 3 % BSA oder 3 % Milch inkubiert. Es folgten drei Waschschrirte mit TBS-T für je 10 min. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit entsprechendem Sekundärantikörper inkubiert und abermals dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mithilfe des ECL-Detection Kits (GE Healthcare) auf Röntgenfilm. Für weitere Antikörpernachweise wurden alte Antikörper von der Membran durch Inkubation in Stripping-Puffer (2 x 15 min) abgelöst.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von γ H2AX-Foci

Zellen wurden in 4well-CultureSlides (γ -Strahlung) bzw. Träger mit BioFoil (α -Teilchen-Be-strahlung) ausgesät. Die jeweilige Behandlung erfolgte nach Erreichen der Konfluenz in Duplikaten. Die Slides/ Träger wurden dem Versuch entsprechend bestrahlt und nach entsprechender Zeit mit eiskaltem 70 % Ethanol fixiert. Das Ethanol wurde in drei Waschschrirten mit kaltem PBS entfernt. Die Zellen wurden durch Zugabe von PBS + TritonX 10 min permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen mit 3 % BSA/ PBS 15 min bei RT geblockt. Der Primärantikörper (anti-Histon H2AX P-S139, mm) wurde in 1 % BSA/ PBS für 1,5 h bei RT zugegeben. Nach weiteren drei Waschschrirten mit PBS wurden die Zellen für 1 h mit Sekundärantikörper (Alexa 488 anti-mouse) im Dunkeln inkubiert. Der Antikörper wurde durch Waschen entfernt und ein Tropfen Vectashield (mit Dapi) aufgetragen, um die Zellen einzubetten und die Zellkerne zu färben. Nach Auflegen des Deckglases wurden an einem Zeiss-Mikroskop mit integrierter Kamera repräsentative Bilder gemacht. Es wurden je Kondition 150 (HSF4) - 500 (A549, A549PON) Kerne ausgewertet.

2.2.6 Bestimmung der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies

Bei der oxidativen Phosphorylierung, also der mitochondrialen Atmung, entweicht stets ein gewisser Teil der Elektronen, ohne vollständig reduziert worden zu sein. Diese können mit Sauerstoffmolekülen zu Dioxid-Anionen (O_2^-) reagieren, der vorherrschenden Art reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien.

Der fluorogene Farbstoff MitoSOX™ Red von Invitrogen, ein Ethidiumbromid-Derivat, ist zellpermeabel und wird in den Mitochondrien von O_2^- oxidiert. Das entstandene Oxidationsprodukt besitzt eine rote Fluoreszenz, welche durch Bindung an Nukleinsäuren noch intensiviert wird. Der Farbstoff besitzt eine Anregung/Emission von 510/ 580 nm.

Konfluente Zellen wurden nach Protokoll behandelt und/ oder bestrahlt. Der Farbstoff wurde in serumfreiem Medium auf eine Endkonzentration von 5 μ M gebracht. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, 15 min mit Farbstoff abgedunkelt im Brutschrank inkubiert, gewaschen, abtrypsiniert und mit 3,7 % Formaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Die gewaschenen Zellpellets wurden in PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer.

2.2.7 Bestimmung des Cytochrom-C-Gehalts

Zellen wurden nach Protokoll behandelt, trypsiniert, bei 1.000 x g zentrifugiert, das Pellet dreimal mit PBS gewaschen und in 1 ml Mitochondrien-Medium + Proteaseinhibitor resuspendiert. Um die Zellmembran permeabel für bereits ausgeschüttetes Cytochrom C zu machen, wurden 0.001 % Digitonin zugegeben, die Zellen 10 min bei RT inkubiert und bei 1000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde 20 min bei RT mit 3,7 % PFA/ PBS fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen für 15 min in Labeling-Medium (LM) blockiert. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 5 min wurden die Zellen über Nacht bei 4° C mit Primärantikörper (anti-cytochrome-c) in LM, anschließend für 1 Stunde bei 4° C mit Sekundärantikörper (Alexa-Fluor488 anti-mouse) in LM inkubiert und das Pellet in PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer.

Digitonin, ein mildes nichtionisches Tensid, permeabilisiert die Zellmembran, sodass Cytochrom C, das bei Apoptose bereits von den Mitochondrien ins Cytoplasma freigesetzt wurde, aus der Zelle austreten kann. Somit bedeutet eine hohe Fluoreszenz, dass die

gemessenen Zellen noch intakte Mitochondrien haben, eine niedrige Fluoreszenz bedeutet eine Reduktion des Cytochrom C in den Mitochondrien.

2.2.8 Bestimmung des Zellzyklus

Mithilfe des Farbstoffs Propidiumiodid, der in die DNA interkaliert, kann der DNA-Gehalt in der Zelle im Durchflusszytometer bestimmt werden. Da sich dieser je nach Zellzyklusphase unterscheidet, ergeben sich unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten für jede Phase, sodass der prozentuale Anteil einer Zellpopulation pro Zellzyklusphase ermittelt werden kann.

Konfluente Zellen wurden 16 h mit pTyr behandelt, mit 4 Gy bestrahlt, mit Trypsin geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 70 % Methanol 1 h fixiert und permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS wurde das Pellet in PBS resuspendiert und für 10 min bei 37° C (Brutschrank) mit RNase versetzt (100 µg/ ml Endkonzentration). Es wurde für 5 min Propidiumiodid (PI, 10 µg/ ml) zugegeben, die Proben anschließend zentrifugiert und das Pellet für die Analyse im Durchflusszytometer in 300 µl PI + RNase (2 µg/ ml) resuspendiert.

2.2.9 Bestimmung der ATP-Konzentration

Die Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte mithilfe des ATP-Assay-Kits (Abnova) nach Anweisung des Herstellers. Konfluente Zellen wurden nach Protokoll behandelt und/ oder bestrahlt, zweimal mit PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers in 250 µl ATP-Puffer (Kit) geerntet. Die Zellen wurden durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Größere Moleküle wurden über Centrikon-Säulen bei 20.000 x g herausgefiltert und es wurden 50 µl Filtrat im Assay eingesetzt. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader.

2.2.10 Bestimmung der Laktat-Konzentration

Die Bestimmung der Laktat-Konzentration erfolgte mithilfe des Lactate-Assay-Kits II von BioVision nach Anweisung des Herstellers. Konfluente Zellen wurden nach Protokoll behandelt und/ oder bestrahlt. Für die Bestimmung der Laktat-Konzentration im Medium wurde das Medium 1:100 in Laktat-Puffer verdünnt. Je nach Zellart wurden 0,1 - 0,5 µl Medium im Assay eingesetzt.

Für die Messung des Laktat-Gehalts im Zelllysate wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers in 250 µl Laktat-Puffer (Kit) abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Ultraschallbehandlung. Größere Moleküle, die das Assay beeinflussen könnten, wurden über Centrikon-Säulen bei 20.000 x g herausgefiltert. Es wurden 50 µl des Filtrats für das Assay eingesetzt.

Die Messung wurde im ELISA-Reader durchgeführt.

2.2.11 Densitometrische und statistische Auswertung

Alle densitometrischen Auswertungen der Western Blots wurden mit ImageJ durchgeführt. Unabhängige Wiederholungen eines Versuches wurden in SigmaPlot mittels zweiseitigem student-t-Test auf Signifikanz überprüft, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ festgelegt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 pTyr wirkt radioprotektiv gegenüber Hoch- und Nieder-LET-Strahlung

3.1.1 pTyr verbessert klonogenes Überleben nach Nieder-LET

Wie bereits von Dittmann *et al.* (2001) gezeigt wurde, wirkt O-Phospho-L-Tyrosin bei einer Konzentration von 10 μM protektiv in Zellen mit Wildtyp-TP53, nicht jedoch in Zellen mit mutiertem TP53. Deswegen wurde zunächst die protektive Eigenschaft von pTyr auf TP53wt-Zellen gegenüber Nieder-LET-Strahlung in der humanen Hautfibroblastenzelllinie HSF4 und der nichtkleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 überprüft. Beide Zelllinien weisen eine Expression des Wildtyps des TP53-Proteins auf. Eine 16-stündige Vorbehandlung mit 10 μM pTyr führte in diesen TP53-Wildtyp-Zellen zu besserem Überleben nach Bestrahlung, ersichtlich an der klonogenen Überlebensfraktion im Koloniebildungs-Assay. Sowohl normale Hautfibroblasten als auch A549-Zellen, die mit pTyr vorbehandelt wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Koloniebildung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.1).

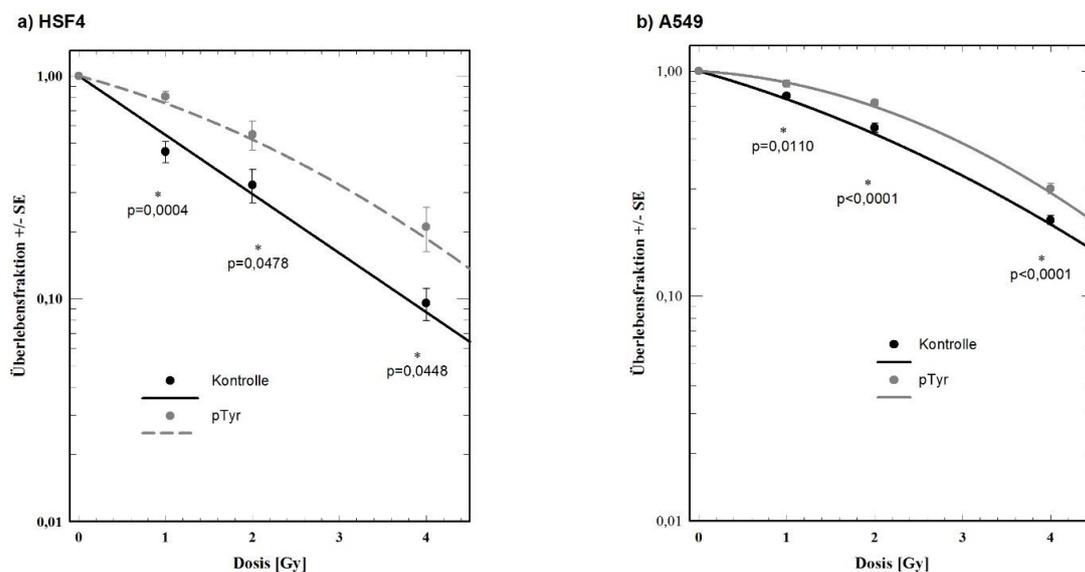


Abbildung 3.1: Klonogenes Überleben von HSF4-Zellen (a) und A549-Zellen (b) nach γ -Strahlung und pTyr-Behandlung. Die Zellen wurden in Massenkultur für 16 h mit 10 μM pTyr vorbehandelt oder mit entsprechendem Volumen Wasser als Kontrolle. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit 1, 2 oder 4 Gy. Die Aussaat erfolgte 6 h nach Bestrahlung (je 4 Replikate). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Datenpunkte zeigen die Überlebensfraktion auf Basis der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Dagegen führte eine Vorbehandlung mit pTyr in der Plattenepithel-Karzinomzelllinie FaDu, die ein mutiertes TP53-Protein exprimiert, nicht zu einer Protektion (Abb. 3.2). Die behandelten Zellen zeigten keine Abweichung im Überleben gegenüber der Kontrolle.

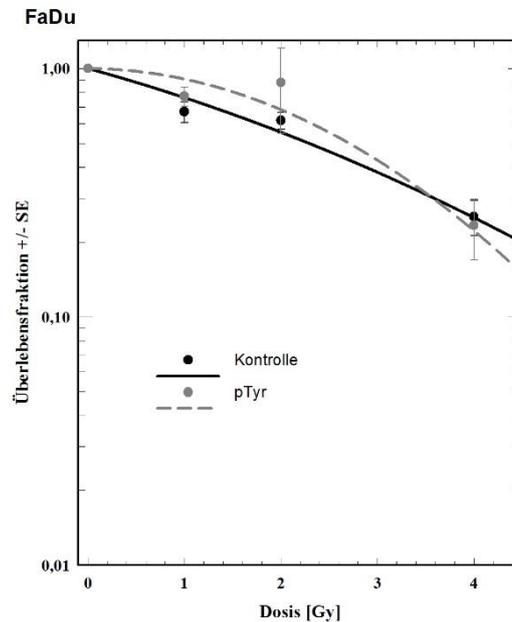


Abbildung 3.2: Klonogenes Überleben von FaDu-Zellen nach γ -Strahlung und pTyr-Behandlung. Die Zellen wurden in Massenkultur für 16 h mit 10 μ M pTyr vorbehandelt oder mit entsprechendem Volumen Wasser als Kontrolle. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit 1, 2 oder 4 Gy. Die Aussaat erfolgte 6 h nach Bestrahlung (je 4 Replikate). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Datenpunkte zeigen die Überlebensfraktion auf Basis der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

Während in FaDu-Zellen kein protektiver Effekt durch eine pTyr-Behandlung beobachtet werden konnte, führt die Behandlung anderer TP53-mutierter Zellen mit pTyr sogar zu einer Radiosensibilisierung. Dies konnte anhand einer modifizierten A549-Zelllinie (A549PON) gezeigt werden. In diesen Zellen kann durch eine Ponasteron-Behandlung die Expression eines mutierten TP53-Proteins induziert werden, welches das Wildtyp-Protein blockiert. Während die nichtinduzierten A549PON-Zellen (A549PON-TP53wt) ähnlich auf pTyr reagieren wie normale A549-Zellen, bewirkt die pTyr-Behandlung bei den mit Ponasteron aktivierten Zellen (A549PON-TP53mut) eine Verringerung des klonogenen Überlebens gegenüber den nicht behandelten Zellen (Abb. 3.3). Somit scheint der Wirkungsgrad von pTyr stark von der Art der Mutation des TP53-Proteins abzuhängen.

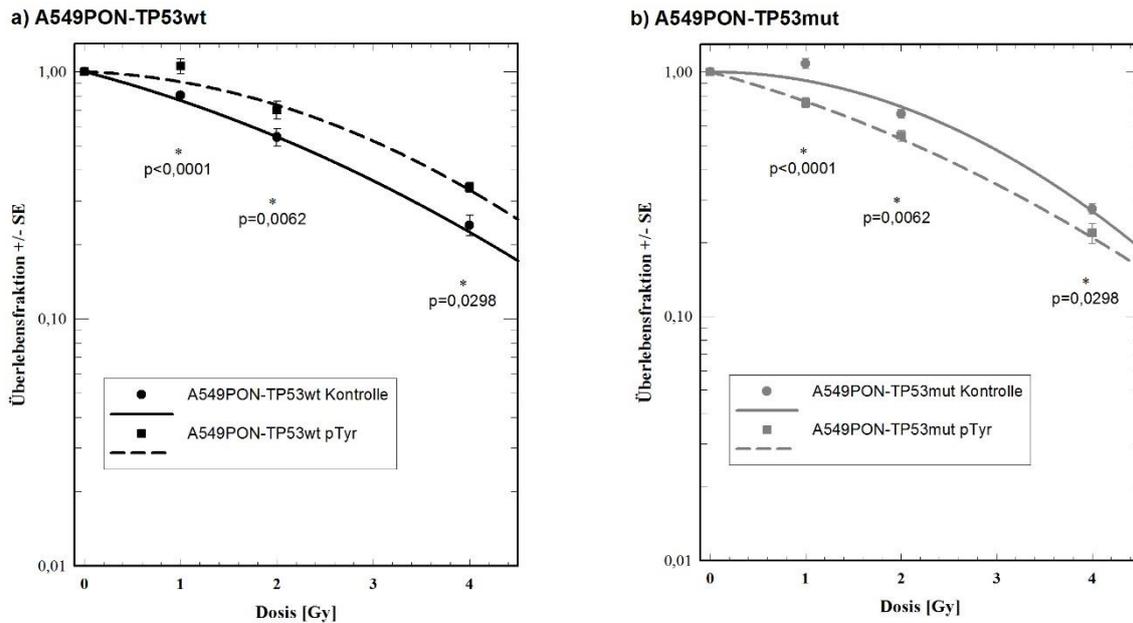


Abbildung 3.3: Klonogenes Überleben von A549PON-Zellen nach γ -Strahlung und pTyr-Behandlung. Die Zellen wurden in Massenkultur mit Ponasteron (TP53mut) bzw. Lösungsmittel (TP53wt) behandelt, danach für 16 h mit 10 μ M pTyr bzw. Lösungsmittel. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit 1, 2 oder 4 Gy. Die Aussaat erfolgte 6 h nach Bestrahlung (je 4 Replikate). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Datenpunkte zeigen die Überlebensfraktion auf Basis der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.1.2 pTyr verbessert klonogenes Überleben nach Hoch-LET

Der positive Einfluss von pTyr auf das klonogene Überleben wurde auch bei Bestrahlung mit Hoch-LET (α -Teilchen-Strahlung) überprüft. α -Strahlung besitzt im Gegensatz zu γ -Strahlung eine höhere biologische Wirksamkeit, da die Energie in einem geringen Volumen absorbiert wird (Ionisationscluster), was mehr beziehungsweise gravierendere DNA-Doppelstrangbrüche zur Folge hat.

Zellen aus Massenkultur wurden trypsinisiert und 20 μ l in einer Konzentration von 200 Zellen/ μ l in die Mitte eines mit BioFoil beschichteten Trägers aufgetropft. Somit ergab sich im Zentrum des Trägers ein Bereich, in welchem die Zellen Konfluenz erreichten. Aus technischen Gründen konnte nicht der komplette Träger mit Zellen besät werden. Nach Adhäsion wurde Medium zugegeben. Die Zellen wurden nach Behandlung mit pTyr mit Hoechst33342 gefärbt, in der Microbeam-Vorrichtung gescannt und die Kerne mit jeweils 3, 6 oder 12 α -Teilchen bestrahlt, was in etwa 1, 2 bzw. 4 Gy entspricht. Die Zellen wurden

direkt nach Bestrahlung auf 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät und nach 10 (A549) bzw. 14 Tagen (HSF4) fixiert.

Auch hier zeigte sich sowohl bei HSF4-Zellen als auch bei A549-Zellen ein signifikant verbessertes Überleben der pTyr-behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.4)

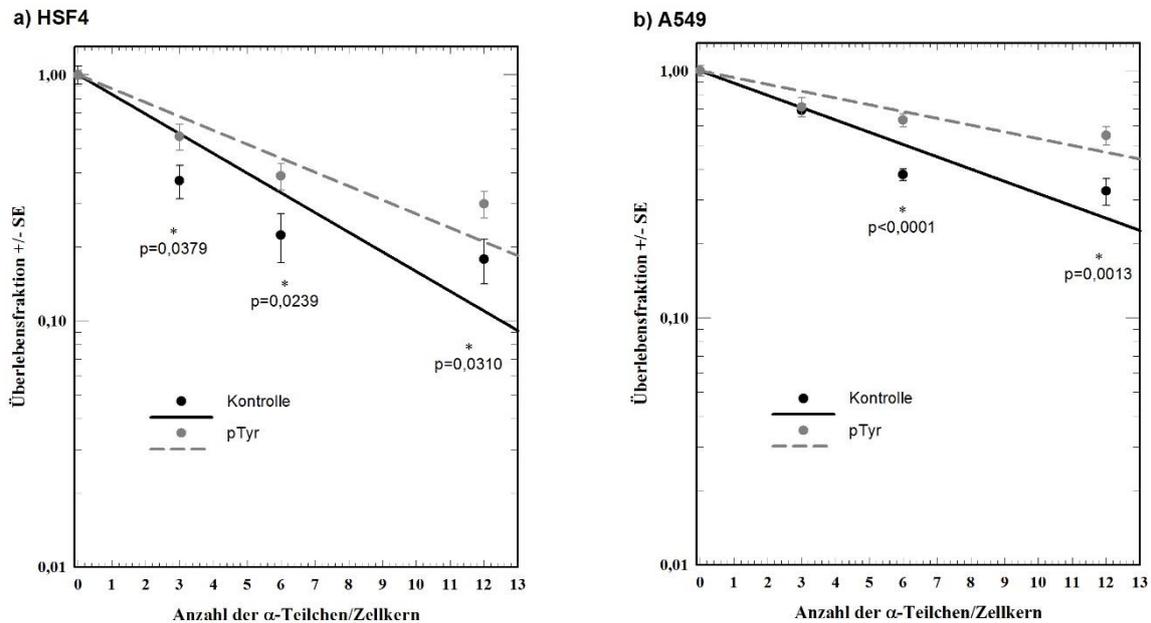


Abbildung 3.4: Klonogenes Überleben von HSF4-Zellen und A549-Zellen nach α -Teilchen-Strahlung und pTyr-Behandlung. a) HSF4- bzw. b) A549-Zellen wurden auf BioFoil-Trägern für 16 h mit 10 μ M pTyr vorbehandelt oder mit entsprechendem Volumen Wasser als Kontrolle. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit 3, 6, bzw. 12 α -Teilchen. Die Aussaat erfolgte direkt nach Bestrahlung (je 4 Replikate). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Datenpunkte zeigen die Überlebensfraktion auf Basis der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.2 pTyr modifiziert Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind

3.2.1 Eine pTyr-Vorbehandlung hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus

Als Reaktion auf DNA-DSB, durch Strahlung oder andere schädigende Substanzen, machen Zellen einen Zellzyklusarrest, um die nötigen Reparaturen vorzunehmen. Da in früheren Publikationen (Mishra und Hamburger 1996) festgestellt wurde, dass pTyr in millimolarer Konzentration zu einem Zellzyklusarrest führt, wurde getestet, ob die Vorbehandlung mit pTyr im mikromolaren Bereich ebenfalls zu einer Veränderung des Zellzyklus führt. Dazu

wurden A549-Zellen nach erfolgter Behandlung und/ oder Bestrahlung im Durchflusszytometer analysiert.

Die Behandlung von pTyr in der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration hatte keinerlei Auswirkung auf den Zellzyklus. Sowohl behandelte Zellen als auch Kontrollzellen befanden sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung vor allem in G1. Nach Bestrahlung mit 4 Gy verhielten sich die behandelten Zellen ebenfalls wie die Kontrollzellen, indem der gleiche Anteil an Zellen einen G2-Arrest zeigte (Abb. 3.5).

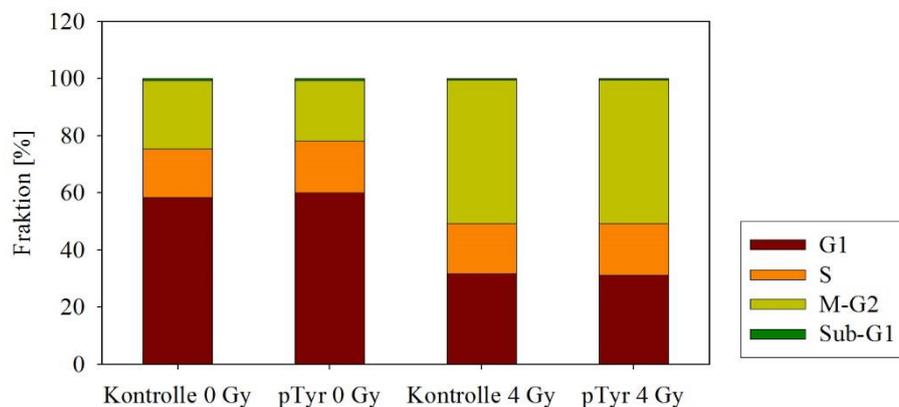


Abbildung 3.5: Einfluss von pTyr auf den Zellzyklus. A549-Zellen wurden mit 10 μ M pTyr für 16 h behandelt und mit 4 Gy bestrahlt, 6 h nach Bestrahlung geerntet, mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten sind aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

3.2.2 pTyr stabilisiert die Ataxia telangiectasia mutated (ATM)

Obwohl eine Vorbehandlung mit pTyr in der hier verwendeten Konzentration nicht zu einem Zellzyklusarrest führt, kommt es zu einer Stabilisierung von ATM, jedoch nicht zu verstärkter Phosphorylierung (Abb. 3.6). Die Autophosphorylierung von ATM an S 1981 erfolgt als Reaktion auf ionisierende Strahlung und stellt einen der ersten Schritte bei der Erkennung von DNA-Schäden dar (Bakkenist und Kastan 2003). Konfluente Zellen wurden für die angegebene Zeit mit pTyr behandelt und die Proteine des Gesamtllysats im Western Blot analysiert. Zwar blieb das Verhältnis des am Serinrest 1981 phosphorylierten ATM im Verhältnis zum Gesamtprotein gleich, die absolute Menge an phosphoryliertem Protein stieg jedoch an, da auch die Menge an Gesamtprotein anstieg.

Ergebnisse

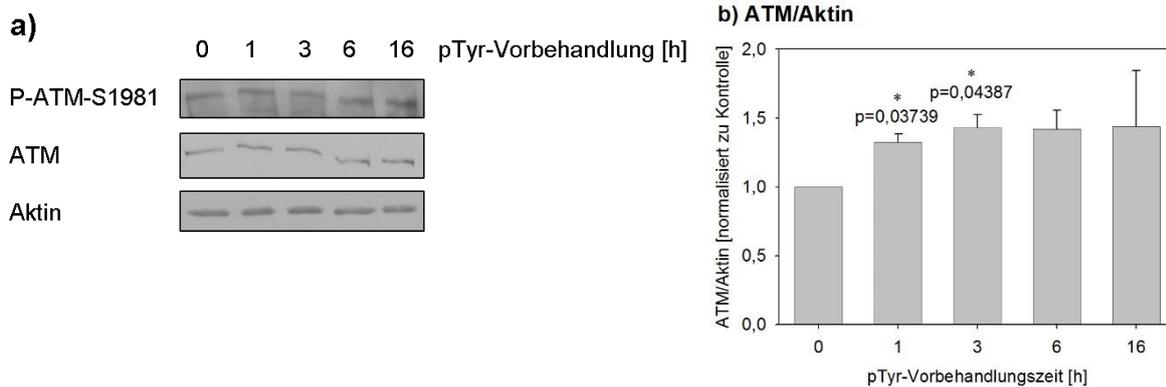


Abbildung 3.6: Expression von ATM in A549-Zellen nach pTyr. Konfluente A549-Zellen wurden für die jeweilig angegebene Zeit mit 10 μ M pTyr vorbehandelt und anschließend Proteine aus Gesamtlysat im Western Blot analysiert. a) repräsentativer Western Blot von A549-Zellen. b) Densitometrische Auswertung zusammengefasst aus drei Versuchen. Die Daten zeigen das Verhältnis von ATM zu Aktin normiert zur Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

Das Sternchen(*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.2.3 pTyr induziert die Phosphorylierung der DNA-PKcs

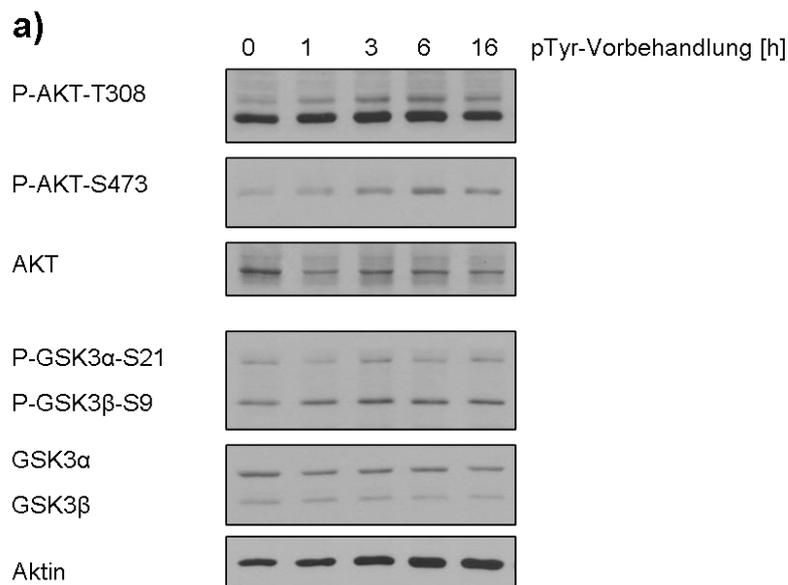
Wie Dittmann *et al.* (2007) bereits feststellen konnten, erhöht eine pTyr-Inkubation die Menge des Proteins DNA-PK und dessen Phosphorylierung am Threoninrest 2609. Dieser Anstieg ist gekoppelt an die durch pTyr vermittelte nukleäre Translokation des EGFR (Dittmann *et al.* 2005).

Neben der beobachteten Stabilisierung der ATM konnte auch ein Anstieg an Phosphorylierung der DNA-PK, sowohl am Serinrest 2056 als auch am Threoninrest 2609, durch eine pTyr-Vorbehandlung festgestellt werden (Abb. 3.7). Diese beiden Stellen werden normalerweise in Folge von durch ionisierende Strahlung entstandenen DNA-Doppelstrangbrüchen phosphoryliert. Dabei gehört die Phosphorylierungsstelle T 2609 zum Transphosphorylierungscluster (Chan *et al.* 2002, Meek *et al.* 2007). Die Phosphorylierung an T 2609 wird unter anderem durch ATM vermittelt und ist essenziell für die vollständige Aktivierung der DNA-PK (Chen *et al.* 2007), die Autophosphorylierung an S 2056 dahingegen ist partiell abhängig von aktivierter AKT. Jedoch erfolgt auch bei AKT-Inhibierung an dieser Stelle eine Autophosphorylierung als Reaktion auf eine Strahlenexposition, welche jedoch im Vergleich zu Zellen mit aktiver AKT nur etwa die Hälfte der Effektivität erreicht (Toulany *et al.* 2008, Toulany *et al.* 2012).

3.2.4 pTyr führt zu einer Aktivierung von AKT

Da die Phosphorylierung an S 2056, wie bereits unter 3.2.3 erwähnt, partiell abhängig ist von AKT, wurde im Folgenden der Einfluss von pTyr auf AKT untersucht. Dazu wurden wieder konfluente A549-Zellen für die angegebene Zeit mit 10 μ M pTyr behandelt und das Gesamtlysat-Protein im Western-Blot analysiert. Es wurde sowohl die AKT-Kinase und deren Phosphorylierung an S 473 und T 308, als auch das AKT-Substrat Glycogen-Synthase-Kinase GSK3 α/β und dessen Phosphorylierung untersucht (Abb. 3.8).

Während die Phosphorylierung von AKT am T 308 durch eine pTyr-Vorbehandlung signifikant anstieg (Abb. 3.8 b, $p = 0,0462$), war bei der Phosphorylierung von S 473 nur tendenziell ein Anstieg durch pTyr zu beobachten (Abb. 3.8 c). Entsprechend der verstärkten Aktivität von AKT war auch eine verstärkte Phosphorylierung von GSK3 α/β zu beobachten (Abb. 3.8 d + e).



Ergebnisse

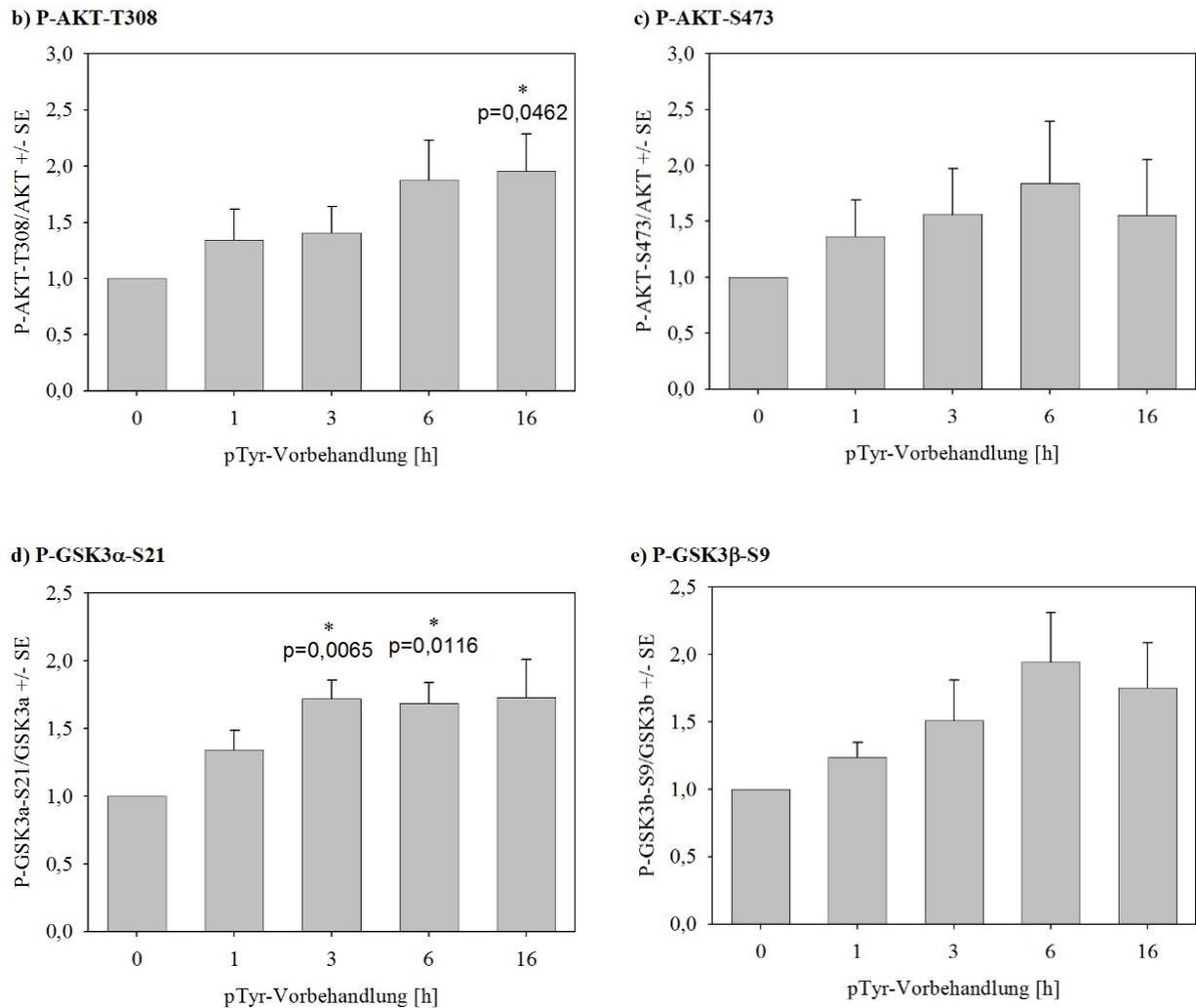


Abbildung 3.8: Expression von AKT und GSK3 α/β in A549-Zellen nach pTyr-Vorbehandlung. Konfluente A549-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 10 μ M pTyr vorbehandelt und anschließend Proteine aus Gesamtlysate im Western Blot analysiert. a) repräsentativer Western Blot von A549-Zellen. Densitometrische Auswertung erfolgte zusammengefasst aus drei Versuchen. b) Verhältnis von P-AKT-T 308 zu AKT, c) Verhältnis von P-AKT-S 473 zu AKT, d) Verhältnis von P-GSK3 α -S21 zu GSK3 α , e) Verhältnis von P-GSK3 β -S9 zu GSK3 β . Die Daten sind jeweils normiert zur Kontrolle \pm Standardfehler (SE). Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

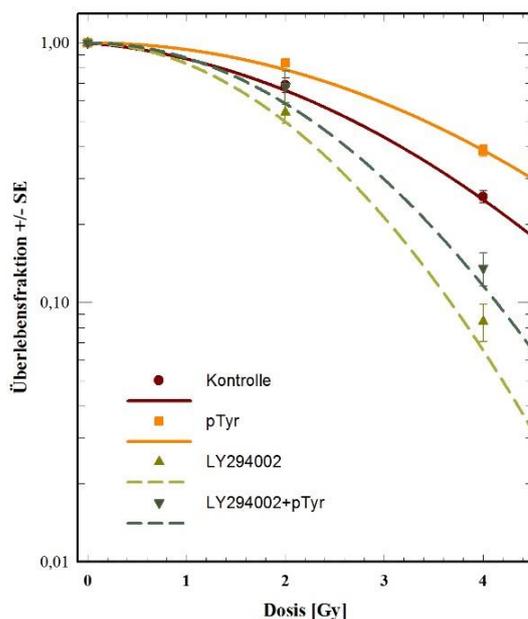
3.2.5 Einfluss der PI3-Kinase auf den pTyr-Effekt

Eine Inhibierung der PI3-Kinase durch LY294002 bewirkt für gewöhnlich eine starke Radiosensibilisierung, da somit auch die Aktivierung von AKT reduziert wird, welche wiederum mit der DNA-PKcs interagiert und somit zur DNA-DSB-Reparatur beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der radioprotektive Effekt von pTyr auch bei inhibierter PI3-Kinase auftritt. Für das klonogene Überleben wurden konfluente A549-Zellen mit 10 μ M LY294002 behandelt, zwei Stunden später erfolgte die gewohnte Behandlung mit pTyr.

Wie erwartet zeigten die LY294002-behandelten Zellen ein stark reduziertes Überleben gegenüber der Kontrolle. Eine zusätzliche Behandlung dieser Zellen mit 10 μ M pTyr resultierte jedoch wieder in einem besseren Überleben (Abb. 3.9a). Die zugehörigen p-Werte sind der besseren Übersicht wegen unter Abbildung 3.9b tabellarisch zusammengefasst.

a)



b)

p-Werte für 2Gy/ 4Gy		
	pTyr	LY294002
Kontrolle	0,0168/ <0,001	0,0329/ <0,001
LY294002+ pTyr	0,1392 / <0,001	0,1789 / 0,0371

Abbildung 3.9: Klonogenes Überleben von A549-Zellen nach Inhibierung der PI3-Kinase. a) Konfluente A549-Zellen wurden für zwei Stunden mit 10 μ M LY294002 bzw. DMSO behandelt, danach für 16 h mit 10 μ M pTyr. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung mit 2 oder 4 Gy. Die Aussaat erfolgte 6 h nach Bestrahlung (je 4 Replikate). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Datenpunkte zeigen die Überlebensfraktion auf Basis der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle \pm Standardfehler (SE). b) Zugehörige p-Werte bei 2 bzw. 4 Gy. Schwarze Zahlen bezeichnen signifikante Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ sind, rote Zahlen stehen für Unterschiede, die nicht signifikant sind.

3.3 pTyr beschleunigt die DNA-Reparatur

3.3.1 pTyr beschleunigt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und vermindert die Anzahl bleibender Schäden nach γ -Strahlung

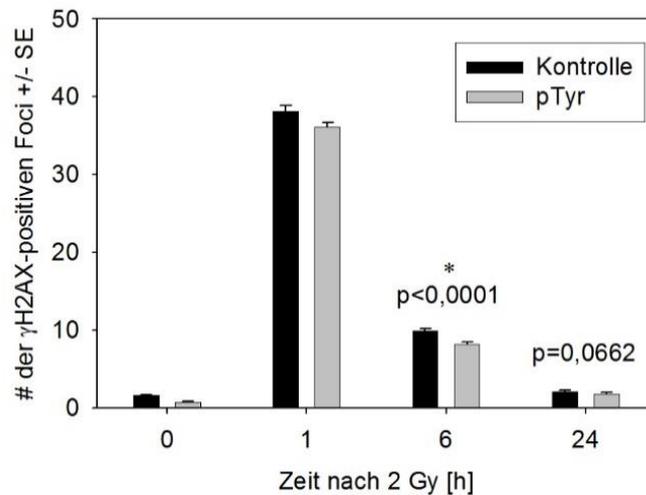
Das Histon H2AX wird in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen am Serinrest 139 phosphoryliert (γ H2AX) und dient als verlässlicher Indikator für diese Läsionen (Rogakou *et al.* 1998, Paull *et al.* 2000). An der Phosphorylierung von H2AX sind sowohl ATM als auch DNA-PK und ATR beteiligt (Wang *et al.* 2005). Da das Histon nach Reparatur wieder dephosphoryliert wird, kann durch Ermittlung der residuellen γ H2AX-positiven Foci auf die Reparatureffizienz rückgeschlossen werden. Für den Nachweis von γ H2AX-positiven Foci werden konfluente Zellen verwendet, da somit die Anzahl replikationsbedingter γ H2AX-positiver Foci auf ein Minimum reduziert wird.

Konfluente Zellen wurden für 16 h mit pTyr behandelt, mit 2 Gy bestrahlt und nach entsprechender Zeit fixiert. Nach Immunfluoreszenzfärbung wurden repräsentative Bilder unterm Mikroskop angefertigt und Foci in 150 - 500 Zellkernen ausgewertet.

Die Vorbehandlung von TP53-wt-Zellen mit pTyr führte zu einer tendenziell leicht beschleunigten Reduktion der γ H2AX-positiven Foci, was bereits nach 6 h ersichtlich war (Abb. 3.10). Dabei war kein Unterschied in der Induktion der Foci-Bildung zu erkennen, das heißt die verminderte Anzahl an Foci nach 6 bzw. 24 h resultierte nicht daraus, dass DNA-Doppelstrangbrüche nicht korrekt erkannt wurden, sondern vielmehr, dass diese nur tendenziell schneller erkannt und somit effizienter repariert werden konnten. Obwohl, wie zuvor gezeigt, die ATM stabilisiert wurde und die DNA-PKcs ein Phosphorylierungsmuster aufwies, das normalerweise nach DNA-Schäden auftritt, traten bei den pTyr-behandelten unbestrahlten Zellen keine zusätzlichen γ H2AX-Foci im Vergleich zur Kontrolle auf.

Ergebnisse

a) HSF4



b) A549

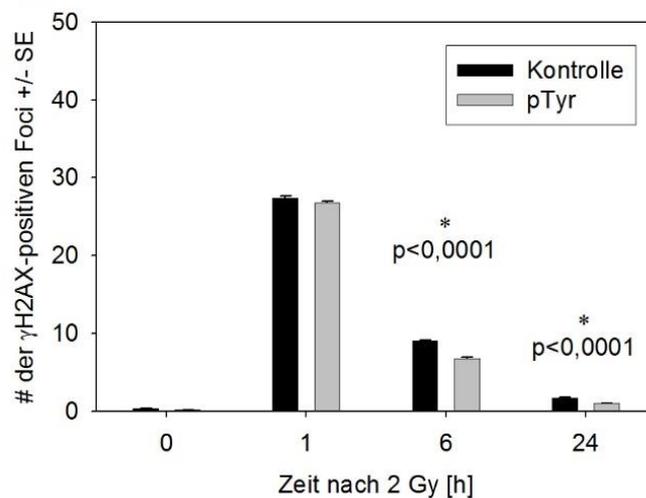


Abbildung 3.10: Einfluss von pTyr auf die Phosphorylierung von γ H2AX nach IR. a) HSF4-Zellen und b) A549-Zellen wurden 16 h mit 10 μ M pTyr inkubiert, mit 2 Gy bestrahlt, nach entsprechender Zeit fixiert und gegen P-H2AX-S139 gefärbt. Der Zeitpunkt 0 zeigt die jeweilige unbestrahlte Kontrolle. Die Datenpunkte zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE). Es wurden jeweils 150 (HSF4) bis 500 (A549) Zellkerne pro Kondition pro Versuch ausgewertet.

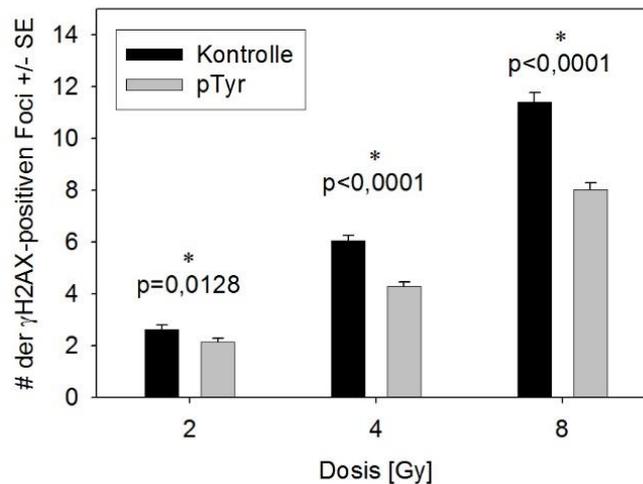
Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Die Anzahl an residuellen γ H2AX-positiven Foci war auch bei höheren Strahlendosen geringer in den pTyr-behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dazu wurden die Zellen wie zuvor behandelt und zusätzlich Bestrahlungen mit 4 und 8 Gy vorgenommen. Es wurde lediglich die Anzahl an Foci nach 24 h, also nach Abschluss der Reparatur überprüft, da diese höheren Dosen zu viele Foci produzieren, um sie nach kürzeren Zeitspannen verlässlich auswerten zu können. Dabei reduzierte die pTyr-Behandlung die

Ergebnisse

Anzahl der residuellen Foci in HSF4 bei einer Dosis von 2 Gy auf ca. 80 %, bei höheren Dosen war sogar eine Reduktion auf 70 % gegenüber der Kontrolle zu beobachten. In A549-Zellen bewirkte pTyr eine Reduktion auf 55 % (2 Gy) bzw. 85 % (4 Gy) und 83 % (8 Gy) (Abb. 3.11).

a) HSF4



b) A549

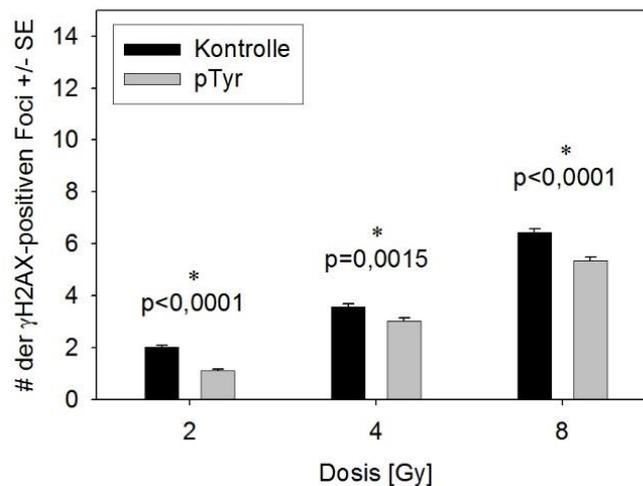


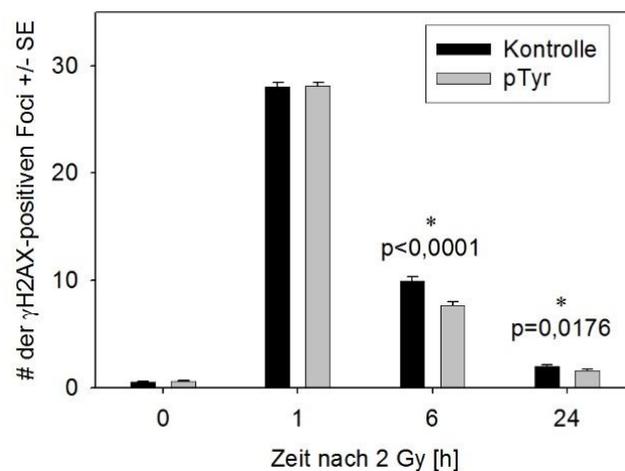
Abbildung 3.11: Einfluss von pTyr auf die Phosphorylierung von γ H2AX nach unterschiedlicher IR-Dosis. a) HSF4-Zellen und b) A549-Zellen wurden 16 h mit 10 μ M pTyr inkubiert, mit 2, 4 oder 8 Gy bestrahlt, nach 24 h fixiert und gegen P-H2AX-S 139 gefärbt. Die Datenpunkte zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE). Es wurden jeweils 150 (HSF4) bis 500 (A549) Zellkerne pro Kondition pro Versuch ausgewertet.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Ergebnisse

Im Gegensatz zu den pTyr-behandelten TP53-wt-Zellen zeigten pTyr-behandelte TP53-mut-Zellen sogar eine erhöhte Anzahl an residuellen γ H2AX-positiven Foci nach Bestrahlung als die unbehandelten Kontrollen. Bei vergleichbarer Induktion von γ H2AX-positiven Foci war die Reparatur beeinträchtigt, wie nach 6 h und 24 h ersichtlich (Abb. 3.12 b). Da die nicht aktivierten A549PON-Zellen (TP53-Wildtyp) den erwarteten protektiven Effekt zeigten, konnte ausgeschlossen werden, dass das TP53-Plasmid an sich einen negativen Einfluss auf die Reparatur hatte (Abb. 3.12 a). Die Aktivierung des TP53-Plasmids mit Ponasteron ohne Bestrahlung führte zu keiner erhöhten Foci-Bildung.

a) A549PON-TP53wt



b) A549PON-TP53mut

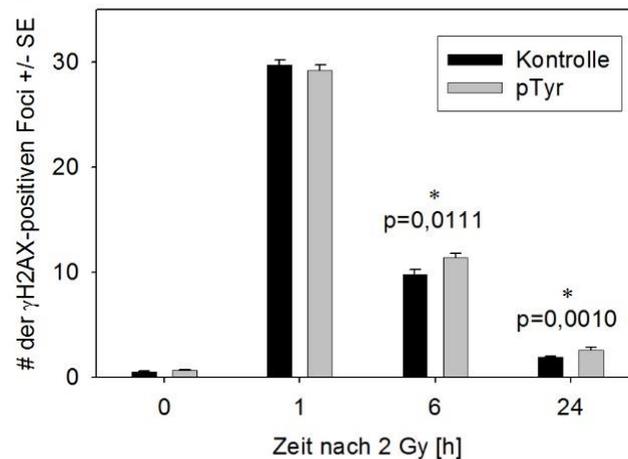


Abbildung 3.12: Einfluss von pTyr auf die Phosphorylierung von γ H2AX nach IR. a) A549PON-TP53wt-Zellen und b) A549PON-TP53mut-Zellen wurden 16 h mit 10 μ M pTyr inkubiert, mit 2 Gy bestrahlt, nach entsprechender Zeit fixiert und gegen P-H2AX-S 139 gefärbt. Der Zeitpunkt 0 zeigt die jeweilige unbestrahlte Kontrolle. Die Datenpunkte zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE). Es wurden jeweils 500 Zellkerne pro Kondition pro Versuch ausgewertet.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Ergebnisse

In den A549PON-TP53wt-Zellen führte eine Vorbehandlung mit pTyr ähnlich wie in normalen A549-Zellen zu einer Reduktion der residuellen Foci auf 62 % (2 Gy), 81 % (4 Gy) bzw. 75 % (8 Gy) (Abb. 3.13 a) gegenüber der Kontrolle. Dahingegen war bei A549PON-TP53mut-Zellen keine Reduktion der Foci gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Die behandelten Zellen wiesen sogar eine leicht erhöhte Anzahl an residuellen Foci auf. Allerdings traten erst bei höheren Strahlendosen (8 Gy) signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf (Abb. 3.13 b).

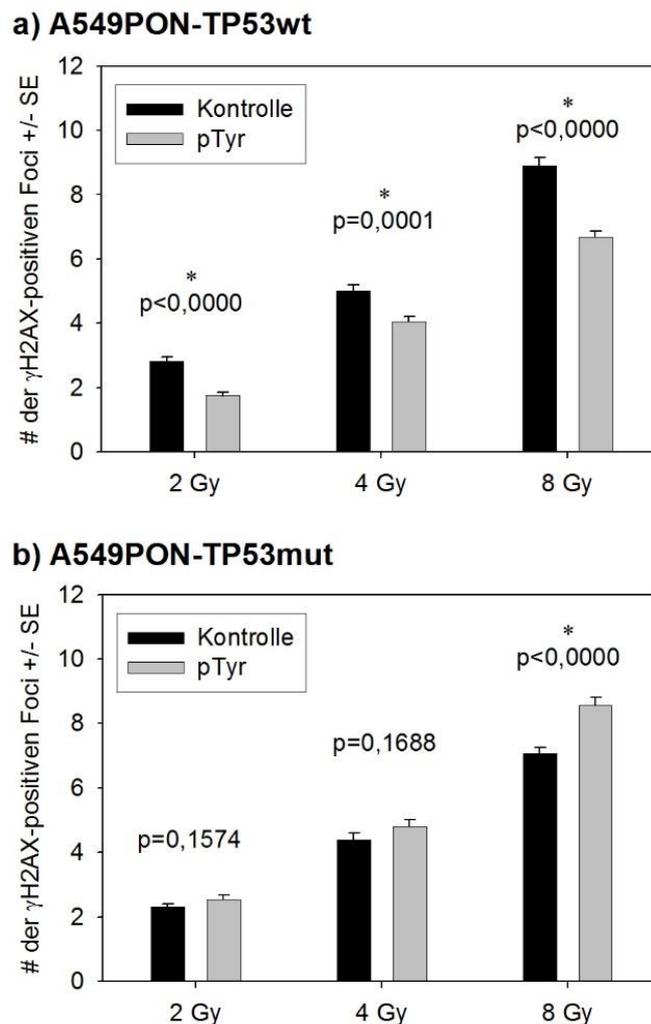


Abbildung 3.13: Einfluss von pTyr auf die Phosphorylierung von γ H2AX nach unterschiedlicher IR-Dosis. a) A549PON-TP53wt-Zellen und b) A549PON-TP53mut-Zellen wurden 16 h mit 10 μ M pTyr inkubiert, mit 2, 4 oder 8 Gy bestrahlt, nach 24 h fixiert und gegen P-H2AX-S 139 gefärbt. Die Datenpunkte zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE). Es wurden 500 Zellkerne pro Kondition pro Versuch ausgewertet.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

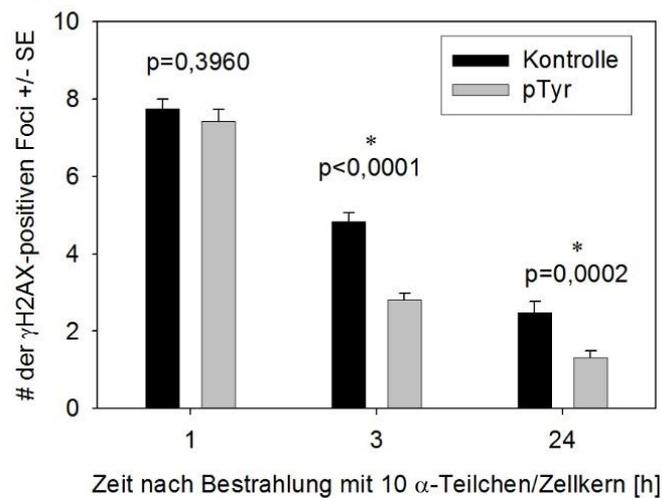
3.3.2 pTyr beschleunigt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und vermindert die Anzahl bleibender Schäden nach α -Teilchen-Strahlung

Während niederenergetische γ -Strahlung vor allem indirekten Schaden in der Zelle bewirkt durch Ionisierungsereignisse, treten durch hochenergetische Strahlung, wie α -Teilchen-Strahlung, vor allem direkte Schäden an der DNA auf, wobei es zu Cluster-Schäden kommt, also einer Vielzahl von Basenschäden und somit auch Doppelstrangbrüchen in einem DNA-Abschnitt. Da diese Schäden viel gravierender und schwerer zu reparieren sind, sollte überprüft werden, ob der radioprotektive Effekt, gemessen anhand der γ H2AX-Foci-Bildung bzw. -Reparatur, auch bei dieser Art von Schaden beobachtet werden kann.

Hierzu wurden HSF4- und A549-Zellen wie zuvor beim Koloniebildungs-Assay auf mit BioFoil beschichtete Träger getropft und es wurde erst nach Adhäsion der Zellen in der Mitte des Trägers das Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden mit Hoechst33342 gefärbt, um die Erkennung der Zellkerne durch die Microbeam-Einrichtung zu ermöglichen. Es wurden gezielt die Zellkerne bestrahlt, wobei 10 α -Teilchen auf jeden Zellkern geschossen wurden. Eine höhere Anzahl an α -Teilchen war nicht möglich, da sonst der Schaden die Reparaturkapazität der Zelle überschritten hätte. Eine geringere Anzahl an α -Teilchen hätte vermutlich nicht genügend Schäden produziert, um bei der Anzahl ausgewerteter Zellkerne statistisch auswertbare Daten zu erlangen. Die Zellen wurden nach entsprechender Zeit fixiert und gegen γ H2AX gefärbt. Wie bereits bei der niederenergetischen γ -Strahlung zeigte pTyr auch hier einen radioprotektiven Effekt, ersichtlich an dem schnelleren Rückgang der γ H2AX-positiven Foci nach 3 h bei gleicher Induktion nach 1 h (Abb. 3.14). Nach 24 h wiesen die pTyr-behandelten Zellen eine signifikant verringerte Anzahl an residuellen Foci auf.

Ergebnisse

a) HSF4



b) A549

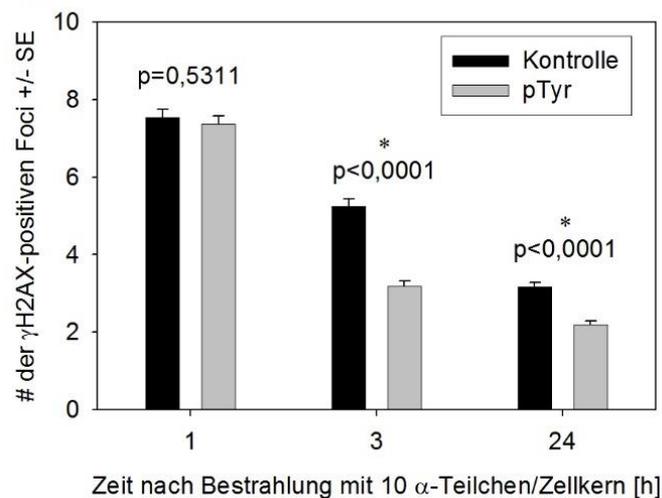


Abbildung 3.14: Einfluss von pTyr auf die Phosphorylierung von γ H2AX nach α -Teilchen-Bestrahlung.

a) HSF4-Zellen und b) A549-Zellen wurden 16 h mit 10 μ M pTyr inkubiert, mit 10 α -Teilchen/ Nukleus bestrahlt, nach entsprechender Zeit fixiert und gegen P-H2AX-S 139 gefärbt. Die Datenpunkte zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (SE). Es wurden jeweils 150 (HSF4) bzw. 500 (A549) Zellkerne pro Kondition pro Versuch ausgewertet.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.3.3 pTyr bewirkt eine Relaxation des Chromatins in Abwesenheit von DNA-Schäden

Wie Paasch (2014) bereits zeigen konnte, bewirkt die Vorbehandlung mit pTyr eine Relaxation des Chromatins, was sich von einer erhöhten Acetylierung von K 9 und einer Phosphorylierung von S 10 des Histons H3 ableiten lässt. Es konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten Zelllinien A549 und HSF4 diesen Effekt ebenfalls zeigten (Abb. 3.15).

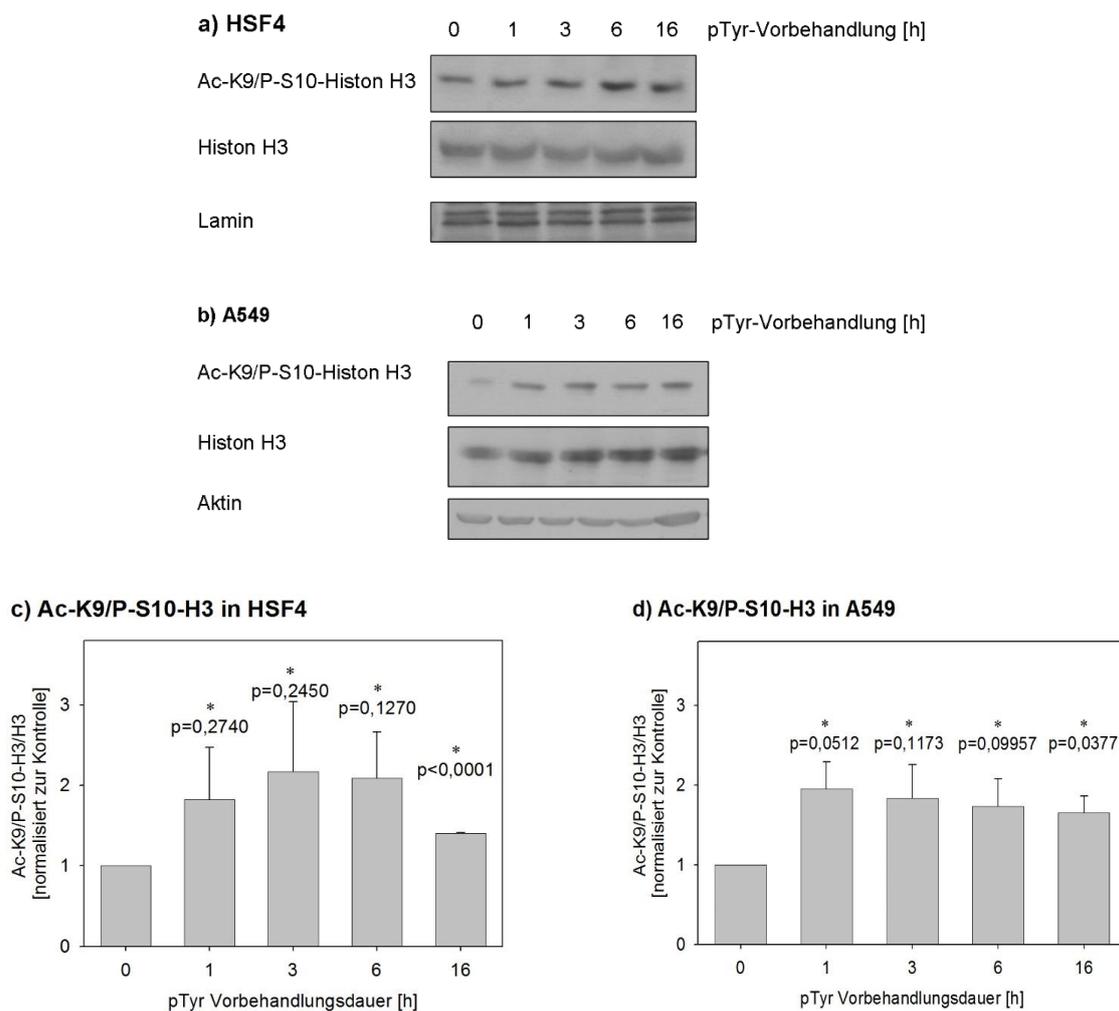


Abb. 3.15: Einfluss von pTyr auf die Acetylierung und Phosphorylierung von Histon H3.

Konfluente Zellen wurden die angegebene Zeit mit 10 μ M pTyr inkubiert und anschließend die Proteine aus dem Gesamtlisat im Western Blot analysiert. a) repräsentativer Western Blot von HSF4-Zellen. b) repräsentativer Western Blot von A549-Zellen. Densitometrische Auswertung erfolgte zusammengefasst aus drei Versuchen. c) Verhältnis von Ac-K 9/P-S 10-H3 zu Histon H3 in HSF4, d) Verhältnis von Ac-K 9/P-S 10-H3 zu Histon H3 in A549. Die Daten sind jeweils normiert zur Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Diese Chromatinöffnung wird auch durch DNA-Schäden beziehungsweise im Laufe des Zellwachstums bei der Transkription induziert. Sie ist ein wichtiger Schritt, um die DNA-Reparatur oder -Replikation zu ermöglichen (Nowak und Corces 2004). Dabei wird sowohl die Acetylierung an K 9 als auch die Phosphorylierung an S 10 durch TP53 beeinflusst (Allison und Milner 2003). Wie gezeigt werden konnte, bewirkt pTyr diese Öffnung des Chromatins bereits ohne Auftreten eines Schadens.

3.4 pTyr erhöht die Energie, die Zellen vor Bestrahlung zur Verfügung steht

Die Vorgänge, die zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nötig sind, wie etwa die Umstrukturierungen des Chromatins und die Rekrutierung von Reparaturproteinen, benötigen Energie, welche gewöhnlich nach Eintreten des Schadens mobilisiert wird. Wie Paasch (2014) jedoch bereits zeigen konnte, führt eine Vorbehandlung mit pTyr zu einem Anstieg des zellulären ATP-Gehalts noch bevor ein DNA-Schaden eingetreten ist. Um im Weiteren den Ursprung dieser zusätzlichen Energie zu untersuchen, wurde dieser Effekt in den in der Arbeit verwendeten Zelllinien überprüft.

3.4.1 pTyr-Vorbehandlung führt zu erhöhtem ATP-Gehalt

Konfluente Zellen wurden mit 10 μ M pTyr behandelt und der ATP-Gehalt nach entsprechender Inkubationszeit mithilfe des ATP-Assay-Kits (Abnova) colorimetrisch bestimmt.

Die Behandlung mit pTyr steigerte den zellulären ATP-Gehalt in TP53-Wilddtyp-Zellen, nicht jedoch in Zellen mit mutiertem TP53-Protein. Sowohl in HSF4-, als auch in A549-Zellen bewirkte eine Vorbehandlung mit 10 μ M pTyr bereits nach einer Stunde einen signifikanten Anstieg des zellulären ATP-Gehalts. In beiden Zelllinien reduzierte sich der ATP-Gehalt nach 16 h pTyr-Behandlung wieder leicht, lag jedoch immer noch deutlich höher als in den Kontrollzellen (Abb. 3.16 a, b).

FaDu-Zellen, die im klonogenen Überleben nicht auf eine pTyr-Behandlung reagierten, zeigten auch keine Zunahme an ATP, jedoch lag der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen bereits über dem von A549- bzw. HSF4-Zellen (Abb. 3.16 c). A549PON-TP53wt-Zellen zeigten wie FaDu-Zellen keine signifikante Zunahme an ATP, besaßen allerdings ebenfalls einen basal höheren Gehalt an ATP als gewöhnliche A549-Zellen.

Ergebnisse

A549PON-TP53mut-Zellen wiesen 16 Stunden nach Zugabe von pTyr sogar einen signifikant verminderten ATP-Gehalt ($p = 0,0280$) im Vergleich zu den A549PON-Wildtypzellen auf (Abb. 3.16 d).

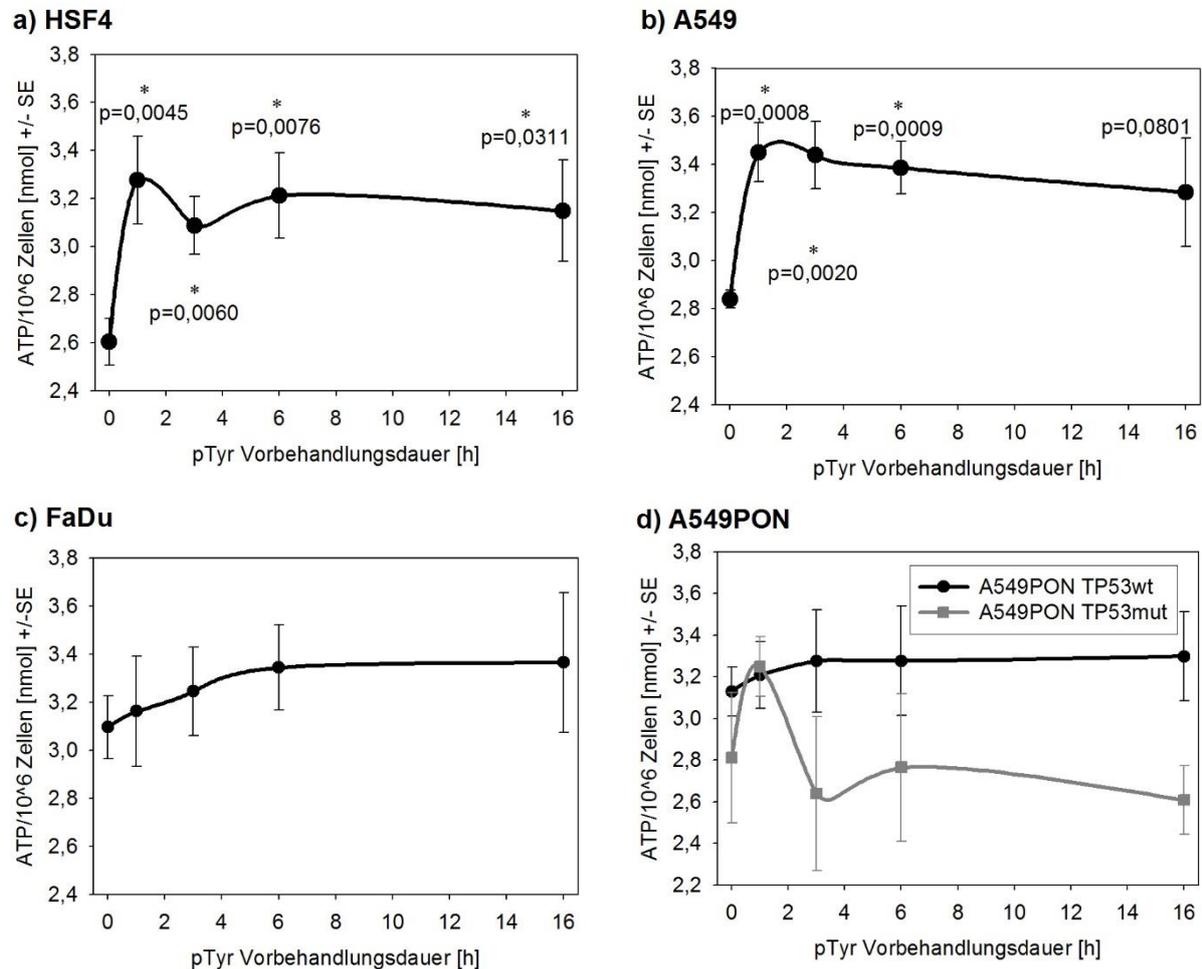


Abbildung 3.16: Einfluss von pTyr auf den zellulären ATP-Gehalt. Konfluente Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 10 μ M pTyr behandelt und der ATP-Gehalt mithilfe des ATP-Assay-Kits von Abnova nach Hersteller-Protokoll bestimmt. Die Daten zeigen den ATP-Gehalt pro Millionen Zellen von a) HSF4-, b) A549-, c) FaDu- und d) A549PON-Zellen \pm Standardfehler (SE). Es wurden jeweils drei Versuche mit zwei Parallelansätzen zusammengefasst.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.4.2 Der ATP-Gehalt verhält sich nach Bestrahlung wie in den Kontrollzellen

Für gewöhnlich führt Strahlung zu einer ATP-Krise in der Zelle, bedingt durch den erhöhten Energiebedarf für die Reparatur entstandener Schäden und durch verminderte Leistung der durch Strahlung beschädigten Mitochondrien. Erst nach 24 - 48 h nach Bestrahlung erreicht die ATP-Produktion wieder ihren Ausgangswert vor Bestrahlung (Hall *et al.* 1963).

Ergebnisse

Da der ATP-Gehalt in den pTyr-behandelten Zellen bereits leicht über dem der Kontrolle lag, sollte im Weiteren untersucht werden, ob die Behandlung einen Einfluss auf die Energie hat, die der Zelle nach Bestrahlung zur Reparatur entstandener Schäden zur Verfügung steht.

Dazu wurden konfluente Zellen 16 h mit 10 μ M pTyr behandelt, mit 4 Gy bestrahlt und der ATP-Gehalt wie zuvor bestimmt. In den TP53-Wildtyp-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Abb. 3.17 a + b). In FaDu-Zellen, die ein mutiertes TP53-Protein besitzen, lag der ATP-Gehalt in den Kontrollzellen nach Bestrahlung zeitweise sogar über dem der pTyr-behandelten Zellen (Abb. 3.17 c).

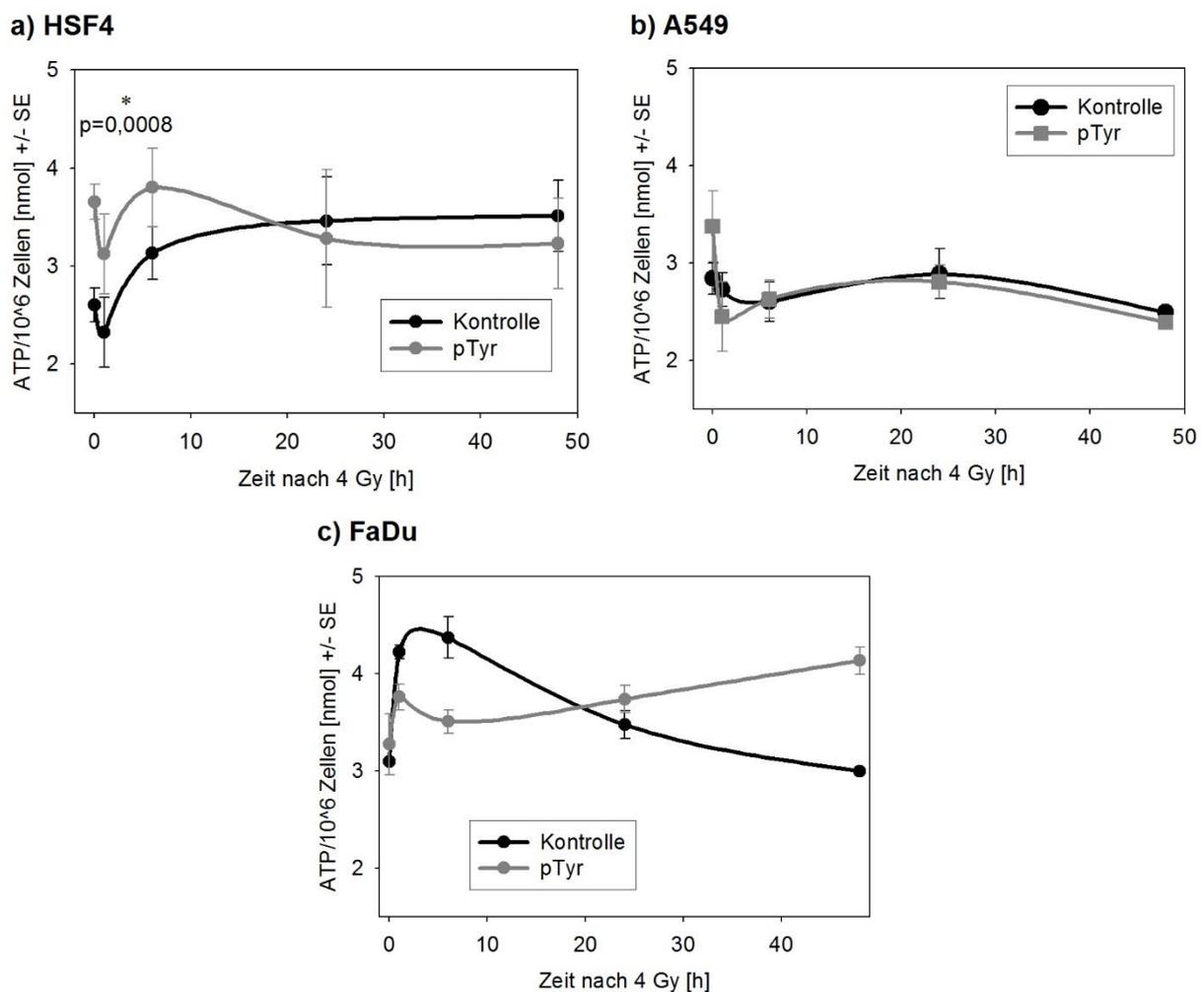


Abbildung 3.17: Einfluss von pTyr auf den zellulären ATP-Gehalt. Konfluente Zellen wurden für 16 h mit 10 μ M pTyr behandelt, mit 4 Gy bestrahlt und der ATP-Gehalt mithilfe des ATP-Assay-Kits von Abnova nach Hersteller-Protokoll bestimmt. Die Daten zeigen den ATP-Gehalt pro Millionen Zellen von a) HSF4-, b) A549- und c) FaDu-Zellen \pm Standardfehler (SE). Es wurden je drei Versuche mit zwei Parallelansätzen zusammengefasst.

Das Sternchen(*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.5 Die mitochondriale Atmung wird durch pTyr nicht verstärkt

Die Zelle nimmt ihre benötigte Energie in Form von Glukose auf. Diese wird im Cytosol in mehreren Schritten zu zwei Pyruvat-Molekülen aufgespalten. Dieses Pyruvat kann entweder über anaerobe Atmung, also Fermentation, oder über aerobe Atmung, also die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien weiter in ATP umgewandelt werden. Während Tumorzellen auch bei optimalen Sauerstoffbedingungen eher Glykolyse betreiben, erfolgt die ATP-Gewinnung in Normalgewebszellen für gewöhnlich über OXPHOS in den Mitochondrien. In diesem Prozess dient Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Dabei entstehen als Zwischenprodukt auch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) durch unvollständige Reduktion, die potenziell schädlich sind für die Zelle. Jedoch liefert diese Art der Energiegewinnung auch eine maximale Menge an ATP pro verstoffwechselter Glukose und ist somit energetisch günstiger und schneller.

3.5.1 pTyr-Vorbehandlung hat keinen Einfluss auf die Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies

Die Tatsache, dass eine erhöhte ATP-Produktion durch vermehrte mitochondriale Atmung zur gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt, ermöglicht einen Nachweis der OXPHOS-Aktivität. Um zu überprüfen, ob der ATP-Anstieg, der nach pTyr-Behandlung festgestellt wurde, durch Steigerung der mitochondrialen Atmung zustande kommt, wurde daher die relative Menge an mitochondrialen ROS mittels Fluoreszenzanalyse im Durchflusszytometer bestimmt.

Die konfluenten Zellen wurden nach 0, 1, 3, 6 und 16 h pTyr-Behandlung mit dem Lebendzellfarbstoff MitoSOX™ Red gefärbt, trypsiniert, fixiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die Vorbehandlung mit pTyr führt weder in HSF4- noch in A549-Zellen zu einer gesteigerten mitochondrialen ROS-Produktion (Abb. 3.18). In A549-Zellen war sogar eine leichte Reduktion gegenüber der Kontrolle zu sehen.

Ergebnisse

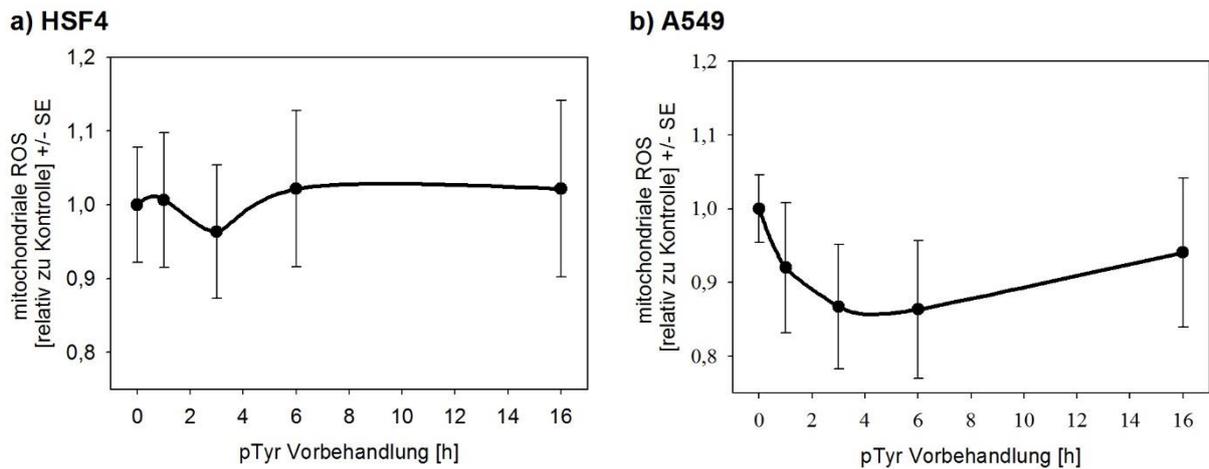


Abbildung 3.18: Einfluss von pTyr auf die mitochondriale ROS-Konzentration in HSF4 und A549. Konfluente a) HSF4 und b) A549-Zellen wurden entsprechende Zeit mit 10 μ M pTyr behandelt, mit MitoSOXTM Red gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Datenpunkte zeigen die relative Fluoreszenz aus drei unabhängigen Experimenten (mit je zwei Parallelansätzen) \pm Standardfehler (SE) und sind zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle normiert.

A549PON-Zellen wiesen nach pTyr-Behandlung zunächst einen kurzfristigen geringen Anstieg der mitochondrialen ROS-Bildung auf. Jedoch zeigte sich auch hier bereits nach zwei Stunden ebenfalls eine Reduktion. Nach 16 Stunden wurde ein leicht erhöhter ROS-Wert gemessen. Hierbei war kein nennenswerter Unterschied zwischen den A549PON-Zellen mit Wildtyp oder mutiertem TP53 zu erkennen (Abb. 3.19).

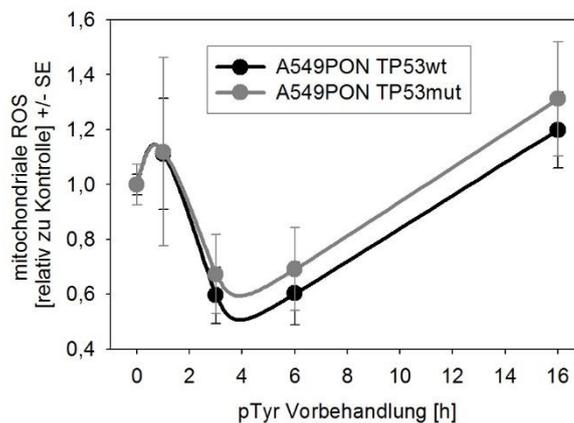


Abbildung 3.19: Einfluss von pTyr auf die mitochondriale ROS-Konzentration in A549PON TP53wt/ mut. Konfluente A549PON-Zellen wurden mit Ponasteron (TP53mut) bzw. Lösungsmittel (TP53wt) behandelt, entsprechende Zeit mit 10 μ M pTyr inkubiert, mit MitoSOXTM Red gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Datenpunkte zeigen die relative Fluoreszenz aus drei unabhängigen Experimenten (mit je zwei Parallelansätzen) \pm Standardfehler (SE) und sind zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle normiert.

3.5.2 pTyr hat keinen Einfluss auf die Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies nach Bestrahlung

Auch wenn die pTyr-Vorbehandlung alleine keinen Einfluss auf die Bildung mitochondrialer ROS hatte, wurde überprüft, ob zusammen mit Bestrahlung ein Effekt ersichtlich wäre, da Bestrahlung die Menge an mitochondrialen ROS erhöht.

Obwohl in HSF4-Zellen keinerlei Unterschied zwischen pTyr-behandelten Zellen und Kontroll-Zellen festzustellen war und beide nach kurzfristiger Verringerung der ROS den erwarteten Anstieg als Reaktion auf Strahlung zeigten (Abb. 3.20 a), wiesen pTyr-behandelte A549-Zellen im Vergleich zur unbehandelten bestrahlten Kontrolle ein leicht vermindertes Niveau auf. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Auch in den A549-Zellen führte die Bestrahlung zu einem Anstieg der mitochondrialen ROS (Abb. 3.20 b).

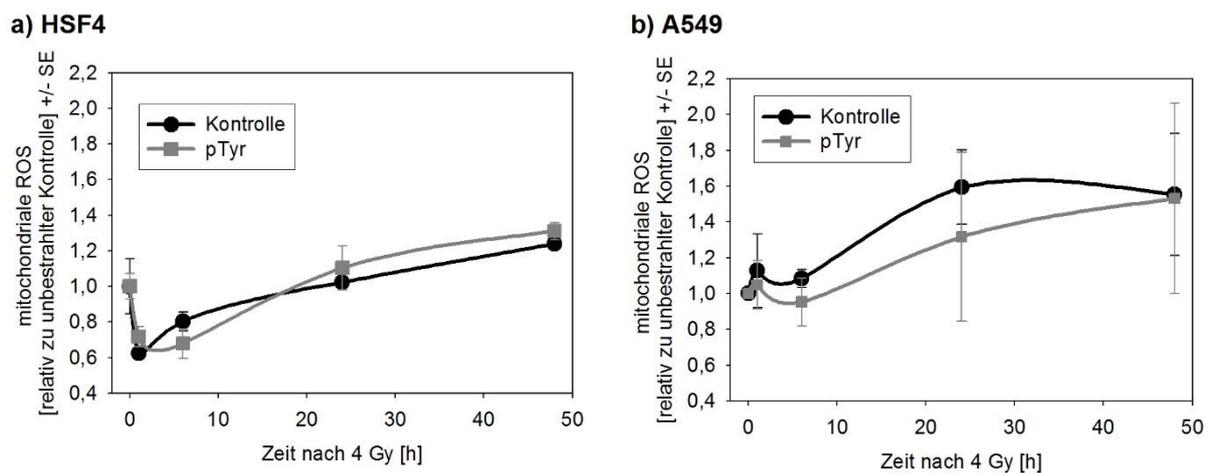


Abbildung 3.20: Mitochondriale ROS-Konzentration in HSF4 und A549 nach pTyr und IR. Konfluente a) HSF4 und b) A549-Zellen wurden 16 h mit 10 μ M pTyr behandelt, mit 4 Gy bestrahlt und für einen Zeitraum bis zu 48 h nach Bestrahlung inkubiert. Mitochondriale ROS wurden nach MitoSOX™ Red-Färbung im Durchflusszytometer gemessen. Die Datenpunkte zeigen die relative Fluoreszenz aus drei unabhängigen Experimenten (mit je zwei Parallelansätzen) \pm Standardfehler (SE) und sind zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle normiert.

Die A549PON-TP53wt-Zellen zeigten nach Bestrahlung zunächst eine Verringerung der mitochondrialen ROS. Der Wert erreichte 24 Stunden nach Bestrahlung wieder etwa das anfängliche Niveau, wobei auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen pTyr-behandelten Zellen und der Kontrolle zu beobachten war. Die pTyr-behandelten Zellen wiesen tendenziell geringere ROS-Werte als die Kontrolle auf. Im Gegensatz dazu reduziert

sich der ROS-Level in pTyr-behandelten A549PON-TP53mut-Zellen nur leicht und bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum auf etwa dem gleichen Niveau. Die A549PON-TP53mut-Kontrollzellen zeigen einen stärkeren Anstieg als die A549PON-TP53wt-Kontrollzellen. Die mitochondrialen ROS sind in diesen Zellen selbst 48 Stunden nach Bestrahlung noch auf einem erhöhten Niveau (Abb. 3.21).

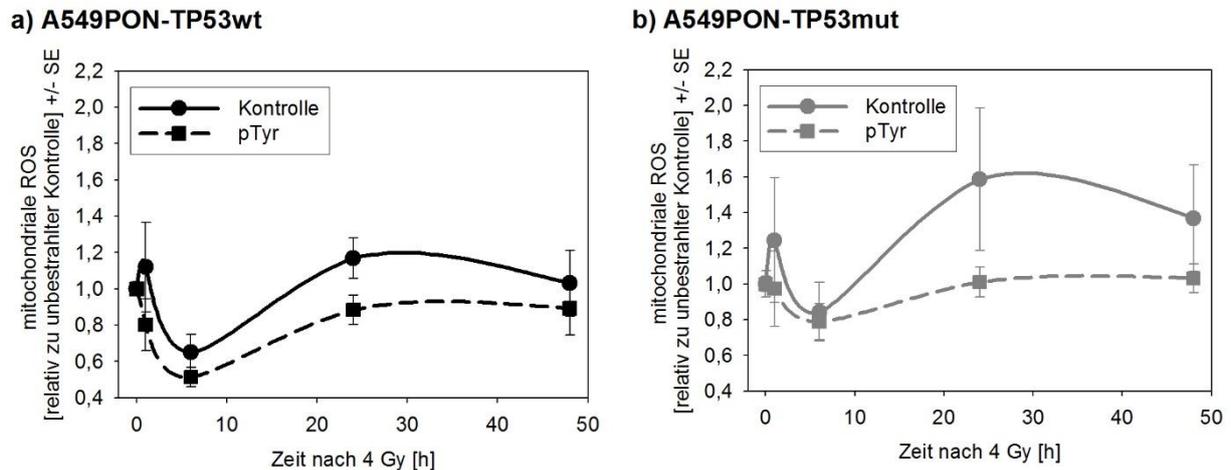


Abbildung 3.21: Einfluss von pTyr auf mitochondrialen ROS nach IR in Abhängigkeit vom TP53-Status.

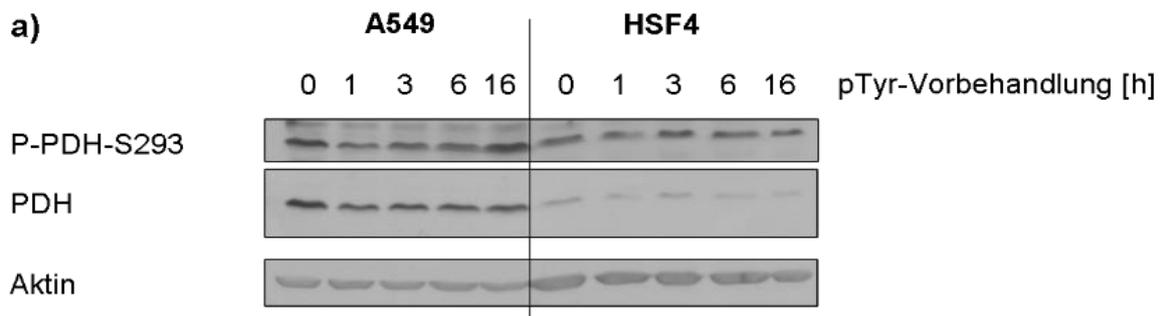
Konfluente a) A549PON-TP53-Wildtyp-Zellen und b) A549PON-TP53-mutierte Zellen wurden 16 h mit pTyr behandelt, mit 4 Gy bestrahlt und für einen Zeitraum bis zu 48 h nach Bestrahlung inkubiert. Mitochondriale ROS wurden nach MitoSOX™ Red-Färbung im Durchflusszytometer gemessen. Die Datenpunkte zeigen die relative Fluoreszenz aus drei unabhängigen Experimenten (mit je zwei Parallelansätzen) \pm Standardfehler (SE) und sind zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle normiert.

3.5.3 pTyr induziert eine Inhibition der Pyruvat-Dehydrogenase und reduziert somit die mitochondriale Atmung

Da eine pTyr-Vorbehandlung nicht zu einem Anstieg an mitochondrialen ROS führte, und nach Bestrahlung eher eine verringerte Menge an mitochondrialen ROS gegenüber der Kontrolle zur Folge hatte, wurde angenommen, dass der zuvor beobachtete Anstieg an ATP nicht durch verstärkte mitochondriale Atmung zustande kommt. Um diese Vermutung zu bekräftigen, wurde ein Schlüsselenzym der mitochondrialen Atmung, die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) untersucht. PDH steuert den Pyruvat-Metabolismus. Ist PDH phosphoryliert, kann Pyruvat nicht mehr in die mitochondriale Atmungskette aufgenommen werden, sondern wird durch Glykolyse verstoffwechselt.

Ergebnisse

Es wurde im Western Blot untersucht, welchen Einfluss eine pTyr-Vorbehandlung auf den Phosphorylierungsstatus der PDH hat. Dabei zeigte sich sowohl bei A549 als auch bei HSF4, dass die Vorbehandlung zu einer verstärkten Phosphorylierung und somit Inhibierung der PDH führte (Abb. 3.22). Diese erreichte in A549 nach 6 h pTyr-Behandlung einen signifikant erhöhten Level ($p_6 = 0,0022$, $p_{16} = 0,0499$), in HSF4-Zellen wurde erst nach 16 h eine signifikante Steigerung erreicht ($p_{16} = 0,0071$).



b) P-PDH-S293

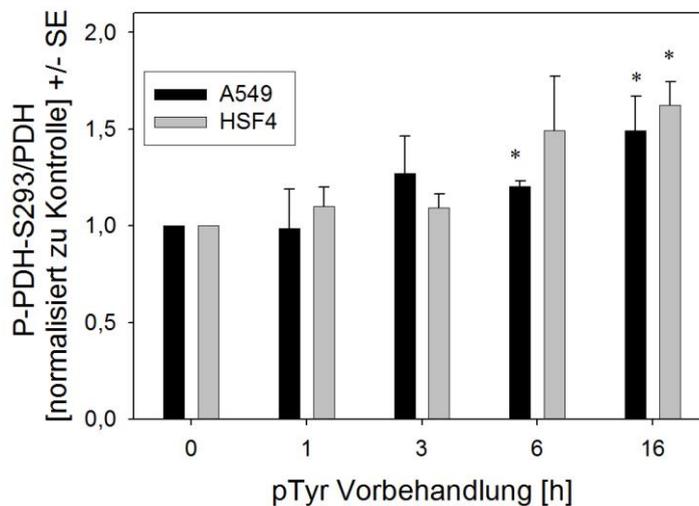


Abbildung 3.22: Einfluss einer pTyr-Behandlung auf die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH).

a) Konfluente A549- und HSF4-Zellen wurden mit 10 μ M pTyr für unterschiedliche Zeit behandelt und die Proteine des Gesamtlysats im Western Blot analysiert. b) Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen. Die Datenpunkte zeigen die Relation von P-PDH-S293 zu PDH-Gesamtprotein \pm Standardfehler (SE) und wurden zur unbehandelten Kontrolle normiert.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Die Inhibition der PDH bekräftigt die Vermutung, dass das zusätzliche ATP nicht aus einer gesteigerten mitochondrialen Atmung stammt. Da Paasch (2014) bereits zeigen konnte, dass eine pTyr-Behandlung eine Reduktion der Mitochondrienzahl pro Zelle innerhalb der ersten 6 Stunden zur Folge hat, was auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der ROS in diesem Zeitraum erklären könnte, wurde im weiteren Verlauf überprüft, ob die Reduktion der Mitochondrien mit einer Energiegewinnung einhergeht, in dem Sinne, dass Mitochondrien durch Mitophagie abgebaut werden und somit zur Energiegewinnung beitragen.

3.6 Der ATP-Gewinn durch pTyr basiert zu Teilen auf Abbau beschädigter Mitochondrien durch Mitophagie

Da Paasch (2014) zeigen konnte, dass eine pTyr-Behandlung bereits nach kurzer Zeit einen Anstieg der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), einen Rückgang der Mitochondrienzahl und ein Absinken des mitochondrialen Membranpotenzial bewirkt, wurde die Mitophagie als mögliche ATP-Quelle genauer untersucht. Bei der Mitophagie, einer selektiven Form der Makroautophagie, werden defekte Mitochondrien gezielt abgebaut. Dabei aktiviert phosphoryliertes AMPK die unc-51-like-kinase 1 (ULK 1), welche wiederum das autophagy-related-protein 13 (Atg 13) phosphoryliert und aktiviert. Es gibt auch Hinweise, dass ULK1 und Atg 13 über den mTor-Signalweg als Reaktion auf Nährstoffmangel aktiviert werden und somit ermöglichen, dass ein kurzzeitiger Engpass in der Energieversorgung durch Recycling alter bzw. defekter Mitochondrien überbrückt werden kann. Dabei bildet ULK 1 einen Komplex mit ATG 13 und FIP 200, welcher als Initiator der Autophagie fungiert (Ganley *et al.* 2009).

3.6.1 pTyr-Behandlung führt zu Umwandlung von LC3-I zu LC3-II

Das Protein LC3 ist ein Marker für Autophagie. Durch den Autophagieprozess wird es von der Cytosolischen Form LC3-I zu LC3-II gespalten, welches membrangebunden vorliegt. Das Verhältnis dieser beiden Formen gibt Aufschluss über das Ausmaß an Autophagie, die in der Zelle stattfindet (Kabeya *et al.* 2000, Tanida *et al.* 2005). Da im Fall von pTyr-Behandlung kein erhöhtes Zellsterben ersichtlich war, konnte angenommen werden, dass ein Anstieg von LC3-II/LC3-I ein Indiz für Mitophagie war.

Ergebnisse

HSF4- und A549-Zellen wurden wie gewohnt mit 10 μM pTyr vorbehandelt und nach 1, 3, 6 und 16 h Proteine isoliert und für Western Blot-Analyse präpariert. Wie in Abbildung 3.23 ersichtlich, bewirkt die pTyr-Inkubation einen Anstieg an LC3-II im Verhältnis zu LC3-I. Dieser Anstieg ist bei Fibroblasten allerdings nur gering ausgeprägt, mit einem Maximum nach 6 h (Abb. 3.23 a). A549-Zellen zeigen eine deutlichere Zunahme, die bereits nach 3 h ihr Maximum erreicht (Abb. 3.23 b).

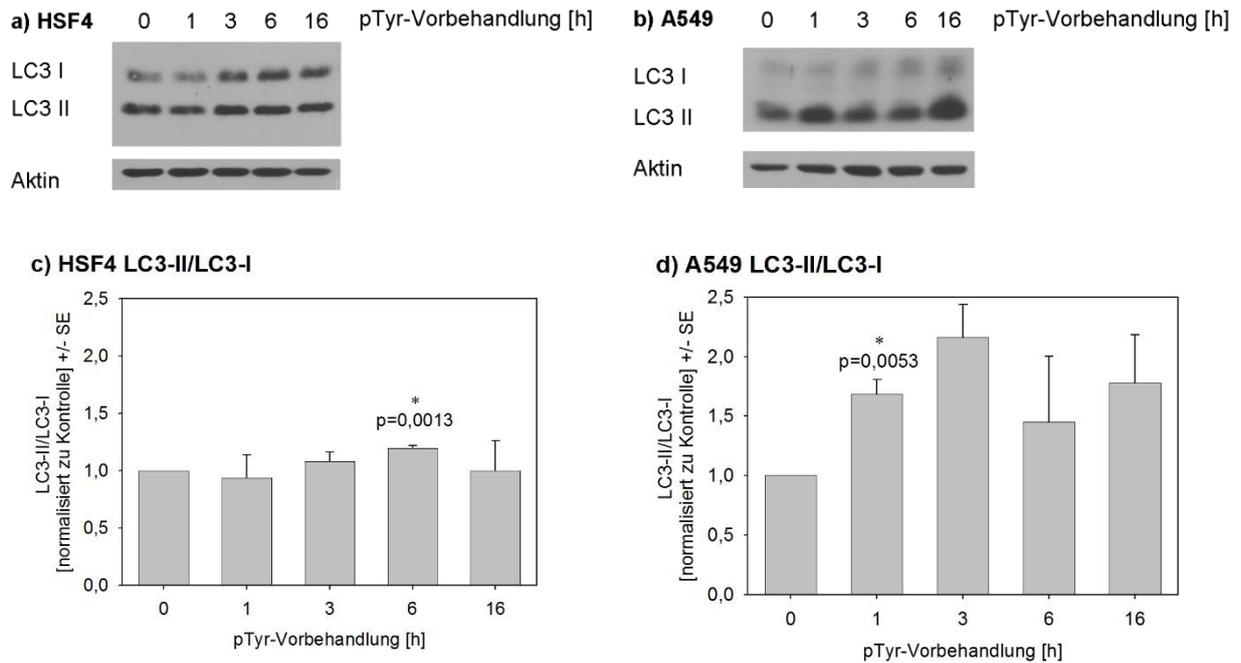


Abbildung 3.23: Einfluss einer pTyr-Behandlung auf die Umwandlung von LC3-I zu LC3-II. Konfluente a) A549- und b) HSF4-Zellen wurden mit 10 μM pTyr für unterschiedliche Zeit behandelt und die Proteine des Gesamtlysats im Western Blot analysiert. c) + d) Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen. Die Datenpunkte zeigen die Relation von LC3-II zu LC3-I \pm Standardfehler (SE) und wurden zur unbehandelten Kontrolle normiert.

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.6.2 pTyr-Vorbehandlung reduziert die Cytochrom C-Konzentration

Da LC3 ein Marker für Autophagie ist, wurde im Folgenden die Cytochrom C-Konzentration in den Zellen gemessen. Bei der Mitophagie werden defekte Mitochondrien komplett in Autophagosomen aufgenommen bevor Cytochrom C freigesetzt werden kann. Dies wird gesteuert durch eine Modulation der Serinreste 17 und 24 in der mit LC3 interagierenden Region von Bnip3, welches sowohl ein proapoptisches BH3-only-Protein als auch ein

Autophagierezeptor der Zelle darstellt (Zhu *et al.* 2013). Somit wird eine Abgabe des Cytochrom C ins Cytoplasma, und eine damit verbundene Apoptose der Zelle verhindert. Es wurden konfluente HSF4- und A549-Zellen für die angegebene Zeit mit 10 μM pTyr behandelt, permeabilisiert, fixiert, und mit spezifischem Antikörper gegen Cytochrom C und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen 4 h vor pTyr-Behandlung mit 10 μM Chloroquin (CQ), einem Autophagie-Inhibitor, behandelt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer.

Die Behandlung mit pTyr bewirkte sowohl in HSF4-, als auch in A549-Zellen eine Reduktion der Intensität des Fluoreszenzsignals. Diese war vor allem in den ersten 6 h (HSF4, Abb. 3.24 a) bzw. 3 h (A549, Abb. 3.24 b) nach pTyr zu beobachten. Nach 16 h Behandlung war der Cytochrom C-Level in beiden Zelllinien wieder auf Ausgangsniveau. Bei einer vorangegangenen Inhibierung der Autophagie durch CQ war keine Reduktion zu sehen. Der Cytochrom C-Gehalt stieg in A549-Zellen sogar leicht an.

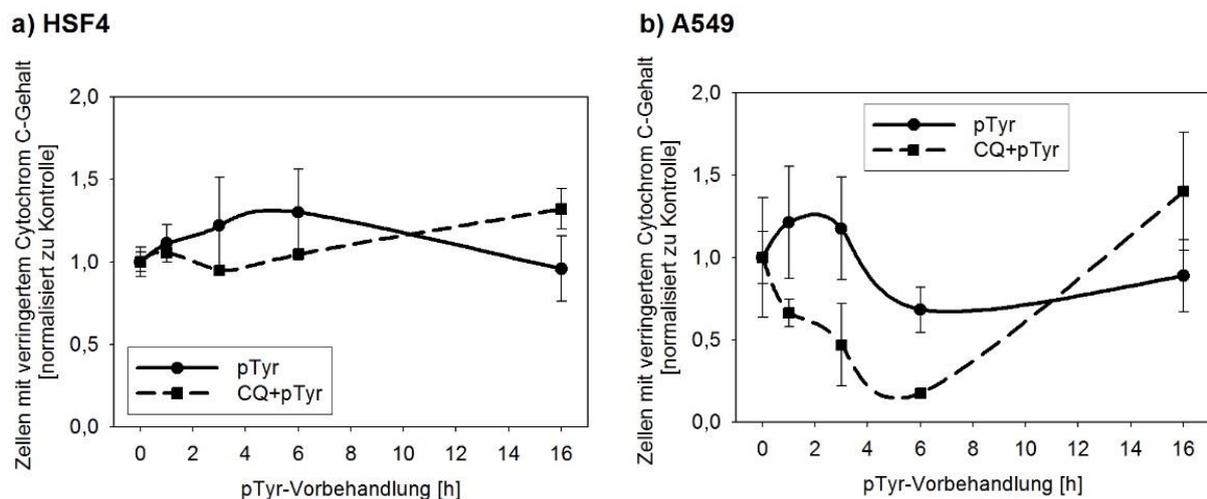


Abbildung 3.24: Cytochrom C-Gehalt der Mitochondrien nach pTyr-Behandlung. Konfluente a) HSF4-Zellen und b) A549-Zellen wurden 4 h vor pTyr mit Chloroquin (CQ) bzw. Lösungsmittel behandelt und danach für die angegebene Zeit mit 10 μM pTyr. Es wurde gegen Cytochrom C und anschließend mit Alexa488-Sekundärantikörper gefärbt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Die Daten sind aus drei unabhängigen Experimenten mit je zwei Parallelansätzen zusammengefasst und zeigen den prozentualen Anteil von Zellen mit niedriger Fluoreszenz \pm Standardfehler (SE).

3.6.3 Die Inhibierung der Autophagie reduziert den protektiven pTyr-Effekt

Da unter pTyr sowohl ein Anstieg von LC3-II/LC3-I zu beobachten war, als auch eine Reduktion des mitochondrialen Cytochrom C-Gehalts, sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Inhibierung der Autophagie auf die pTyr-vermittelte Radioresistenz hat. Konfluente A549-Zellen wurden 4 h vor pTyr mit Chloroquin (CQ) oder Lösungsmittel behandelt und anschließend für 16 h mit pTyr. Die Aussaat zum Koloniebildungsassay erfolgte 6 h nach Bestrahlung mit 0, 1, 2 oder 4 Gy.

Eine alleinige Behandlung mit CQ bewirkte keine Radiosensibilisierung. Die Kombination von CQ mit pTyr reduzierte das Überleben auf den Level der unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 3.25).

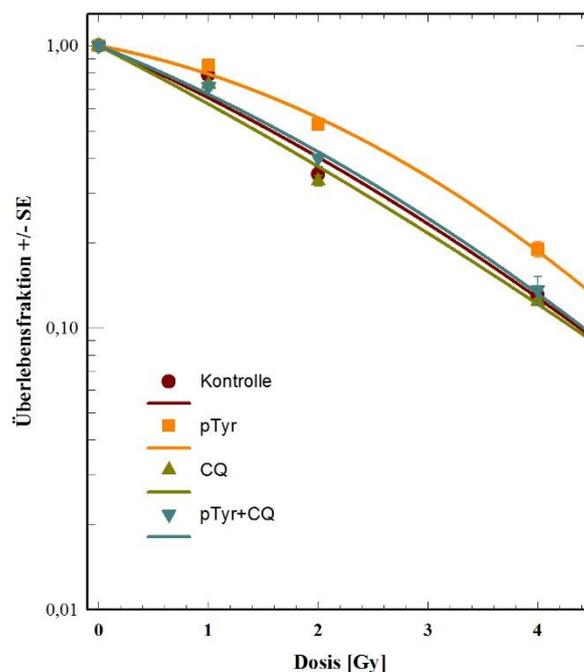


Abbildung 3.25: Einfluss der Inhibierung der Autophagie auf das klonogene Überleben nach pTyr.

Konfluente A549-Zellen wurden 4 h vor pTyr mit Chloroquin (CQ) oder Lösungsmittel behandelt. Es folgte eine 16-stündige Behandlung mit 10 μ M pTyr und Bestrahlung mit 0, 1, 2 oder 4 Gy. Die Aussaat erfolgte 6 h nach Bestrahlung (je 4 Replikate). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Datenpunkte zeigen die Überlebensfraktion auf Basis der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle \pm Standardfehler (SE).

3.7 pTyr-Vorbehandlung resultiert in verstärkter Glykolyse

Entgegen der Erwartung bewirkte eine pTyr-Inkubation keine verstärkte, sondern sogar eine eher reduzierte mitochondriale Atmung. Auch Mitophagie kann aus zuvor genannten Gründen nicht allein für den beobachteten Anstieg an ATP verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit der Zelle, das aus aufgenommener Glukose gewonnene Pyruvat zu verarbeiten, bietet die Glykolyse, wobei damit im Folgenden nicht nur die Aufspaltung von Glukose zu Pyruvat, sondern generell die anaerobe Fermentation von Pyruvat zu Laktat gemeint ist.

3.7.1 pTyr-Vorbehandlung führt zu verstärkter Laktatproduktion

Laktat ist ein Produkt der Glykolyse und kann als Marker für deren Aktivität herangezogen werden. Es wurde der Laktatwert in Medium und Zellysate von TP53-wt-Zellen ermittelt, mit oder ohne pTyr-Vorbehandlung.

Während die Behandlung mit 10 μ M pTyr in Zellysaten von HSF4-Zellen nach 16 h zu einem erhöhten Laktatwert führt (Abb. 3.26 a), ist in Zellysaten von A549-Zellen kein Anstieg zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann bei A549-Zellen eine Erhöhung der Laktat-Konzentration im Medium festgestellt werden (Abb. 3.26 b), wohingegen HSF4-Zellen keine Veränderung zeigen (Daten nicht gezeigt). Dabei weisen A549-Zellen vor pTyr-Behandlung eine Laktat-Konzentration von 20 mM im Medium, nach 16 h pTyr 32 mM im Medium auf, was einer Konzentration von ca. 26 μ mol (Kontrolle) bzw. 42 μ mol (pTyr-behandelte Zellen) Laktat pro Millionen Zellen entspricht. In HSF4-Zellen jedoch bleibt die Laktat-Konzentration im Medium nach pTyr-Behandlung relativ konstant bei 10 mM, wie in den Kontrollzellen. Dahingegen lag der zelluläre Gehalt an Laktat in HSF4-Zellen mit ca. 40 nmol (Kontrolle) bis 70 nmol (pTyr) pro Millionen Zellen über dem Wert von A549 mit relativ konstant 35 nmol pro Millionen Zellen, was sich jedoch eventuell durch die Größenunterschiede dieser beiden Zelllinien erklären ließe.

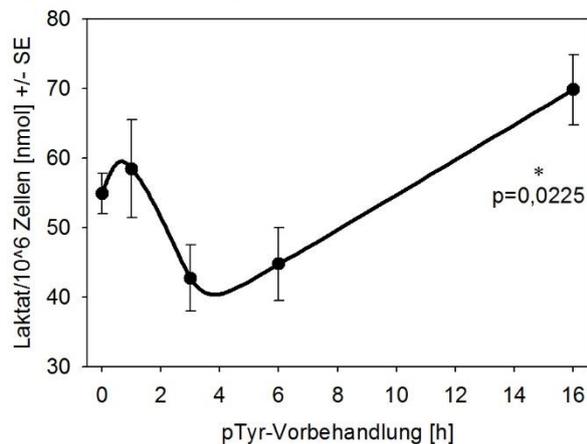
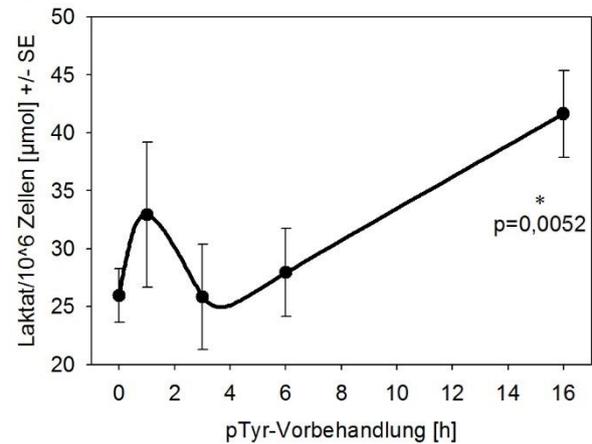
a) Laktat im Zelllysat von HSF4**b) Laktat im Medium von A549**

Abbildung 3.26: Laktat-Konzentration nach pTyr-Behandlung. Konfluente a) HSF4 und b) A549-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 10 µM pTyr behandelt und die Laktat-Konzentration in Zelllysat (HSF4) bzw. Medium (A549) nach Protokoll bestimmt. Die Daten sind zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten mit je zwei Parallelansätzen. Die Datenpunkte zeigen die absolute Laktatmenge pro Millionen Zellen ± Standardfehler (SE).

Das Sternchen (*) markiert statistisch signifikante Unterschiede der pTyr-behandelten Zellen zu den Kontrollzellen (student-t-test, p-Wert < Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Die beobachteten Unterschiede lassen sich dahingehend erklären, dass A549-Zellen grundsätzlich eine höhere Glykolyseaktivität besitzen als Fibroblasten. Während HSF4-Zellen noch über genügend Laktat-Speicherkapazität verfügen, und daher das produzierte Laktat nicht ans Medium abgeben, sind die Laktatspeicher in A549-Zellen eventuell bereits ausgereizt, weswegen bei steigender Glykolyse das produzierte Laktat ans Medium abgegeben wird.

3.7.2 pTyr-Vorbehandlung führt zu verringerter Laktatproduktion nach Bestrahlung

Nach Bestrahlung benötigen Zellen zusätzliche Energie, um Schäden zu reparieren. Zudem können Mitochondrien durch die Bestrahlung beschädigt sein und nicht mehr mit voller Kapazität arbeiten. Dadurch werden Zellen dazu gezwungen, für kurze Zeit vermehrt Energie über Glykolyse zu gewinnen. Whitfield *et al.* (1965) konnten feststellen, dass Bestrahlung innerhalb von drei Stunden zu einem Anstieg von Laktat führt. Da schon allein nach pTyr-Vorbehandlung eine höhere Laktat-Konzentration im Zelllysat (HSF4) bzw. Medium (A549)

nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, inwiefern diese Werte durch Bestrahlung beeinflusst werden.

HSF4- und A549-Zellen wurden für 16 h mit 10 μM pTyr vorbehandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Laktatwerte in Zelllysat und Medium wurden über einen Zeitraum von zwei Tagen nach Bestrahlung überprüft.

Obwohl der Laktatwert der pTyr-behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung erhöht war, kam es bei diesen Zellen zu keinem weiteren Anstieg durch Bestrahlung. Die Werte sanken nach Bestrahlung mit 4 Gy sowohl bei HSF4 als auch bei A549 wieder auf den Kontrollwert der unbehandelten und unbestrahlten Zellen (Abb. 3.27). In der nicht mit pTyr behandelten Kontrolle hingegen kam es sowohl bei HSF4- als auch bei A549-Zellen wie erwartet zu einem Anstieg der Laktat-Konzentration nach Bestrahlung.

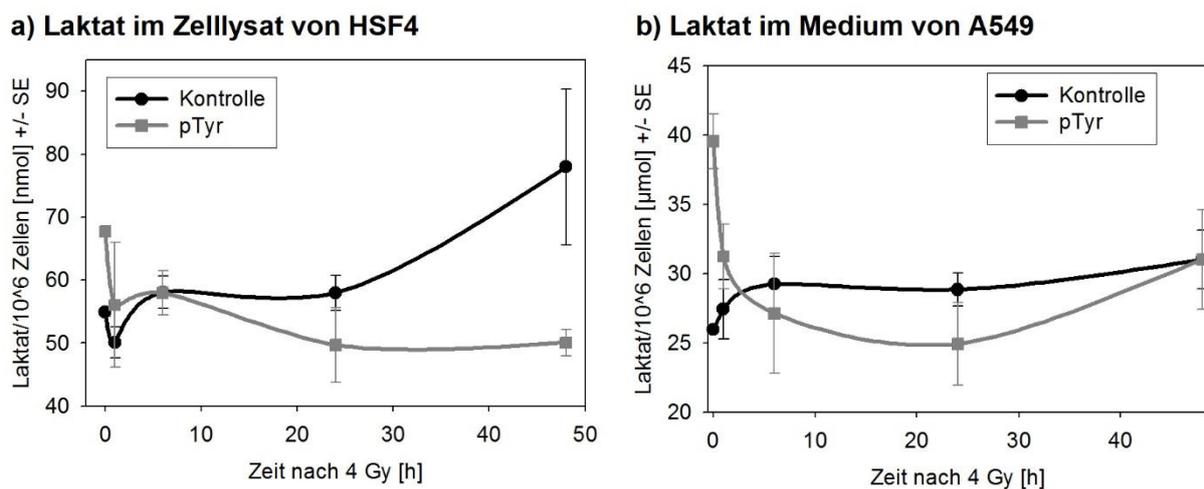


Abbildung 3.27: Laktat-Konzentration nach pTyr-Behandlung und IR. Konfluente a) HSF4 und b) A549-Zellen wurden für 16 h mit 10 μM pTyr behandelt, mit 4 Gy bestrahlt und die Laktat-Konzentration nach entsprechender Zeit in Zelllysat (HSF4) bzw. Medium (A549) nach Protokoll bestimmt. Die Daten sind zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten mit je zwei Parallelansätzen. Die Datenpunkte zeigen die absolute Laktatmenge pro Millionen Zellen \pm Standardfehler (SE).

Laktat gilt als Radikalfänger (Herz *et al.* 1997, Groussard *et al.* 2000). Callahan *et al.* (1990) konnten nachweisen, dass eine erhöhte Glukoseaufnahme und ein damit einhergehender Anstieg an Laktat Zellen vor hypoxischen Schäden schützt. Allein durch diese Eigenschaft wirkt Laktat unter bestimmten Umständen radioprotektiv. Allerdings ist die protektive Wirkung abhängig von der Konzentration und der Dauer, der die Zellen erhöhten Laktatwerten ausgesetzt sind. Übersteigt die Laktatkonzentration einen kritischen Wert, der

abhängig vom jeweiligen Gewebe ist, kann Laktat aber auch wieder radiosensibilisierend wirken (Seymour und Mothersill 1981).

Um zu überprüfen, ob allein eine erhöhte Laktat-Konzentration zum Zeitpunkt der Bestrahlung einen radioprotektiven Effekt ausübt, wurden HSF4- und A549-Zellen wie zuvor mit pTyr behandelt. Zusätzlich wurde direkt vor Bestrahlung 15 mM Laktat zugegeben. Dies entspricht dem Anstieg der Laktat-Konzentration im Medium, den die pTyr-Behandlung in A549-Zellen im Laufe der Inkubationszeit von 16 h bewirkt. Die Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt, 6 h nach Bestrahlung ausgesät und die Kolonien nach 14 (HSF4) bzw. 10 Tagen (A549) gefärbt und ausgewertet. In HSF4-Zellen bewirkte die Zugabe von Laktat zu den Kontrollzellen nur ein leicht verbessertes Überleben. In den zuvor mit pTyr behandelten Zellen kam es sogar zu einer Reduktion des Überlebens durch Laktatzugabe (Abb. 3.28 a). In A549-Zellen führte die Zugabe von Laktat zu den Kontrollzellen zu einer deutlicheren Steigerung der Überlebensfraktion, die nahezu den Level der pTyr-behandelten Zellen erreichte. Waren die A549-Zellen vorher mit pTyr behandelt worden, führte auch hier die Zugabe von Laktat zu einer Reduktion der Überlebensrate, welche sogar unter die der Kontrollzellen absank (Abb. 3.28 b).

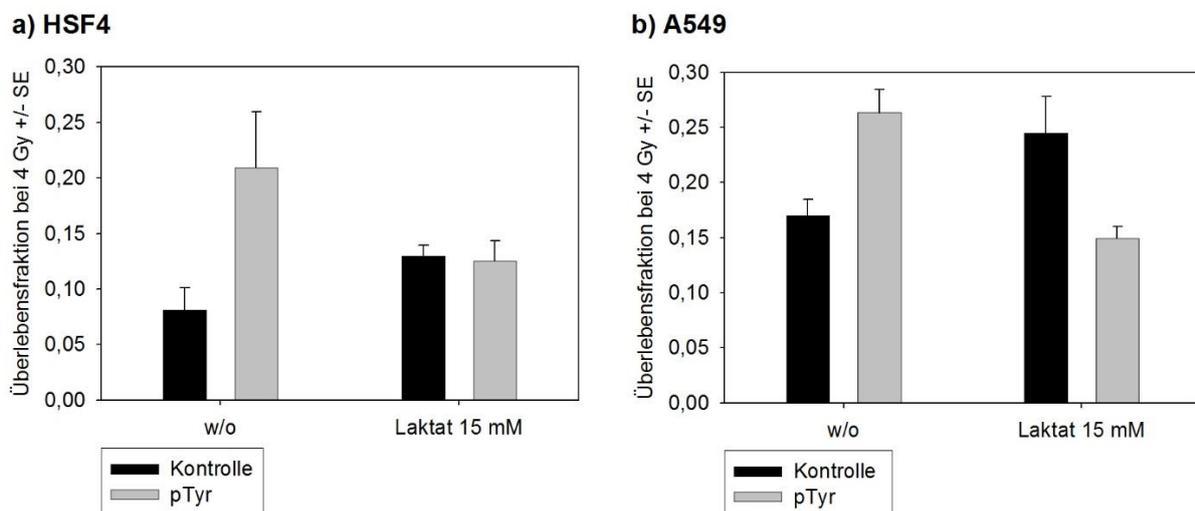


Abbildung 3.28: Klonogenes Überleben nach Zugabe von Laktat vor IR. Konfluente a) HSF4- und b) A549-Zellen wurden für 16 h mit 10 μ M pTyr behandelt. Direkt vor Bestrahlung mit 4 Gy wurden 15 mM Laktat zugegeben. Die Zellen wurden 6 h nach Bestrahlung zu je 500 Zellen pro Platte ausgesät und die Kolonien nach 14 (HSF4) bzw. 10 Tagen (A549) gefärbt. Die Daten zeigen die Anzahl der Kolonien prozentual zur unbestrahlten Kontrolle +/- SE aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 4 parallelen Ansätzen..

Somit ist denkbar, dass die pTyr-Behandlung die Laktat-Konzentration auf ein protektives Niveau anhebt, die zusätzliche Gabe von Laktat jedoch bewirkt, dass die kritische Konzentration überschritten wird und das Laktat seine Eigenschaft als Radioprotektor wieder verliert und sich negativ auf das Überleben auswirkt. So bewirkt eine zusätzliche Gabe von Laktat in HSF4-Zellen ein leicht verbessertes Überleben im Vergleich zur Kontrolle. Die HSF4-Zellen, die jedoch zuvor mit pTyr behandelt wurden und somit bereits eine Steigerung der Laktat-Konzentration erfahren haben, reagieren bei einer abermaligen Steigerung des Laktats sensibler auf Bestrahlung als jene Zellen, die nur mit pTyr behandelt wurden. (Abb. 3.28 a). Die Tatsache, dass das Überleben dieser Zellen immer noch über dem der Kontrolle liegt, kann vermutlich auf die weiteren positiven Auswirkungen der pTyr-Behandlung zurückgeführt werden, wie die Erneuerung der Mitochondrienpopulation und die Aktivierung von Reparaturproteinen.

A549-Zellen, die direkt vor Bestrahlung mit Laktat behandelt wurden, zeigen ebenfalls ein deutlich verbessertes Überleben im Vergleich zur Kontrolle. Wie auch in den Fibroblasten senkt eine Zugabe von Laktat zu den pTyr-behandelten Zellen direkt vor Bestrahlung die Überlebensfähigkeit stark (Abb. 3.28 b). Das heißt auch hier scheint die für eine Radioprotektion kritische Konzentration des Laktats, die mittels pTyr-Behandlung erreicht wird, überschritten zu werden und die negativen Eigenschaften des Laktats wirken dem protektiven Effekt des pTyr entgegen.

4 Diskussion

Strahlung kann effizient zur Tumorbehandlung eingesetzt werden, wobei jedoch stets ein Augenmerk auf das umliegende gesunde Gewebe gelegt werden muss, das bei einer Strahlentherapie ebenfalls in bestimmtem Ausmaß geschädigt wird. Neben der therapeutischen Strahlenexposition sind Menschen auch natürlicher Strahlung im Alltag oder arbeitsbedingt ausgesetzt, wie etwa Piloten und Raumfahrer oder medizinisches Personal. Während ein gewisser geringer Level an Strahlung sich als fördernd für Wachstum und Entwicklung erwiesen hat und sogar einen Schutzmechanismus gegen höhere Strahlendosen darstellt (Planel *et al.* 1987, Liu 2010), können bei höheren Dosen natürlicher Strahlung oder medizinisch applizierter Strahlung ebenfalls kritische DNA-Schäden in den Zellen auftreten. Eine Möglichkeit, sowohl die Schädigung von Normalgewebe in der Strahlentherapie als auch natürliche Strahlenschäden zu minimieren, bieten Radioprotektoren, die entweder passiv als Radikalfänger wirken, oder aber, wie Ortho-Phospho-L-Tyrosin (pTyr), aktiv in den Reparaturmechanismus der Zelle eingreifen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, auf welche Weise pTyr in die Zellreparatur eingreift und welche durch pTyr vermittelten Veränderungen in der Zelle nötig sind, um dies zu ermöglichen.

4.1 pTyr wirkt radioprotektiv auf Wildtyp-TP53-Zellen bei unterschiedlichen Strahlenqualitäten

Wie bereits durch Dittmann *et al.* (2001) gezeigt werden konnte, übt pTyr seinen radioprotektiven Effekt selektiv nur in TP53-Wildtyp-Zellen aus, nicht jedoch in Zellen mit mutiertem TP53, in denen pTyr teils sogar sensibilisierend wirkt. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass pTyr in den TP53-Wildtyp-Zellen HSF4, A549 und A549PON-TP53wt zu einem verbesserten Überleben nach γ -Strahlung führt, während TP53-mutierte FaDu-Zellen keine Veränderung durch pTyr aufweisen und A549PON-TP53mut-Zellen sogar sensibilisiert werden.

Radioprotektoren können je nach zugrunde liegendem Wirkmechanismus bei verschiedenen Strahlenqualitäten und -dosen unterschiedliche Effekte zeigen. Dabei spielt die Art der Schädigung eine Rolle. Durch Strahlung können direkt oder indirekt durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies irreparable DNA-Schäden auftreten, die zu einem Absterben der betroffenen Zellen führen. Weiter bewirkt eine Bestrahlung eine Veränderung der

Genaktivierung, so dass beispielsweise Entzündungsreaktionen auftreten und Angiogenese sowie Gefäßpermeabilität beeinflusst werden. Dies kann auf lange Sicht zu einer anhaltenden, teils fatalen Veränderung im Gewebe führen. Überleben Zellen trotz unreparierter Schäden, werden diese Änderungen der DNA an Tochterzellen weitergegeben, deren Funktion im Körper dann entweder nicht mehr voll ausgeübt werden kann oder die daraufhin ebenfalls Tumore bilden können. Des Weiteren tritt bei Bestrahlung auch der sogenannte Bystander-Effekt auf, das heißt selbst Zellen, die der Strahlung nicht direkt ausgesetzt sind, erleiden DNA-Schäden und zeigen molekulare Modifikationen.

Die auftretenden DNA-Schäden unterscheiden sich nicht nur abhängig von der Dosis, sondern auch je nach Strahlenqualität. So können durch Strahlung mit einem hohen linearen Energietransfer (LET) mehr als doppelt so viele Läsionen in einem räumlich begrenzten Schadenscluster auftreten als durch niederenergetische Strahlung (Semenenko und Stewart 2004). Diese höhere Schadensdichte stellt häufig ein Problem bei der Reparatur dar, da die Erkennung und Behebung dieser Schäden durch die Komplexität erheblich erschwert wird (Loucas und Geard 1994, David-Cordonnier *et al.* 2001, Tsao *et al.* 2007). So besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Zellen bereits nach geringen Dosen von α -Teilchen-Strahlung eine maligne Transformation aufgrund nicht oder falsch reparierter Schäden durchlaufen (Hei *et al.* 1994). Auch zeigen sich unterschiedliche Genexpressionsmuster beziehungsweise eine unterschiedliche Kinetik der Expression und Rekrutierung von Reparaturenzymen je nach Art der Strahlung (Woloschak und Chang-Liu 1990, Hei *et al.* 1996, Costes *et al.* 2006, Niemantsverdriet *et al.* 2012).

Um zu überprüfen, ob der Effekt einer pTyr-Behandlung von der Art der Strahlung und damit von der Beschaffenheit der DNA-Schädigung abhängt, wurde weiterführend die Wirkung von pTyr bei α -Teilchen-Strahlung, also Strahlung mit hohem LET, überprüft. Auch hier konnte ein radioprotektiver Effekt von pTyr auf die Wildtypzellen HSF4 und A549 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Protektion, die durch pTyr vermittelt wird, nicht auf einen singulären Wirkmechanismus dieses Radioprotektors, wie etwa die Funktion als Radikalfänger, zurückgeführt werden kann, sondern umfangreichere Veränderungen in der Zelle zu dem besseren Überleben beitragen.

4.2 pTyr führt trotz Abwesenheit von DNA-Schäden zu einer Aktivierung von Reparaturproteinen ohne den Zellzyklus zu beeinflussen

Phospho-Tyrosin führt in millimolaren Konzentrationen zu einer Inhibierung des Zellwachstums (Mishra und Hamburger 1993). Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten niedrigen Konzentration von 10 μ M konnte jedoch keine verminderte Proliferation festgestellt werden. Durch Vorbehandlung mit pTyr kommt es zu einer Stabilisierung und Phosphorylierung der ATM, wobei das Verhältnis von phosphorylierter ATM an Serinrest 1981 zu pan-ATM dabei nahezu gleich bleibt. Da aber die Gesamtmenge dieses Proteins ansteigt, bedeutet dies auch einen Anstieg an absoluter Menge von phosphorylierter ATM, das heißt es findet zwar kein relativer, aber ein absoluter Anstieg von aktivierter ATM statt. Aktivierte ATM kann die Phosphorylierung von Chk2 (checkpoint kinase 2) vermitteln, wodurch ein Zellzyklusarrest eingeleitet wird (Matsuoka *et al.* 1998, Chaturvedi *et al.* 1999, Ahn *et al.* 2000). Dennoch zeigte sich bei pTyr-behandelten Zellen auch im Zellzyklus keinerlei Unterschied zu unbehandelten Zellen.

Neben seiner Rolle in der Zellzykluskontrolle ist ATM außerdem für die Phosphorylierung der DNA-PKcs an Threonin 2609 verantwortlich (Chen *et al.* 2007). Die DNA-PKcs stellt wie die beiden anderen Mitglieder der PIKK- (phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase) Familie, ATM und ATR, ein wichtiges Element der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) dar (Lee *et al.* 1997, Falck *et al.* 2005).

Es konnte festgestellt werden, dass durch eine 16-stündige Inkubation der TP53-Wildtypzellen A549 mit pTyr die Phosphorylierung der DNA-PKcs an T 2609 sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus signifikant erhöht wird. Nach Bestrahlung mit 4 Gy stieg der Phosphorylierungslevel der Kontrollzellen innerhalb von 5-10 Minuten auf den Level der pTyr-behandelten Zellen an.

Dittmann *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die verstärkte Phosphorylierung der DNA-PK an Threonin 2609 im Zusammenhang steht mit der pTyr-vermittelten nukleären Translokation des EGFR. Die aktivierte Form der DNA-PK kann schneller an die DNA binden und somit eine schnellere Reparatur einleiten. Dabei ist die Phosphorylierung des EGFR an Thr 654, die auch durch pTyr-Inkubation hervorgerufen wird, essenziell für die Translokation des EGFR (Dittmann *et al.* 2010).

Neben Threonin 2609 wird die DNA-PK durch Bestrahlung bzw. infolge replikationsbedingter DNA-DSB auch an Serinrest 2056 autophosphoryliert (Chen *et al.* 2005). Die Kinaseaktivität der DNA-PK ist maximal, wenn sowohl Threonin 2609 als auch Serin 2056 phosphoryliert sind. Jedoch bewirkt eine Mutation im S 2056-Cluster nur eine leichte Strahlensensibilisierung (Nagasawa *et al.* 2010). Eine Phosphorylierung an dieser Stelle wirkt also vor allem verstärkend. Es wurde untersucht, ob eine pTyr-Inkubation bereits ausreichend ist, eine volle Aktivierung der DNA-PK herbeizuführen.

Die Phosphorylierung der DNA-PKs an S 2056 wurde durch eine pTyr-Präinkubation nur leicht erhöht. Eine zusätzliche Bestrahlung mit 4 Gy hatte jedoch zur Folge, dass die Phosphorylierung an S 2056 in pTyr-behandelten Zellen schneller anstieg als in den Kontrollzellen, sodass der Level im Nukleus nach drei Minuten signifikant über dem der Kontrollzellen lag. Fünf Minuten nach 4 Gy hatten die Kontrollzellen das gleiche Niveau wie das der pTyr-behandelten Zellen erreicht. Dies bedeutet, dass in pTyr-behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung, also der Schädigung der DNA, die DNA-PK bereits aktiviert ist und die Enden der DNA schneller den Reparaturproteinen zugänglich gemacht werden, und somit eine schnellere Reparatur einsetzen kann als in Kontrollzellen, in denen dieser Signalweg erst durch die Bestrahlung aktiviert wird.

Toulany *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die DNA-PK nach Bestrahlung einen funktionellen Komplex mit AKT bildet. AKT erhöht dabei auch die Kinaseaktivität der DNA-PK, was zu deren Autophosphorylierung an S 2056 führt und somit eine maximale Aktivierung der Kinaseaktivität der DNA-PK ermöglicht.

Um zu überprüfen, ob der pTyr-vermittelte Anstieg der S 2056-Phosphorylierung auf eine erhöhte AKT-Aktivität zurückgeführt werden kann, wurde im weiteren Verlauf der Einfluss einer pTyr-Behandlung auf den AKT-Signalweg untersucht. Eine pTyr-Behandlung führte nicht zu einem veränderten Level von AKT. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sowohl die Phosphorylierung an Threonin 308 als auch an Serin 473 leicht anstieg, wobei die Phosphorylierung an T 308 nach 16 Stunden pTyr sogar signifikant erhöht war. Da AKT durch eine pTyr-Behandlung also stärker aktiviert wird, kann damit auch ein Anstieg der DNA-PK-Phosphorylierung erklärt werden.

Die verstärkte Aktivität von AKT nach pTyr-Behandlung resultierte auch in einer verstärkten Phosphorylierung des AKT-Substrats Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3). Dieses Protein

wird, im Gegensatz zu den meisten Proteinen, durch eine Phosphorylierung inaktiviert. GSK3 hat unter anderem Einfluss auf die TP53-vermittelte Entscheidung über die Einleitung von Apoptose oder Reparatur. Aktives, unphosphoryliertes GSK3 phosphoryliert die TP53-Acetyltransferase TIP60 an Serinrest 86. Diese aktivierte Form von TIP60 kann wiederum TP53 an Lysinrest 120 acetylieren, was eine Acetylierung des Histons H4 am Promotor des proapoptotischen BH3-only-Proteins PUMA und damit dessen Expression zur Folge hat. Bei einer Inhibierung von GSK3 durch Phosphorylierung wird von der Zelle nicht der Weg der Apoptose sondern der der Zellreparatur gewählt (Charvet *et al.* 2011). Des Weiteren führt die Inhibierung von GSK3- β zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Degradierung des Transkriptionsfaktors β -Catenin. Es konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Phosphorylierung von GSK3- β durch AKT vor oxidativem Stress schützt (Nair und Olanow 2008). Dass GSK3 im Laufe der pTyr-Behandlung inhibiert wird spricht dafür, dass die Zelle als Reaktion auf Strahlenschäden nicht in Apoptose geht sondern Überlebenssignalwege aktiviert.

Um zu überprüfen, ob die Beeinflussung des AKT-Signalwegs für den radioprotektiven Effekt von pTyr von Bedeutung ist, wurde die PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002 inhibiert, um somit eine Signalweiterleitung über AKT zu unterbinden. Eine LY294002-Behandlung (10 μ M) von A549-Zellen führte zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens im Vergleich zur Kontrolle. Wurden diese Zellen zusätzlich mit pTyr behandelt, so verbesserte sich deren Überleben leicht. Jedoch war der pTyr-Effekt abgeschwächt. Es kann also angenommen werden, dass die Aktivierung von AKT durch pTyr im Vorfeld einer Bestrahlung einen kleinen Teil des Mechanismus darstellt, der zu einer Radioprotektion durch pTyr führt. Durch die Inaktivierung der GSK3 exprimiert die Zelle kein proapoptotisches Protein PUMA und wählt folglich den Reparaturweg. Zudem wird die Aktivität der DNA-PK erhöht, was eine schnellere DNA-Reparatur ermöglicht. Da jedoch selbst bei Inhibierung des AKT-Signalwegs ein verbessertes Überleben durch pTyr auftritt, kann dies nicht alleinig für die Radioprotektion verantwortlich sein.

Eine Aktivierung der Reparaturproteine erfolgt für gewöhnlich als Reaktion auf DNA-Schäden. Zum Nachweis von DNA-DSB wurde die Phosphorylierung von H2AX untersucht. H2AX, eine Variante des Histons H2A, wird als Reaktion auf ionisierende Strahlung an Serinrest 139 um den Bereich eines DNA-DSB phosphoryliert und wird dann als γ H2AX bezeichnet. Die Phosphorylierung erreicht teils bereits 10 Minuten nach Eintreten eines

Schadens einen Maximalwert (Rogakou *et al.* 1998). Diese Phosphorylierung wird von einer oder mehreren der PI3K-verwandten Proteinkinasen vorgenommen. Sowohl die DNA-PK als auch ATM können diese Phosphorylierung nach Bestrahlung liefern, aber auch ATR trägt einen Teil zu der Phosphorylierung von H2AX bei (Burma *et al.* 2001, Stiff *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, An *et al.* 2010). Dabei ist die Phosphorylierung von H2AX und die damit verknüpfte Reparatur von Schäden, vor allem in bestimmten Bereichen des schwer zugänglichen Heterochromatins, in dem DNA-Schäden langsamer repariert werden als Schäden im Euchromatin, abhängig von ATM (Goodarzi *et al.* 2008, Jakob *et al.* 2011). Die Phosphorylierung von H2AX sowohl bei Replikation als auch nach UV-Bestrahlung erfolgt, anders als bei ionisierender Strahlung, vor allem durch ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related), während ATM hier eine untergeordnete Rolle spielt (Ward und Chen 2001, Hanasoge und Ljungman 2007). Um replikationsbedingte γ H2AX-positive Foci zu minimieren, erfolgt der Nachweis in konfluenten Kulturen.

Es konnte kein DNA-Schaden nach alleiniger pTyr-Vorbehandlung für 16 h festgestellt werden. Als Reaktion auf eine zusätzliche Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Induktion von γ H2AX-Foci. Innerhalb der ersten sechs Stunden nach Bestrahlung konnte jedoch eine schnellere Reduktion dieser Foci in den pTyr-behandelten TP53-Wildtyp-Zelllinien (A549, HSF4, A549PON-TP53wt) beobachtet werden. Nach 24 Stunden, also nach Abschluss der DNA-Reparatur, wurden in diesen Zelllinien signifikant weniger verbleibende Schäden registriert. Auch bei höheren Strahlungsdosen wurde dieser Effekt auf die Reparatur festgestellt. In Zelllinien mit mutiertem TP53 (A549PON-TP53mut) zeigte sich dahingegen sogar eine verlangsamte Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden, was in einer erhöhten Anzahl verbleibender Schäden nach Abschluss der Reparatur resultierte. Die beschleunigte und effektivere Reparatur der pTyr-behandelten TP53-Wildtyp-Zellen war unabhängig von der Strahlungsqualität. So zeigte sich nach α -Teilchen-Strahlung ein ähnliches Muster in der Reparatur gemessen an der Anzahl von γ H2AX-positiven Foci wie nach γ -Strahlung. Dieses Ergebnis zeigt noch einmal gut, dass Zellen durch pTyr zwar nicht vor der Entstehung von Schäden geschützt werden, diese aber mit pTyr effektiver behoben werden können.

Ein Schritt, der essentiell dafür ist, dass den beteiligten Reparaturproteinen ein Zugang zu den DNA-Schäden überhaupt ermöglicht wird, ist die Öffnung des Chromatins. Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, führt eine Inkubation mit pTyr zu einer

signifikant verstärkten Acetylierung bzw. Phosphorylierung des Histons H3 (K 9/S 10), welche vermutlich durch die Acetyltransferase TIP60 vermittelt wird, deren Aktivität nach pTyr-Inkubation erhöht ist (Paasch 2014). Diese Modifikation des Histons H3 konnte auch in den hier verwendeten Zelllinien HSF4 und A549 bestätigt werden. Interessanter Weise konnte dieses Phänomen des Anstiegs der TIP60-Acetyltransferase-Aktivität und einer damit einhergehenden Relaxation des Chromatins auch bei anderen Radioprotektoren beobachtet werden. So führt auch eine Inkubation mit dem vor allem als Antioxidans wirkenden WR1065, der biologisch aktiven Form des Radioprotektors Amifostin, zu erhöhter TIP60-Acetylierung und dadurch zur Öffnung des Chromatins (Xu *et al.* 2011). TIP60 spielt auch eine Rolle bei der Acetylierung und damit Aktivierung der Kinaseaktivität von ATM, mit dem es einen Komplex bildet. Die Histonacetyltransferase-Aktivität dieses Komplexes wird spezifisch durch DNA-Schäden aktiviert (Sun *et al.* 2005).

Auch das für die pTyr-vermittelte Radioprotektion benötigte TP53 übt eine Funktion bei der Öffnung des Chromatins aus. So konnten Rubbi und Milner (2003) zeigen, dass TP53 die globale Relaxation des Chromatins als Reaktion auf UV-Schäden bewirkt und somit die Nukleotid-Exzisionsreparatur ermöglicht, indem es die Acetylierung der Histone vermittelt. Obwohl Takata *et al.* (2013) mithilfe einer neuen Nachweismethode zeigen konnten, dass eine verstärkte Kondensation der DNA die Bildung von DNA-DSB durch strahleninduzierte freie Radikale reduziert und somit die Verpackung in Heterochromatin einen radioprotektiven Effekt hat, scheint die Öffnung des Chromatins, die durch pTyr bereits vor Bestrahlung erfolgt, vorteilhaft für die Zelle zu sein. Zwar wird somit die Entstehung von DNA-DBS in diesem Bereich wahrscheinlicher, aber gleichzeitig wird den nötigen Reparaturproteinen der Zugang zu diesen Schäden erleichtert. Die Beobachtung, dass bei einer lockeren Chromatinstruktur der Vorteil der schnelleren DNA-Reparatur den Nachteil des erhöhten Schadensaufkommens überwiegt, geht auch aus Studien mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren hervor (Carrier 2013). Vor allem bei höheren Strahlendosen können auch stark kondensierte Bereiche leicht geschädigt werden. Dadurch, dass diese Bereiche durch pTyr geöffnet werden und schneller zugänglich sind, ließe sich auch erklären, warum der pTyr-Effekt bei höherer Dosis besser zum Vorschein tritt, da eben in diesen Fällen die Vorteile des geöffneten Chromatins überwiegen.

4.3 pTyr bewirkt einen Anstieg des zellulären ATP-Gehalts

Die zuvor beschriebene Aktivierung diverser Reparaturproteine und die Relaxation des Chromatins sind Vorgänge, die Energie benötigen. Wie Paasch (2014) bereits zeigen konnte, steht den Zellen nach pTyr-Vorbehandlung eine signifikant erhöhte Menge an ATP zur Verfügung. Dies konnte hier in HSF4- und A549-Zellen ebenfalls bestätigt werden. Dabei beginnt der ATP-Gehalt bereits eine Stunde nach Zugabe von pTyr zu steigen. FaDu-Zellen mit mutiertem TP53 zeigten keinen signifikanten Unterschied im ATP-Gehalt nach pTyr-Behandlung. Jedoch besaß diese Zelllinie bereits basal einen leicht höheren Gehalt an ATP. Ebenso zeigten A549PON-TP53wt-Zellen keinen signifikanten Anstieg. Dahingegen nahm der ATP-Gehalt in den A549PON-TP53mut-Zellen nach einem kurzen Anstieg sogar ab. Es ist denkbar, dass die Behandlung der Wildtypzellen mit Lösungsmittel, in diesem Fall 100 % iges Ethanol, die Generierung von ATP beeinflusst. Basal besitzen diese Zellen ebenfalls mehr ATP als gewöhnliche A549-Zellen. Auch wenn der Anstieg des ATPs nicht signifikant war, so lag der Gehalt nach 16 h pTyr-Behandlung doch signifikant über dem der A549PON-Zellen, die ein mutiertes TP53 exprimierten.

Normalgewebszellen generieren ATP vor allem durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien. Unter Hypoxie dahingegen wird ATP vor allem über die Konversion von Glukose zu Laktat gewonnen. Auch Krebszellen betreiben vor allem Glykolyse, selbst wenn genügend Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung vorhanden ist (Warburg 1956). Tumore sind wechselnden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt, wobei teils normoxische, teils hypoxische Bedingungen vorliegen. Dies lässt die Vermutung zu, dass der durch Warburg beschriebene Effekt der aeroben Glykolyse als Anpassung auf hypoxische Bedingungen zustande kommt (Kimura *et al.* 1996).

Während bei der Umwandlung von Glukose zu Pyruvat über die Glykolyse zwar weniger ATP produziert wird als durch die mitochondriale Atmung, konnten diverse Vorteile dieses Energiegewinnungsweges beobachtet werden. So senkt eine vermehrte Laktatproduktion den pH-Wert, was beispielsweise zu einer verminderten Aktivität von T-Zellen führt, wodurch der Tumor der Überwachung des Immunsystems entgehen kann (Calcinotto *et al.* 2012). Auch wird Laktat als Radikalfänger angesehen, so dass die Zelle bei erhöhter Laktatproduktion besser gegen Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies gewappnet ist. Eine erhöhte Glukoseaufnahme und ein damit einhergehender Anstieg an Laktat wurde auch mit einem besseren Überleben unter hypoxischen Bedingungen in Verbindung gebracht (Callahan *et al.*

1990). Proliferierende Zellen benötigen zudem zum Aufbau neuer Biomasse neben ATP auch Bauelemente wie Kohlenstoff, Stickstoff und NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), reduced). Die oxidative Phosphorylierung liefert der Zelle zwar mehr ATP, doch im Hinblick auf die anderen Komponenten muss die Zelle diese entweder aus bereits bestehenden Zellelementen gewinnen, etwa durch Autophagie, beziehungsweise zeigt sich hier ein deutlicher Vorteil der Glykolyse, was erklären könnte, warum vor allem proliferierende Zellen auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung zur aeroben Glykolyse übergehen (Vander Heiden *et al.* 2009).

4.4 pTyr drosselt die mitochondriale Atmung und bewirkt eine Erneuerung der Mitochondrien

Ein schneller Anstieg der ATP-Gewinnung kann über eine verstärkte oxidative Phosphorylierung im Rahmen der mitochondrialen Atmung erfolgen. Dabei entstehen jedoch auch mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), die in zu hoher Konzentration wiederum nachteilig für die Zelle sein können (Zorov *et al.* 2006). Da pTyr einen schnellen Anstieg an ATP zeigte, wurde zunächst von einer verstärkten mitochondrialen Atmung ausgegangen und dies anhand der Bestimmung der mitochondrialen ROS überprüft.

Diese mitochondrialen ROS lassen sich mithilfe des Farbstoffs MitoSOX™ Red nachweisen. Eine Untersuchung in Phosphotyrosin-behandelten Zellen ergab, dass die Behandlung keine vermehrte Bildung mitochondrialer ROS im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zur Folge hatte. Während sich in den Hautfibroblasten HSF4 keine Änderung zeigte, nahmen die ROS in A549-Zellen sogar tendenziell ab. Dies spricht entgegen der Annahme sogar für eine verringerte mitochondriale Atmung, das heißt ein Teil der Mitochondrien wird abgeschaltet oder die Atmung in den Mitochondrien wird generell gedrosselt. Auch der Status des TP53-Proteins schien hierbei keine Rolle zu spielen, da sowohl A549PON-TP53wt- als auch A549PON-TP53mut-Zellen nach einem nur kurzzeitigen Anstieg über die weitere Behandlungsdauer ein vermindertes Niveau an mitochondrialen ROS aufwiesen. In allen Zelllinien erreichte die Menge an ROS nach 16 h pTyr wieder ihren Ausgangswert. Nach Bestrahlung entsprach die Menge an mitochondrialen ROS in pTyr-behandelten HSF4-Zellen der der Kontrollzellen. Bei A549- und A549PON-Zellen bewirkte die Bestrahlung der pTyr-behandelten Zellen eine leichte Reduktion der ROS im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollzellen.

Die Annahme, dass der ATP-Anstieg nicht durch verstärkte mitochondriale Atmung zustande kam, wurde durch die Beobachtung bestärkt, dass die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) im Laufe einer pTyr-Inkubation verstärkt phosphoryliert wird. Dieses Schlüsselenzym der mitochondrialen Atmung bestimmt über die Verwendung von Pyruvat. Es katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA, welches daraufhin in den Zitronensäurezyklus eintreten kann. Durch eine Phosphorylierung der α -Untereinheit der PDH am Serinrest 293 wird PDH inhibiert (Linn *et al.* 1969, Korotchkina und Patel 1995). Diese Phosphorylierung wird durch PDK-1 vermittelt (Kolobova *et al.* 2001, Korotchkina und Patel 2001) und verhindert, dass Pyruvat der oxidativen Phosphorylierung zur Verfügung steht. Dieses wird stattdessen durch die Laktat-Dehydrogenase (LDH) in Laktat umgewandelt. Es wurde bereits beobachtet, dass die PDH in den meisten Tumorzellen verstärkt phosphoryliert ist, bzw. weniger PDH exprimiert wird, bei einer gleichzeitigen Stabilisierung von HIF-1 α , wodurch die Zellen den für Tumorzellen typischen Warburg-Effekt zeigen (Koukourakis *et al.* 2005). Die Inhibierung der PDH durch PDK-1 bewirkt auch unter Hypoxie eine Verringerung der mitochondrialen ROS und reduziert das Membranpotenzial während der Vorrat an ATP in der Zelle steigt (Kim *et al.* 2006). Neben einer verstärkten Inhibierung der PDH trägt in Tumorzellen die Expression der Pyruvat-Kinase M2 (PKM2) zum Warburg-Effekt bei. Diese eigentlich embryonale Splice-Variante der Pyruvat-Kinase, die eine geringere Aktivität aufweist, unterscheidet sich von der in Normalgewebszellen exprimierten PKM1 dahingehend, dass statt Exon 10 das Exon 9 herausgeschnitten wird. Sie wirkt als transkriptioneller Co-Aktivatoren und interagiert mit HIF-1 α , wodurch die Expression glykolytischer Gene induziert wird (Luo *et al.* 2011). Darüber hinaus wird die PKM2, im Gegensatz zu PKM1, vermittelt durch aktivierten EGFR in den Zellkern transloziert, wo sie an β -Catenin bindet. Diese Interaktion mit β -Catenin führt zu einer Acetylierung des Histons H3 an Lysinrest 9 und zur Expression von Cyclin D1 (Yang *et al.* 2011, Yang *et al.* 2012). Yang *et al.* (2012) konnten weitergehend nachweisen, dass nach EGFR-vermittelter Aktivierung von ERK2 diese direkt an PKM2 bindet, nicht aber an PKM1, und somit die Expression von Proteinen bewirkt, die den Warburg-Effekt hervorrufen. Wird dagegen die normale Isoform, PKM1, wieder in Zellen eingebracht, so bewirkt dies eine Umkehrung des Warburg-Effekts zurück zu einem normalen Phänotyp.

Zusammen mit der Beobachtung von Paasch (2014), dass die Mitochondrienzahl in pTyr-behandelten Zellen innerhalb der ersten sechs Behandlungsstunden abnimmt, sprechen

die angeführten Erkenntnisse gegen eine verstärkte Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung.

Die Abnahme der Mitochondrien warf die Frage auf, ob Mitophagie für den Verlust der Mitochondrien und für die zusätzliche ATP-Produktion verantwortlich ist. Als Nachweismarker für Autophagie, und damit auch für Mitophagie, diente das Protein LC3, das im Laufe der Autophagie von LC3-I zu LC3-II umgewandelt wird. Bereits innerhalb einer Stunde nach pTyr-Zugabe kam es in A549-Zellen zu einem Anstieg des Verhältnisses von LC3-II zu LC3-I, mit einem maximalen signifikant erhöhten Verhältnis nach drei Stunden. In HSF4-Zellen trat dieser Effekt etwas verzögert auf. Das Maximum wurde hier nach sechs Stunden erreicht.

Des Weiteren wurde nach pTyr-Inkubation eine Reduktion des Cytochrom C-Gehalts der Mitochondrien beobachtet. Eine Permeabilisierung der Zellmembran vor Inkubation mit Primär-Antikörper ermöglichte hierbei, dass nur Cytochrom C gemessen wird, das noch in den Mitochondrien eingeschlossen ist.

Ein möglicher Grund für eine Reduktion des gemessenen mitochondrialen Cytochrom C-Gehalts wäre die Einleitung der Apoptose, wobei das Cytochrom C ans Cytoplasma abgegeben wird. Da mit pTyr-Behandlung jedoch keine verstärkte Apoptoseinduktion einhergeht, kann davon ausgegangen werden, dass die Cytochrom C-Reduktion andere Ursachen hat.

Bei der Mitophagie werden defekte Mitochondrien komplett in Autophagosomen aufgenommen, bevor sie Cytochrom C freisetzen können. Die Tatsache, dass der pTyr-vermittelten Abnahme von Cytochrom C entgegengewirkt werden kann durch vorherige Behandlung mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin, stützt die These, dass pTyr zu einer Reduktion der Mitochondrien durch Mitophagie führt, was mit einem Anstieg von LC3-II/LC3-I, einer verringerten Cytochrom C-Konzentration und verminderten mitochondrialen ROS einhergeht und im Laufe der 16 Stunden Behandlung zu einer verjüngten Population von Mitochondrien führt. Auch im klonogenen Überleben mit Chloroquin konnte gezeigt werden, dass die Mitophagie einen Beitrag zur Radioprotektivität von pTyr leistet.

Der Prozess der Mitophagie liefert auch ATP. Da jedoch nach 16 Stunden pTyr-Inkubation wieder die volle Anzahl an Mitochondrien nachproduziert wurde, kann man davon ausgehen,

dass das gewonnene ATP und die Biomasse der Mitochondrien vor allem in der Neuproduktion Verwendung finden und der Zelle nicht als Überschuss zur Verfügung stehen. Dieser Mechanismus ermöglicht jedoch, einen plötzlichen Bedarf an ATP schnell zu decken. Im Laufe der pTyr-Behandlungsdauer von 16 h ist es der Zelle möglich, den Verlust der Mitochondrien über langsamere ATP-Generierung, etwa über aerobe Glykolyse, wieder auszugleichen.

4.5 pTyr vermittelt eine kurzfristige Steigerung der Glykolyse

Eine 16-stündige Behandlung mit 10 μ M pTyr führte sowohl in A549- als auch in HSF4-Zellen zu einer verstärkten Laktatproduktion. Bei A549-Zellen war vor allem ein Anstieg der Laktat-Konzentration im Medium messbar, während die Konzentration im Zelllysate weitgehend unverändert blieb. Die Fibroblasten dahingegen zeigten einen Anstieg im Zelllysate, jedoch keine merkliche Veränderung im Medium. Dies lässt sich damit erklären, dass A549-Zellen basal bereits mehr Laktat produzierten als HSF4-Zellen. Zellen können nur eine begrenzte Menge Laktat speichern. Da in den Fibroblasten diese Speicher vermutlich nicht voll sind, da die Zellen vor der pTyr-Behandlung vor allem über die mitochondriale Atmung ihre Energie generieren, kann überschüssig produziertes Laktat noch eingelagert und verwertet werden, während A549-Zellen den Überschuss ins Medium abgeben müssen. Die beobachteten Konzentrationsunterschiede zwischen A549- und HSF4-Zellen können außerdem durch eine unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit und die unterschiedliche Zellgröße erklärt werden.

Laut Whitfield *et al.* (1965) führt Bestrahlung zu einem Anstieg an Laktat innerhalb der ersten drei Stunden, was zum einen auf eine gesteigerte Produktion, zum anderen auf eine durch die Bestrahlung gestörte Fähigkeit zur Metabolisierung des Laktats zurückzuführen ist. Nach Bestrahlung konnte in den pTyr-behandelten Zellen jedoch kein weiterer Anstieg an Laktat festgestellt werden. Die Laktat-Konzentration sank in beiden Zelllinien sogar unter die der Kontrollzellen. Phosphotyrosin führt also nicht zu dauerhaft erhöhten Laktatwerten, sondern die Bestrahlung hebt die vermehrte Ansammlung von Laktat wieder auf. Da pTyr-behandelte Zellen bereits vorab mehr Energie zur Verfügung haben, ist eine vermehrte Laktatproduktion nach Bestrahlung vermutlich nicht nötig, während diese Zellen gleichzeitig noch fähig sind, das angesammelte Laktat weiter zu nutzen, was das Stagnieren bzw. Absinken der Laktatkonzentration nach Bestrahlung in diesen Zellen erklären kann. Zudem

verfügen diese Zellen über eine verjüngte Mitochondrienpopulation. Das heißt, die Energie, die akut zur Einleitung der Reparatur von DNA-Schäden benötigt wird, steht bereits zur Verfügung und die mitochondriale Atmung kann kurz nach Bestrahlung wieder als Energielieferant dienen. In unbehandelten Zellen, die keine Erneuerung der Mitochondrien erfahren haben, führt die Bestrahlung je nach Schädigung der Mitochondrien teils zu einem plötzlichen Ausfall eines erheblichen Anteils dieser Energielieferanten, sodass die Zelle gezwungen ist zur aeroben Glykolyse umzuschalten, was den in den Kontrollzellen beobachteten Anstieg der Laktatkonzentration erklärt.

Schon lange wird Laktat zu den Radikalfängern gezählt (Herz *et al.* 1997, Groussard *et al.* 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Glukoseaufnahme und ein damit einhergehender Anstieg an Laktat Zellen vor hypoxischen Schäden schützt (Callahan *et al.* 1990). Abhängig von der Konzentration und der Dauer, der die Zellen erhöhten Laktatwerten ausgesetzt sind, kann Laktat damit radioprotektiv oder radiosensibilisierend wirken (Seymour und Mothersill 1981). Da pTyr einen Anstieg des Laktats bewirkte, wurde untersucht, ob eine Steigerung des Laktats durch exogene Zugabe zu einer Verbesserung des Überlebens führt, also die Eigenschaft des Laktats als Radikalfänger eventuell einen Teil zur protektiven Wirkung von pTyr beiträgt. Im klonogenen Überleben konnte hier gezeigt werden, dass sowohl in HSF4- als auch in A549-Zellen eine exogene Zugabe von Laktat direkt vor Bestrahlung ein verbessertes Überleben bewirkt. In pTyr-behandelten Zellen hob eine zusätzliche Zugabe von Laktat direkt vor Bestrahlung den protektiven Effekt von pTyr jedoch wieder auf. Die Laktat-Konzentration, die eine Protektion hervorruft, bewegt sich also in einem begrenzten Bereich. Ist ein bestimmter Grenzwert über- oder unterschritten, zeigt sich wieder eine Sensibilisierung, wie Seymour und Mothersill (1981) gezeigt hatten. In den untersuchten TP53-Wildtypzellen scheint die Behandlung mit pTyr also ein optimales radioprotektiv wirkendes Maß an Laktat zu induzieren, was bei einer weiteren Zugabe von Laktat überschritten wird, wodurch der pTyr-Effekt reduziert oder aufgehoben wird. In den Kontrollzellen wird durch die externe Zugabe von Laktat dahingegen wohl erst ein Level an Laktat erreicht, der protektiv wirkt. Dies könnte auch erklären, warum Zelllinien mit mutiertem TP53 durch eine pTyr-Behandlung nicht strahlenresistenter, sondern im Gegenteil teils sogar sensibler gegenüber Strahlung werden. Da diese Tumorzellen ohnehin vermehrt Energie über Milchsäuregärung gewinnen, ist ihre Laktatproduktion im Vergleich zu Normalgewebszellen bereits erhöht. pTyr kann also keinen Wechsel zur aeroben Glykolyse bewirken, da diese schon, anstelle der Mitochondrien, die Hauptenergiequelle ist. Somit fällt

der positive Einfluss der durch pTyr-vermittelten gesteigerten Laktatkonzentration weg und eine Laktat-vermittelte Radioprotektion ist nicht mehr gegeben. Selbst wenn pTyr die Produktion von Laktat in diesen Zellen noch weiter zu steigern vermag, resultiert dies vermutlich in zu hohen und damit toxischen Milchsäurewerten und folglich zu einer Strahlensensibilisierung. Dennoch zeigt sich auch, dass vor allem in den HSF4-Zellen die alleinige Steigerung der Laktatkonzentration in den nicht mit pTyr behandelten nicht ausreichend ist, um das Ausmaß der pTyr-vermittelten Radioprotektion zu erreichen. Jedoch scheint die gesteigerte Laktatmenge einen Teil zum protektiven Effekt von pTyr beizutragen.

Nach einer pTyr-Behandlung kommt es auch zu einer verstärkten Aufnahme von Glukose (Paasch 2014). Buzzai *et al.* (2005) konnten zeigen, dass eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs den Glukosebedarf von Zellen steigert. Die erhöhte Aufnahme von Glukose nach pTyr könnte also eventuell auf metabolische Veränderungen zurückgeführt werden, die durch PI3K-Signalgebung initialisiert werden. Dafür spricht auch die nach pTyr-Behandlung beobachtete verstärkte Phosphorylierung von AKT. Diese Aktivierung des AKT/ PI3-Kinase-Signalweges lässt sich dabei auf die pTyr-vermittelte Aktivierung des EGFR zurückführen (Dittmann *et al.* 2007, Rodemann *et al.* 2007).

Die Aufnahme von Glukose erfolgt über Glukosetransporter, wobei hier zwei Familien von Membrantransportern eine Rolle spielen, die Familie der Trägerprotein-vermittelten Glukose-Uniports (GLUT), die abhängig von einem Konzentrationsgradienten sind, sowie die Familie der Natrium-Glukose-Kotransporter (SGLT, sodium-glucose linked transporter) (Hediger *et al.* 1995, Olson und Pessin 1996). Welcher der Glukosetransporter dabei für die Aufnahme von Glukose verantwortlich ist, hängt stark vom jeweiligen Gewebetyp ab. Auch bei der Aufnahme von Glukose kann der PI3K/AKT-Signalweg wieder Einfluss nehmen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Inhibierung von GSK3, sowohl durch Inhibitor als auch durch siRNA, eine verringerte Transkription des in den meisten Zelltypen exprimierten GLUT-3 zur Folge hat (Watanabe *et al.* 2012). Da die Phosphorylierung von GSK3 durch AKT im Rahmen einer pTyr-Inkubation jedoch gesteigert wird, also GSK3 inhibiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass der GLUT-3 nicht für die beobachtete erhöhte Glukoseaufnahme verantwortlich gemacht werden kann. Ein weiterer Glukosetransporter, der in den meisten Körperzellen exprimiert wird, ist GLUT-1. Auch der GLUT-1 wird durch GSK3 reguliert. Aktives GSK3 unterdrückt die Glukoseaufnahme und GLUT-1-Expression über einen TSC2- (tuberous sclerosis complex subunit 2) und mTOR-abhängigen Signalweg

(Buller *et al.* 2008). Eine Inhibierung von GSK3 durch pTyr könnte also zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme über den GLUT-1 beitragen. Interessanterweise bewirkt eine Inhibierung von Histon-Deacetylasen (HDAC) in Muskelzellen eine verstärkte Acetylierung des Histons H3 sowie eine dadurch erhöhte Glukoseaufnahme durch eine verstärkte Expression des GLUT-4 (Raichur *et al.* 2012). Da auch pTyr die Acetylierung von H3 erhöht, könnte auch eine vermehrte Aufnahme über den GLUT-4 in Frage kommen. Allerdings wird dieser Transporter vor allem in Fett- und Muskelgewebe exprimiert, sollte also in den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien keinen Einfluss nehmen.

Neben der Vielzahl an Trägerprotein-vermittelten Glukose-Uniports ist vor allem der Natrium-Glukose-Kotransporter SGLT-1 von Interesse, der in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert wird. Der SGLT bildet einen Komplex mit EGFR, wobei vor allem die Autophosphorylierungsregion des EGFR (Aminosäuren 978-1210) eine Rolle spielt (Ren *et al.* 2013). Durch seine Interaktion mit dem SGLT bewirkt EGFR eine Stabilisierung desselben und sorgt damit für einen ausreichenden Glukosegehalt in den Zellen (Weihua *et al.* 2008). Sowohl eine Inhibierung des EGFR als auch eine Inhibierung des SGLT verhindert zum einen, dass Zellen nach Bestrahlung die nötige Menge ATP generieren können, zum anderen unterbindet diese die nötigen Modifikationen des Histons H3, die zu der für die Reparatur von Strahlenschäden erforderlichen Umstrukturierung des Chromatins führen (Dittmann *et al.* 2013). Wie Paasch (2014) zeigen konnte, bewirkt eine Inhibierung des SGLT-1 mit Phloridzin eine Drosselung der pTyr-vermittelten Glukoseaufnahme und verhindert die Acetylierung beziehungsweise Phosphorylierung des Histons H3, die für gewöhnlich nach pTyr-Inkubation zu beobachten ist, was dafür spricht, dass die erhöhte Glukoseaufnahme durch pTyr über den SGLT-1 erfolgt.

Wie bereits zuvor erwähnt, schalten auch Normalgewebszellen unter bestimmten Bedingungen auf aerobe Glykolyse um. In Studien mit Hefe konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Atmung während der S-Phase durch Glykolyse ersetzt wird, um Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies zu minimieren (Chen *et al.* 2007). Des Weiteren konnten McFate *et al.* (2008) zeigen, dass der Warburg-Effekt, der in Krebszellen zu beobachten ist, im Zusammenhang mit dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) steht. Sie beobachteten eine verstärkte Expression der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1), was zur Inhibierung des PDC und zur inhibitorischen Phosphorylierung der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) an Serinrest 293 führte. Zusätzlich bewirkte die Inhibierung des PDC eine

normoxische Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α durch glykolytische Metaboliten. HIF-1 α sorgt wiederum für eine gesteigerte Produktion von PDK-1, welche ein direktes Target dieses Transkriptionsfaktors darstellt (Kim *et al.* 2006). Die Inhibierung der PDH, die sich nach pTyr-Behandlung zeigt, bestärkt die Vermutung noch weiter, dass die Zellen vorübergehend verstärkt Glykolyse betreiben, trotz normoxischer Bedingungen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine pTyr-Vorbehandlung von Zelllinien mit TP53-Wildtyp zur Stabilisierung und Aktivierung reparaturrelevanter Proteine, wie ATM, AKT und DNA-PK führt, die vermutlich über die Aktivierung und nukleäre Translokation des EGFR initiiert wird. Weitergehend wird eine Öffnung des Chromatins noch vor dem Auftreten eines Schadens bewirkt, was eine schnellere Reaktion auf Schäden ermöglicht. Der protektive Effekt von pTyr tritt dabei unabhängig von der untersuchten Strahlenqualität auf und ist im klonogenen Assay und mittels Nachweis von γ H2AX-positiven Foci messbar. Die für die Reparaturvorgänge benötigte Energie gewinnt die Zelle dabei durch einen kurzfristigen Wechsel zur aeroben Glykolyse, wodurch es zu einem Anstieg an Laktat kommt, welches antioxidative und, in bestimmten Konzentrationen, radioprotektive Eigenschaften besitzt. Währenddessen kommt es zu einer Erneuerung der Mitochondrien durch Mitophagie. Somit wird die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies zum Zeitpunkt der Bestrahlung reduziert und die Mitochondrien stehen der Zelle nach Bestrahlung wieder in vollem Umfang als Energieproduzenten zur Verfügung. Phosphotyrosin besitzt damit ein hohes Potenzial als selektiver Radioprotektor, der im klinischen Bereich angewendet werden kann, um eine Dosiserhöhung im Tumorgewebe bei gleichzeitigem Schutz des umliegenden Normalgewebes zu ermöglichen. Da pTyr seine Wirksamkeit unabhängig von der Strahlenqualität zeigt, ist darüber hinaus auch eine präventive Applikation von pTyr denkbar, um Schäden durch ungewollte Strahlenexposition, in Beruf oder Umwelt, entgegenzuwirken.

5 Literaturverzeichnis

Adachi, N., T. Ishino, Y. Ishii, S. Takeda and H. Koyama (2001). "DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(21): 12109-12113.

Ahn, J.-Y., J. K. Schwarz, H. Piwnica-Worms and C. E. Canman (2000). "Threonine 68 Phosphorylation by Ataxia Telangiectasia Mutated Is Required for Efficient Activation of Chk2 in Response to Ionizing Radiation." Cancer Research **60**(21): 5934-5936.

Allison, S. J. and J. Milner (2003). "Loss of p53 Has Site-Specific Effects on Histone H3 Modification, Including Serine 10 Phosphorylation Important for Maintenance of Ploidy." Cancer Research **63**(20): 6674-6679.

An, J., Y.-C. Huang, Q.-Z. Xu, L.-J. Zhou, Z.-F. Shang, B. Huang, Y. Wang, X.-D. Liu, D.-C. Wu and P.-K. Zhou (2010). "DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression." BMC Molecular Biology **11**(1): 18.

Antonadou, D., M. Pepelassi, M. Synodinou, M. Puglisi and N. Throuvalas (2002). "Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck cancer." International Journal of Radiation Oncology*Biophysics **52**(3): 739-747.

Arbogast, S., J. Smith, Y. Matuszczak, B. J. Hardin, J. S. Moylan, J. D. Smith, J. Ware, A. R. Kennedy and M. B. Reid (2007). "Bowman-Birk inhibitor concentrate prevents atrophy, weakness, and oxidative stress in soleus muscle of hindlimb-unloaded mice." Journal of Applied Physiology **102**(3): 956-964.

Audebert, M., B. Salles and P. Calsou (2004). "Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining." J Biol Chem **279**(53): 55117-55126.

Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.

Barendsen, G. W. (1994). "RBE-LET relationships for different types of lethal radiation damage in mammalian cells: comparison with DNA dsb and an interpretation of differences in radiosensitivity." Int J Radiat Biol **66**(5): 433-436.

Barendsen, G. W. (1994). "The relationships between RBE and LET for different types of lethal damage in mammalian cells: biophysical and molecular mechanisms." Radiat Res **139**(3): 257-270.

Barski, A., S. Cuddapah, K. R. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. B. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. J. Zhao (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." Cell **129**(4): 823-837.

- Baturay, N. Z. and H. Roque (1991). "In vitro reduction of peroxidation in UVC-irradiated cell cultures by concurrent exposure with Bowman-Birk protease inhibitor." Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis **11**(4): 195-202.
- BfS (2013). Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung Jahresbericht 2011. URN: nbn:de:0221-2013090511044. B. f. Strahlenschutz. Bonn, Das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.
- Birk, Y. (1985). "The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans." Int J Pept Protein Res **25**(2): 113-131.
- Bogo, V., A. J. Jacobs and J. F. Weiss (1985). "Behavioral toxicity and efficacy of WR-2721 as a radioprotectant." Radiat Res **104**(2 Pt 1): 182-190.
- Braunschweiger, P. G., V. Basrur, O. Santos, A. Adessa, P. Houdek and A. M. Markoe (1996). "Radioresistance in murine solid tumors induced by interleukin-1." Radiat Res **145**(2): 150-156.
- Brizel, D. M., T. H. Wasserman, M. Henke, V. Strnad, V. Rudat, A. Monnier, F. Eschwege, J. Zhang, L. Russell, W. Oster and R. Sauer (2000). "Phase III Randomized Trial of Amifostine as a Radioprotector in Head and Neck Cancer." Journal of Clinical Oncology **18**(19): 3339-3345.
- Buller, C. L., R. D. Loberg, M.-H. Fan, Q. Zhu, J. L. Park, E. Vesely, K. Inoki, K.-L. Guan and F. C. Brosius (2008). "A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression." American Journal of Physiology - Cell Physiology **295**(3): C836-C843.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa and D. J. Chen (2001). "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks." Journal of Biological Chemistry **276**(45): 42462-42467.
- Buzzai, M., D. E. Bauer, R. G. Jones, R. J. DeBerardinis, G. Hatzivassiliou, R. L. Elstrom and C. B. Thompson (2005). "The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid [beta]-oxidation." Oncogene **24**(26): 4165-4173.
- Calcinotto, A., P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Mito, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso, M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone and L. Rivoltini (2012). "Modulation of Microenvironment Acidity Reverses Anergy in Human and Murine Tumor-Infiltrating T Lymphocytes." Cancer Research **72**(11): 2746-2756.
- Callahan, D. J., M. J. Engle and J. J. Volpe (1990). "Hypoxic Injury to Developing Glial Cells: Protective Effect of High Glucose." Pediatr Res **27**(2): 186-190.
- Carrier, F. (2013). "Chromatin Modulation by Histone Deacetylase Inhibitors: Impact on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation." Molecular and Cellular Pharmacology **5**(1): 51-59.

- Castillo, J., O. Benavente-García, J. Lorente, M. Alcaraz, A. Redondo, A. Ortuño and J. A. Del Rio (2000). "Antioxidant Activity and Radioprotective Effects against Chromosomal Damage Induced in Vivo by X-rays of Flavan-3-ols (Procyanidins) from Grape Seeds (*Vitis vinifera*): Comparative Study versus Other Phenolic and Organic Compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(5): 1738-1745.
- Chan, D. W., B. P. Chen, S. Prithivirajasingh, A. Kurimasa, M. D. Story, J. Qin and D. J. Chen (2002). "Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks." Genes Dev **16**(18): 2333-2338.
- Charvet, C., M. Wissler, P. Brauns-Schubert, S.-J. Wang, Y. Tang, Florian C. Sigloch, H. Mellert, M. Brandenburg, Silke E. Lindner, B. Breit, Douglas R. Green, Steven B. McMahon, C. Borner, W. Gu and U. Maurer (2011). "Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 Determines the Induction of PUMA and Apoptosis by p53." Molecular Cell **42**(5): 584-596.
- Chaturvedi, P., W. K. Eng, Y. Zhu, M. R. Mattern, R. Mishra, M. R. Hurle, X. Zhang, R. S. Annan, Q. Lu, L. F. Faucette, G. F. Scott, X. Li, S. A. Carr, R. K. Johnson, J. D. Winkler and B. B. Zhou (1999). "Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway." Oncogene **18**(28): 4047-4054.
- Chen, B. P. C., D. W. Chan, J. Kobayashi, S. Burma, A. Asaithamby, K. Morotomi-Yano, E. Botvinick, J. Qin and D. J. Chen (2005). "Cell Cycle Dependence of DNA-dependent Protein Kinase Phosphorylation in Response to DNA Double Strand Breaks." Journal of Biological Chemistry **280**(15): 14709-14715.
- Chen, B. P. C., N. Uematsu, J. Kobayashi, Y. Lerenthal, A. Krempler, H. Yajima, M. Löbrich, Y. Shiloh and D. J. Chen (2007). "Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Is Essential for DNA-PKcs Phosphorylations at the Thr-2609 Cluster upon DNA Double Strand Break." Journal of Biological Chemistry **282**(9): 6582-6587.
- Chen, Z., E. A. Odstreil, B. P. Tu and S. L. McKnight (2007). "Restriction of DNA Replication to the Reductive Phase of the Metabolic Cycle Protects Genome Integrity." Science **316**(5833): 1916-1919.
- Cheutin, T., A. J. McNairn, T. Jenuwein, D. M. Gilbert, P. B. Singh and T. Misteli (2003). "Maintenance of Stable Heterochromatin Domains by Dynamic HP1 Binding." Science **299**(5607): 721-725.
- Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives." Molecular Cell **40**(2): 179-204.
- Costes, S. V., A. Boissière, S. Ravani, R. Romano, B. Parvin and M. H. Barcellos-Hoff (2006). "Imaging Features that Discriminate between Foci Induced by High- and Low-LET Radiation in Human Fibroblasts." Radiation Research **165**(5): 505-515.
- Cureton, E. L., R. O. Kwan, K. C. Dozier, J. Sadjadi, J. D. Pal and G. P. Victorino (2010). "A Different View of Lactate in Trauma Patients: Protecting the Injured Brain." Journal of Surgical Research **159**(1): 468-473.

- David-Cordonnier, M.-H., S. M. T. Cunniffe, I. D. Hickson and P. O'Neill (2001). "Efficiency of Incision of an AP Site within Clustered DNA Damage by the Major Human AP Endonuclease[†]." Biochemistry **41**(2): 634-642.
- Dittmann, K., H. Löffler, M. Bamberg and H. P. Rodemann (1995). "Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture." Radiotherapy and Oncology **34**(2): 137-143.
- Dittmann, K., C. Mayer, B. Fehrenbacher, M. Schaller, R. Kehlbach and H. P. Rodemann (2010). "Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654." FEBS Letters **584**(18): 3878-3884.
- Dittmann, K., C. Mayer, B. Fehrenbacher, M. Schaller, U. Raju, L. Milas, D. J. Chen, R. Kehlbach and H. P. Rodemann (2005). "Radiation-induced Epidermal Growth Factor Receptor Nuclear Import Is Linked to Activation of DNA-dependent Protein Kinase." Journal of Biological Chemistry **280**(35): 31182-31189.
- Dittmann, K., C. Mayer, R. Kehlbach and H. P. Rodemann (2008). "The radioprotector Bowman-Birk proteinase inhibitor stimulates DNA repair via epidermal growth factor receptor phosphorylation and nuclear transport." Radiotherapy and Oncology **86**(3): 375-382.
- Dittmann, K., C. Mayer, H. P. Rodemann and S. M. Huber (2013). "EGFR cooperates with glucose transporter SGLT1 to enable chromatin remodeling in response to ionizing radiation." Radiotherapy and Oncology **107**(2): 247-251.
- Dittmann, K., C. Mayer, G. Wanner, R. Kehlbach and H. P. Rodemann (2007). "The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor- and DNA-dependent kinase phosphorylation." Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology **84**(3): 328-334.
- Dittmann, K., M. Toulany, J. Classen, V. Heinrich, L. Milas and H. P. Rodemann (2005). "Selective Radioprotection of Normal Tissues by Bowman-Birk Proteinase Inhibitor (BBI) in Mice." Strahlentherapie und Onkologie **181**(3): 191-196.
- Dittmann, K., P. Virsik-Kopp, C. Mayer, M. Rave-Frank and H. P. Rodemann (2003). "Bowman-Birk protease inhibitor activates DNA-dependent protein kinase and reduces formation of radiation-induced dicentric chromosomes." Int J Radiat Biol **79**(10): 801-808.
- Dittmann, K. H. (1998). "The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA repair-relevant genes." International Journal of Radiation Biology **74**(2): 225-230.
- Dittmann, K. H., N. Gueven, C. Mayer, P. Ohneseit, R. Zell, A. C. Begg and H. P. Rodemann (1998). "The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts." Radiat Res **150**(6): 648-655.
- Dittmann, K. H., N. Gueven, C. Mayer and H.-P. Rodemann (2001). "Characterization of the amino acids essential for the photo- and radioprotective effects of a Bowman-Birk protease inhibitor-derived nonapeptide." Protein Engineering **14**(3): 157-160.

- Dittmann, K. H., C. Mayer and H. P. Rodemann (2001). "O-phospho-L-tyrosine protects TP53 wild-type cells against ionizing radiation." Int J Cancer **96 Suppl**: 1-6.
- Falck, J., J. Coates and S. P. Jackson (2005). "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage." Nature **434**(7033): 605-611.
- Franken, N., R. ten Cate, P. Krawczyk, J. Stap, J. Haveman, J. Aten and G. Barendsen (2011). "Comparison of RBE values of high- LET alpha-particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death." Radiation Oncology **6**(1): 64.
- Frankenberg, D., M. Frankenberg-Schwager and R. Harbich (1990). "The Contribution of OH* in Densely Ionising Electron Track Ends or Particle Tracks to the Induction of DNA Double Strand Breaks." Radiation Protection Dosimetry **31**(1-4): 249-252.
- Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals." Science **201**(4359): 875-880.
- Friedrich, T., R. Grün, U. Scholz, T. Elsässer, M. Durante and M. Scholz (2013). "Sensitivity analysis of the relative biological effectiveness predicted by the local effect model." Physics in Medicine and Biology **58**(19): 6827.
- Fukuda, H., N. Sano, S. Muto and M. Horikoshi (2006). "Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression." Briefings in Functional Genomics & Proteomics **5**(3): 190-208.
- Ganley, I. G., D. H. Lam, J. Wang, X. Ding, S. Chen and X. Jiang (2009). "ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy." Journal of Biological Chemistry **284**(18): 12297-12305.
- Goel, A. and B. B. Aggarwal (2010). "Curcumin, the Golden Spice From Indian Saffron, Is a Chemosensitizer and Radiosensitizer for Tumors and Chemoprotector and Radioprotector for Normal Organs." Nutrition and Cancer **62**(7): 919-930.
- Goodarzi, A. A., A. T. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Löbrich and P. A. Jeggo (2008). "ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin." Molecular cell **31**(2): 167-177.
- Grawunder, U., M. Wilm, X. Wu, P. Kulesza, T. E. Wilson, M. Mann and M. R. Lieber (1997). "Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells." Nature **388**(6641): 492-495.
- Grdina, D. J., B. Nagy, C. K. Hill, R. L. Wells and C. Peraino (1985). "The radioprotector WR1065 reduces radiation-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in V79 cells." Carcinogenesis **6**(6): 929-931.
- Greif, K.-D., H. J. Brede, D. Frankenberg and U. Giesen (2004). "The PTB single ion microbeam for irradiation of living cells." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms **217**(3): 505-512.

- Greif, K., W. Beverung, F. Langner, D. Frankenberg, A. Gellhaus and F. Banaz-Yasar (2006). "The PTB microbeam: a versatile instrument for radiobiological research." Radiation Protection Dosimetry **122**(1-4): 313-315.
- Groussard, C., I. Morel, M. Chevanne, M. Monnier, J. Cillard and A. Delamarche (2000). "Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study." Journal of Applied Physiology **89**(1): 169-175.
- Gu, J., H. Lu, B. Tippin, N. Shimazaki, M. F. Goodman and M. R. Lieber (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps.
- Guan, J., J. Stewart, J. H. Ware, Z. Zhou, J. J. Donahue and A. R. Kennedy (2006). "Effects of Dietary Supplements on the Space Radiation-Induced Reduction in Total Antioxidant Status in CBA Mice." Radiation Research **165**(4): 373-378.
- Guenther, M. G., S. S. Levine, L. A. Boyer, R. Jaenisch and R. A. Young (2007). "A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells." Cell **130**(1): 77-88.
- Hall, J. C., A. L. Goldstein and B. P. Sonnenblick (1963). "Recovery Of Oxidative Phosphorylation In Rat Liver Mitochondria After Whole Body Irradiation." Journal of Biological Chemistry (U.S.) **238**: 1137-1140.
- Hammarsten, O., L. G. DeFazio and G. Chu (2000). "Activation of DNA-dependent Protein Kinase by Single-stranded DNA Ends." Journal of Biological Chemistry **275**(3): 1541-1550.
- Hanasoge, S. and M. Ljungman (2007). "H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase." Carcinogenesis **28**(11): 2298-2304.
- Harapanhalli, R. S., V. R. Narra, V. Yaghmai, M. T. Azure, S. M. Goddu, R. W. Howell and D. V. Rao (1994). "Vitamins as radioprotectors in vivo. II. Protection by vitamin A and soybean oil against radiation damage caused by internal radionuclides." Radiat Res **139**(1): 115-122.
- Hargreaves, D. C. and G. R. Crabtree (2011). "ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms." Cell Res **21**(3): 396-420.
- Hediger, M. A., Y. Kanai, G. You and S. Nussberger (1995). "Mammalian ion-coupled solute transporters." The Journal of Physiology **482**(Suppl): 7S-17S.
- Hei, T. K., C. Q. Piao, T. Sutter, J. C. Willey and K. Suzuki (1996). "Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by high let radiation." Advances in Space Research **18**(1-2): 137-148.
- Hei, T. K., C. Q. Piao, J. C. Willey, S. Thomas and E. J. Hall (1994). "Malignant transformatin of human bronchial epithelial cells by radon-simulated α -particles." Carcinogenesis **15**(3): 431-437.

- Herz, H., D. R. Blake and M. Grootveld (1997). "Multicomponent Investigations of the Hydrogen Peroxide- and Hydroxyl Radical-Scavenging Antioxidant Capacities of Biofluids: The Roles of Endogenous Pyruvate and Lactate Relevance to Inflammatory Joint Diseases." Free Radical Research **26**(1): 19-35.
- Hill, M. A., C. S. Griffin, E. L. Pyke and D. L. Stevens (2011). "Chromosome aberration induction is dependent on the spatial distribution of energy deposition through a cell nucleus." Radiation Protection Dosimetry **143**(2-4): 172-176.
- Jakob, B., J. Splinter, S. Conrad, K.-O. Voss, D. Zink, M. Durante, M. Löbrich and G. Taucher-Scholz (2011). "DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin." Nucleic Acids Research **39**(15): 6489-6499.
- Jazayeri, A., A. Balestrini, E. Garner, J. E. Haber and V. Costanzo (2008). "Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity." EMBO J **27**(14): 1953-1962.
- Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, E. Kriehoff-Henning, B. Kunz, A. Penzkofer, K. Treml, K. Wittenberg, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke and U. Wolf (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010.
. Berlin, Robert Koch-Institut,
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. **9**: 1-150.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J **19**(21): 5720-5728.
- Karlić, R., H.-R. Chung, J. Lasserre, K. Vlahoviček and M. Vingron (2010). "Histone modification levels are predictive for gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(7): 2926-2931.
- Kennedy, A. R. and J. B. Little (1978). "Protease inhibitors suppress radiation-induced malignant transformation in vitro." Nature **276**(5690): 825-826.
- Kilburn, D. G., M. D. Lilly and F. C. Webb (1969). "The energetics of mammalian cell growth." J Cell Sci **4**(3): 645-654.
- Kim, J.-w., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza and C. V. Dang (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." Cell Metabolism **3**(3): 177-185.
- Kimura, H., R. D. Braun, E. T. Ong, R. Hsu, T. W. Secomb, D. Papahadjopoulos, K. Hong and M. W. Dewhirst (1996). "Fluctuations in Red Cell Flux in Tumor Microvessels Can Lead to Transient Hypoxia and Reoxygenation in Tumor Parenchyma." Cancer Research **56**(23): 5522-5528.

Kolobova, E., A. Tuganova, I. Boulatnikov and K. M. Popov (2001). "Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites." Biochemical Journal **358**: 69-77.

Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." Science **184**(4139): 868-871.

Korotchkina, L. G. and M. S. Patel (1995). "Mutagenesis Studies of the Phosphorylation Sites of Recombinant Human Pyruvate Dehydrogenase. SITE-SPECIFIC REGULATION." Journal of Biological Chemistry **270**(24): 14297-14304.

Korotchkina, L. G. and M. S. Patel (2001). "Site Specificity of Four Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzymes toward the Three Phosphorylation Sites of Human Pyruvate Dehydrogenase." Journal of Biological Chemistry **276**(40): 37223-37229.

Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, E. Sivridis, K. C. Gatter, A. L. Harris, Tumor and G. Angiogenesis Research (2005). "Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma." Neoplasia **7**(1): 1-6.

Koukourakis, M. I., G. Kyrias, S. Kakolyris, C. Kouroussis, C. Frangiadaki, A. Giatromanolaki, G. Retalis and V. Georgoulis (2000). "Subcutaneous Administration of Amifostine During Fractionated Radiotherapy: A Randomized Phase II Study." Journal of Clinical Oncology **18**(11): 2226-2233.

Kouvaris, J. R., V. E. Kouloulis and L. J. Vlahos (2007). "Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector." The Oncologist **12**(6): 738-747.

Kruhlak, M. J., A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W. G. Muller, J. G. McNally, D. P. Bazett-Jones and A. Nussenzweig (2006). "Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks." J Cell Biol **172**(6): 823-834.

Kurimasa, A., S. Kumano, N. V. Boubnov, M. D. Story, C. S. Tung, S. R. Peterson and D. J. Chen (1999). "Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining." Mol Cell Biol **19**(5): 3877-3884.

Lee, J. H. and T. T. Paull (2005). "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." Science **308**(5721): 551-554.

Lee, S. E., R. A. Mitchell, A. Cheng and E. A. Hendrickson (1997). "Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle." Molecular and Cellular Biology **17**(3): 1425-1433.

Linn, T. C., F. H. Pettit and L. J. Reed (1969). "Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **62**(1): 234-241.

Liu, S.-Z. (2010). "Biological effects of low level exposures to ionizing radiation: Theory and practice." Human & Experimental Toxicology **29**(4): 275-281.

- Loucas, B. D. and C. R. Geard (1994). "Kinetics of Chromosome Rejoining in Normal Human Fibroblasts after Exposure to Low- and High-LET Radiations." Radiation Research **138**(3): 352-360.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-260.
- Lunt, S. Y. and M. G. Vander Heiden (2011). "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 441-464.
- Luo, W., H. Hu, R. Chang, J. Zhong, M. Knabel, R. O'Meally, R. N. Cole, A. Pandey and G. L. Semenza (2011). "Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1." Cell **145**(5): 732-744.
- Ma, Y., H. Lu, B. Tippin, M. F. Goodman, N. Shimazaki, O. Koiwai, C. L. Hsieh, K. Schwarz and M. R. Lieber (2004). "A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining." Mol Cell **16**(5): 701-713.
- Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz and M. R. Lieber (2002). "Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination." Cell **108**(6): 781-794.
- Ma, Y., K. Schwarz and M. R. Lieber (2005). "The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps." DNA Repair **4**(7): 845-851.
- Mao, Z., M. Bozzella, A. Seluanov and V. Gorbunova (2008). "DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells." Cell Cycle **7**(18): 2902-2906.
- Matsuoka, S., M. Huang and S. J. Elledge (1998). "Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase." Science **282**(5395): 1893-1897.
- McFate, T., A. Mohyeldin, H. Lu, J. Thakar, J. Henriques, N. D. Halim, H. Wu, M. J. Schell, T. M. Tsang, O. Teahan, S. Zhou, J. A. Califano, N. H. Jeoung, R. A. Harris and A. Verma (2008). "Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity Controls Metabolic and Malignant Phenotype in Cancer Cells." Journal of Biological Chemistry **283**(33): 22700-22708.
- Meek, K., P. Douglas, X. Cui, Q. Ding and S. P. Lees-Miller (2007). "trans Autophosphorylation at DNA-Dependent Protein Kinase's Two Major Autophosphorylation Site Clusters Facilitates End Processing but Not End Joining." Molecular and Cellular Biology **27**(10): 3881-3890.
- Mishra, S. and A. W. Hamburger (1993). "O-Phospho-L-tyrosine Inhibits Cellular Growth by Activating Protein Tyrosine Phosphatases." Cancer Research **53**(3): 557-563.
- Mishra, S. and A. W. Hamburger (1996). "Association of inhibition of cell growth by O-phospho-L-tyrosine with decreased tyrosine phosphorylation." Cancer Lett **102**(1-2): 65-71.

Mognato, M., M. Grifalconi, S. Canova, C. Girardi and L. Celotti (2011). The DNA-Damage Response to Ionizing Radiation in Human Lymphocytes. Selected Topics in DNA Repair. D. o. B. University of Padua, InTech: 572.

Nagasawa, H., J. B. Little, Y.-F. Lin, S. So, A. Kurimasa, Y. Peng, J. R. Brogan, D. J. Chen, J. S. Bedford and B. P. C. Chen (2010). "Differential Role of DNA-PKcs Phosphorylations and Kinase Activity in Radiosensitivity and Chromosomal Instability." Radiation Research **175**(1): 83-89.

Naik, G. H., K. I. Priyadarsini, D. B. Naik, R. Gangabhairathi and H. Mohan (2004). "Studies on the aqueous extract of Terminalia chebula as a potent antioxidant and a probable radioprotector." Phytomedicine **11**(6): 530-538.

Nair, C. K., D. K. Parida and T. Nomura (2001). "Radioprotectors in radiotherapy." J Radiat Res **42**(1): 21-37.

Nair, V. D. and C. W. Olanow (2008). "Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3beta pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses." J Biol Chem **283**(22): 15469-15478.

Narra, V. R., R. S. Harapanhalli, R. W. Howell, K. S. Sastry and D. V. Rao (1994). "Vitamins as radioprotectors in vivo. I. Protection by vitamin C against internal radionuclides in mouse testes: implications to the mechanism of damage caused by the Auger effect." Radiat Res **137**(3): 394-399.

Neta, R., S. Douches and J. J. Oppenheim (1986). "Interleukin 1 is a radioprotector." The Journal of Immunology **136**(7): 2483-2485.

Nick McElhinny, S. A., J. M. Havener, M. Garcia-Diaz, R. Juarez, K. Bebenek, B. L. Kee, L. Blanco, T. A. Kunkel and D. A. Ramsden (2005). "A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining." Mol Cell **19**(3): 357-366.

Nick McElhinny, S. A., C. M. Snowden, J. McCarville and D. A. Ramsden (2000). "Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends." Molecular and Cellular Biology **20**(9): 2996-3003.

Niemantsverdriet, M., M.-J. van Goethem, R. Bron, W. Hogewerf, S. Brandenburg, J. A. Langendijk, P. van Luijk and R. P. Coppes (2012). "High and Low LET Radiation Differentially Induce Normal Tissue Damage Signals." International Journal of Radiation Oncology*Biophysics **83**(4): 1291-1297.

Niewolik, D., U. Pannicke, H. Lu, Y. Ma, L.-C. V. Wang, P. Kulesza, E. Zandi, M. R. Lieber and K. Schwarz (2006). "DNA-PKcs Dependence of Artemis Endonucleolytic Activity, Differences between Hairpins and 5' or 3' Overhangs." Journal of Biological Chemistry **281**(45): 33900-33909.

Noma, K.-i., C. D. Allis and S. I. S. Grewal (2001). "Transitions in Distinct Histone H3 Methylation Patterns at the Heterochromatin Domain Boundaries." Science **293**(5532): 1150-1155.

Nowak, S. J. and V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." Trends in genetics : TIG **20**(4): 214-220.

Obe, G., C. Johannes and S. Ritter (2010). "The number and not the molecular structure of DNA double-strand breaks is more important for the formation of chromosomal aberrations: a hypothesis." Mutat Res **701**(1): 3-11.

Olson, A. L. and J. E. Pessin (1996). "Structure, Function, and Regulation of the Mammalian Facilitative Glucose Transporter Gene Family." Annual Review of Nutrition **16**(1): 235-256.

Paasch, A. (2014). Untersuchungen zur Wirkungsweise des Radioprotektor O-Phospho-L-Tyrosin auf die Zellreparatur und den Metabolismus der Zelle. Dr. rer. nat., Eberhard Karls Universität Tübingen.

Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert and W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Current Biology **10**(15): 886-895.

Pelicano, H., D. S. Martin, R. H. Xu and P. Huang (2006). "Glycolysis inhibition for anticancer treatment." Oncogene **25**(34): 4633-4646.

Pellegrini, L., D. S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T. L. Blundell and A. R. Venkitaraman (2002). "Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex." Nature **420**(6913): 287-293.

Peng, J. C. and G. H. Karpen (2008). "Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability." Curr Opin Genet Dev **18**(2): 204-211.

Pieri, C., M. Marra, F. Moroni, R. Recchioni and F. Marcheselli (1994). "Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E." Life Sciences **55**(15): PL271-PL276.

Pinto, M., K. M. Prise and B. D. Michael (2005). "Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics." Radiat Res **164**(1): 73-85.

Planel, H., J. P. Soleilhavoup, R. Tixador, G. Richoilley, A. Conter, F. Croue, C. Caratero and Y. Gaubin (1987). "Influence on Cell-Proliferation of Background-Radiation or Exposure to Very Low, Chronic Gamma-Radiation." Health Physics **52**(5): 571-578.

Pujol, J. L., D. J. Gibney, J. Q. Su, A. W. Maksymiuk and J. R. Jett (1993). "Immune response induced in small-cell lung cancer by maintenance therapy with interferon gamma." J Natl Cancer Inst **85**(22): 1844-1850.

Quennet, V., A. Yaromina, D. Zips, A. Rosner, S. Walenta, M. Baumann and W. Mueller-Klieser (2006). "Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice." Radiotherapy and Oncology **81**(2): 130-135.

- Raichur, S., S. Hooi Teh, K. Ohwaki, V. Gaur, Y. Chau Long, M. Hargreaves, S. L. McGee and J. Kusunoki (2012). "Histone deacetylase 5 regulates glucose uptake and insulin action in muscle cells." Journal of Molecular Endocrinology **49**(3): 203-211.
- Ren, J., L. R. Bollu, F. Su, G. Gao, L. Xu, W.-C. Huang, M.-C. Hung and Z. Weihua (2013). "EGFR–SGLT1 interaction does not respond to EGFR modulators, but inhibition of SGLT1 sensitizes prostate cancer cells to EGFR tyrosine kinase inhibitors." The Prostate **73**(13): 1453-1461.
- Roberts, S. A., N. Strande, M. D. Burkhalter, C. Strom, J. M. Havener, P. Hasty and D. A. Ramsden (2010). "Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends." Nature **464**(7292): 1214-1217.
- Rodemann, H. P., K. Dittmann and M. Toulany (2007). "Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair." International Journal of Radiation Biology **83**(11-12): 781-791.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner (1998). "DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." Journal of Biological Chemistry **273**(10): 5858-5868.
- Rolfe, D. F. and G. C. Brown (1997). "Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals." Physiol Rev **77**(3): 731-758.
- Rubbi, C. P. and J. Milner (2003). "p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage." EMBO J **22**(4): 975-986.
- Rydberg, B. (1996). "Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II. Experimental detection." Radiat Res **145**(2): 200-209.
- Sagowski, C., S. Wenzel, B. Neumann, W. Kehrl, F. Zywietz, K. Roeser and J. Ußmüller (2002). "Radioprotektive Wirksamkeit von Amifostin auf die Speicheldrüsen der Ratte unter fraktionierter Bestrahlung." HNO **50**(2): 139-145.
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas and S. P. Jackson (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." Nature **450**(7169): 509-514.
- Sattler, U. G. A., S. S. Meyer, V. Quennet, C. Hoerner, H. Knoerzer, C. Fabian, A. Yaromina, D. Zips, S. Walenta, M. Baumann and W. Mueller-Klieser (2010). "Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation." Radiotherapy and Oncology **94**(1): 102-109.
- Semenenko, V. A. and R. D. Stewart (2004). "A Fast Monte Carlo Algorithm to Simulate the Spectrum of DNA Damages Formed by Ionizing Radiation." Radiation Research **161**(4): 451-457.
- Sert, C., M. S. Çelik, Z. Akdag, M. A. Ketani and Y. Nergiz (2000). "The Radioprotective Effect of Vitamins C, E and Vitamin E+ Glutathione on the Small Intestine and the Thyroid Gland in Rats Irradiated with X-Rays."

- Seymour, C. B. and C. Mothersill (1981). "The Effect of Lactate on the Radiation Response of CHO-K1 Cells in Culture." International Journal of Radiation Biology **40**(3): 283-291.
- Sharan, S. K., M. Morimatsu, U. Albrecht, D. S. Lim, E. Regel, C. Dinh, A. Sands, G. Eichele, P. Hasty and A. Bradley (1997). "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." Nature **386**(6627): 804-810.
- Simon, M., J. A. North, J. C. Shimko, R. A. Forties, M. B. Ferdinand, M. Manohar, M. Zhang, R. Fishel, J. J. Ottesen and M. G. Poirier (2011). "Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(31): 12711-12716.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Löbrich and P. A. Jeggo (2004). "ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation." Cancer Research **64**(7): 2390-2396.
- Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes and B. D. Price (2005). "A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(37): 13182-13187.
- Sung, P. and H. Klein (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 739-750.
- Takata, H., T. Hanafusa, T. Mori, M. Shimura, Y. Iida, K. Ishikawa, K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa and K. Maeshima (2013). "Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage." PLoS ONE **8**(10): e75622.
- Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno and E. Kominami (2005). "Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy." Autophagy **1**(2): 84-91.
- Taverna, S. D., H. Li, A. J. Ruthenburg, C. D. Allis and D. J. Patel (2007). "How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 1025-1040.
- Tommasino, F., T. Friedrich, U. Scholz, G. Taucher-Scholz, M. Durante and M. Scholz (2013). "A DNA Double-Strand Break Kinetic Rejoining Model Based on the Local Effect Model." Radiation Research **180**(5): 524-538.
- Toulany, M., R. Kehlbach, U. Florczak, A. Sak, S. Wang, J. Chen, M. Lobrich and H. P. Rodemann (2008). "Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair." Molecular Cancer Therapeutics **7**(7): 1772-1781.
- Toulany, M., K.-J. Lee, K. R. Fattah, Y.-F. Lin, B. Fehrenbacher, M. Schaller, B. P. Chen, D. J. Chen and H. P. Rodemann (2012). "Akt Promotes Post-Irradiation Survival of Human Tumor Cells through Initiation, Progression, and Termination of DNA-PKcs-Dependent DNA Double-Strand Break Repair." Molecular Cancer Research **10**(7): 945-957.

- Travis, E. L. (1984). "The oxygen dependence of protection by aminothiols: Implications for normal tissues and solid tumors." International Journal of Radiation Oncology*Biophysics **10**(9): 1495-1501.
- Tsao, D., P. Kalogerinis, I. Tabrizi, M. Dingfelder, R. D. Stewart and A. G. Georgakilas (2007). "Induction and Processing of Oxidative Clustered DNA Lesions in 56Fe-Ion-Irradiated Human Monocytes." Radiation Research **168**(1): 87-97.
- Vacha, P., F. Fehlaue, B. Mahlmann, M. Marx, A. Hinke, K. Sommer, E. Richter and T. Feyerabend (2003). "Randomized Phase III Trial of Postoperative Radiochemotherapy ± Amifostine in Head and Neck Cancer." Strahlentherapie und Onkologie **179**(6): 385-389.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley and C. B. Thompson (2009). "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.
- Vander Heiden, M. G., D. R. Plas, J. C. Rathmell, C. J. Fox, M. H. Harris and C. B. Thompson (2001). "Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism." Mol Cell Biol **21**(17): 5899-5912.
- Vijayalaxmi, R. J. Reiter, M. L. Meltz and T. S. Herman (1998). "Melatonin: possible mechanisms involved in its 'radioprotective' effect." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **404**(1-2): 187-189.
- Wang, H., M. Wang, H. Wang, W. Böcker and G. Iliakis (2005). "Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors." Journal of Cellular Physiology **202**(2): 492-502.
- Wang, M., W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang and G. Iliakis (2006). "PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways." Nucleic Acids Res **34**(21): 6170-6182.
- Wanner, G., C. Mayer, R. Kehlbach, H. P. Rodemann and K. Dittmann (2008). "Activation of protein kinase C ϵ stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation." Radiotherapy and Oncology **86**(3): 383-390.
- Warburg, O. (1956). "On the Origin of Cancer Cells." Science **Vol. 123**(No. 3191): 309-314.
- Ward, I. M. and J. Chen (2001). "Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress." Journal of Biological Chemistry **276**(51): 47759-47762.
- Watanabe, M., N. Abe, Y. Oshikiri, E. J. Stanbridge and T. Kitagawa (2012). "Selective growth inhibition by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in tumorigenic HeLa hybrid cells is mediated through NF-[kappa]B-dependent GLUT3 expression." Oncogenesis **1**: e21.
- Weihua, Z., R. Tsan, W.-C. Huang, Q. Wu, C.-H. Chiu, I. J. Fidler and M.-C. Hung (2008). "Survival of Cancer Cells Is Maintained by EGFR Independent of Its Kinase Activity." Cancer Cell **13**(5): 385-393.

West, R. B., M. Yaneva and M. R. Lieber (1998). "Productive and Nonproductive Complexes of Ku and DNA-Dependent Protein Kinase at DNA Termini." Molecular and Cellular Biology **18**(10): 5908-5920.

Whitfield, J. F., H. Brohee and T. Youdale (1965). "The effects of X-radiation on lactate metabolism of mammalian cells." Experimental Cell Research **37**(3): 637-649.

Williams, R. S., J. S. Williams and J. A. Tainer (2007). "Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template." Biochem Cell Biol **85**(4): 509-520.

Woloschak, G. E. and C.-M. Chang-Liu (1990). "Differential Modulation of Specific Gene Expression Following High- and Low-LET Radiations." Radiation Research **124**(2): 183-187.

Wu, J., Q. Fu, Y. Quan, W. Wang, T. Mei, J. Li, G. Yang, X. Ren, J. Xue and Y. Wang (2012). "Repair rates of DNA double-strand breaks under different doses of proton and γ -ray irradiation." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms **276**(0): 1-6.

Wu, J. I. (2012). "Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer." Acta Biochimica et Biophysica Sinica **44**(1): 54-69.

Xu, Y., K. Parmar, F. Du, B. D. Price and Y. Sun (2011). "The radioprotective agent WR1065 protects cells from radiation damage by regulating the activity of the Tip60 acetyltransferase." Int J Biochem Mol Biol **2**(4): 295-302.

Yang, W., Y. Xia, D. Hawke, X. Li, J. Liang, D. Xing, K. Aldape, T. Hunter, W. K. Alfred Yung and Z. Lu (2012). "PKM2 Phosphorylates Histone H3 and Promotes Gene Transcription and Tumorigenesis." Cell **150**(4): 685-696.

Yang, W., Y. Xia, H. Ji, Y. Zheng, J. Liang, W. Huang, X. Gao, K. Aldape and Z. Lu (2011). "Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation." Nature **480**(7375): 118-122.

Yang, W., Y. Zheng, Y. Xia, H. Ji, X. Chen, F. Guo, C. A. Lyssiotis, K. Aldape, L. C. Cantley and Z. Lu (2012). "ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect." Nat Cell Biol **14**(12): 1295-1304.

Yano, K., K. Morotomi-Yano, S. Y. Wang, N. Uematsu, K. J. Lee, A. Asaithamby, E. Weterings and D. J. Chen (2008). "Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks." EMBO Rep **9**(1): 91-96.

Yavelow, J., M. Collins, Y. Birk, W. Troll and A. R. Kennedy (1985). "Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(16): 5395-5399.

Yavelow, J., T. H. Finlay, A. R. Kennedy and W. Troll (1983). "Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen." Cancer Res **43**(5 Suppl): 2454s-2459s.

Yoo, S. and W. S. Dynan (1999). "Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: Recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein." Nucleic Acids Research **27**(24): 4679-4686.

Yuhas, J. M. and J. B. Storer (1969). "Differential Chemoprotection of Normal and Malignant Tissues." Journal of the National Cancer Institute **42**(2): 331-335.

Yun, M. H. and K. Hiom (2009). "CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle." Nature **459**(7245): 460-463.

Zhu, Y., S. Massen, M. Terenzio, V. Lang, S. Chen-Lindner, R. Eils, I. Novak, I. Dikic, A. Hamacher-Brady and N. R. Brady (2013). "Modulation of Serines 17 and 24 in the LC3-interacting Region of Bnip3 Determines Pro-survival Mitophagy versus Apoptosis." Journal of Biological Chemistry **288**(2): 1099-1113.

Zorov, D. B., M. Juhaszova and S. J. Sollott (2006). "Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1757**(5-6): 509-517.