



Fakultät für Medizin

Wechselwirkungen der basalen und strahleninduzierten Hsp70-Expression mit Cripto-1-abhängigen
Signaltransduktionswegen

Sarah Susann Hofer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
2. Prof. Dr. Stephanie E. Combs

Die Dissertation wurde am 30.01.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 03.01.2018 angenommen.

INHALT

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Strahlentherapie	1
1.2 Hitzeschockproteine	3
1.3 Stressinduzierbares Hsp70.....	4
1.4 Hsp70 und maligne Tumoren	5
1.4.1 Zytoplasmatisches Hsp70	5
1.4.2 Membranständiges und extrazelluläres Hsp70	6
1.5 Cripto-1-assoziierte Signalwege und Proteine	8
1.5.1 GRP78 - ein verbindendes Element von HSPs und Cripto-1	9
1.5.2 Interaktionen von Cripto-1 mit Proteinen der TGF β -Familie	10
1.5.2.1 Die TGF β -Superfamilie	10
1.5.2.2 Der Nodal-Signalweg.....	12
1.5.2.3 TGF β -1 und Aktivine.....	12
1.5.2.4 SMADs.....	13
1.5.2.5 Die Bedeutung von TGF β für maligne Tumoren.....	15
1.5.3 Weitere Einflüsse von Cripto-1	16
1.5.3.1 Glypikan-1-abhängige Wirkung von Cripto-1	16
1.5.3.2 PI3K/Akt	17
1.6 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Software, Chemikalien, Geräte und sonstige Materialien	19
2.1.2 Materialien für die Zellkultur	21

2.1.3	Materialien für die Durchflusszytometrie (FACS).....	22
2.1.4	Materialien für Proteinbestimmungen.....	23
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Zelllinien und Kulturbedingungen.....	27
2.2.2	Bestrahlen der Zellen.....	29
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	29
2.2.4	Western Blots und Vorbereitungen.....	30
2.2.4.1	Isolierung zytoplasmatischer Proteine.....	30
2.2.4.2	Gelelektrophorese.....	31
2.2.4.3	Western Blot (elektrophoretischer Proteintransfer).....	34
2.2.4.4	Immunchemischer Nachweis.....	34
2.2.4.5	Auswertung der Western Blots.....	36
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Basale mHsp70-Expression.....	39
3.2	Strahleninduzierte Veränderungen des mHsp70+ Anteils.....	40
3.3	Western Blots.....	41
3.3.1	Festlegung eines Grenzwerts für Mittelwertvergleiche.....	41
3.3.2	Vergleich der basalen Proteingehalte der beiden Subzelllinien.....	43
3.3.3	Strahleninduzierte Veränderungen des Proteingehalts.....	43
3.3.3.1	Zytosolisches Hsp70.....	44
3.3.3.2	Proteine Cripto-1-abhängiger Signalwege.....	45
3.3.3.2.1	GRP78.....	46
3.3.3.2.2	SMAD2/3.....	47
3.3.3.2.3	SMAD4.....	48
3.3.3.2.4	PI3K.....	49
3.3.3.2.5	Akt.....	50
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51

4	Diskussion	52
4.1	Basale und strahleninduzierte mHsp70-Expression	52
4.2	Proteinbestimmungen	53
4.2.1	Hsp70.....	53
4.2.2	GRP78	56
4.2.3	SMAD2/3 und -4	59
4.2.4	PI3K und Akt.....	62
4.3	Abschließende Diskussion.....	66
4.3.1	Freigesetztes eHsp70 als resistenzvermittelnde Komponente.....	67
4.3.2	EHsp70-unabhängige Unterschiede zwischen den Subzelllinien.....	71
4.3.2.1	Akt-abhängige verstärkte Stressantwort in CX+ Zellen	71
4.3.2.2	Akt-unabhängige verstärkte Stressantwort in CX+ Zellen	72
4.4	Ausblick.....	74
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
5 %-BZM	B-Zell-Medium mit 5 % fetalem Kälberserum
A(Hsp70)	Im Western Blot beobachtete relative Abweichung der Expression von zytosolischem Hsp70 zwischen den scheinbestrahlten Subzelllinien
A1	Ausgangspunkt 1
A2	Ausgangspunkt 2
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B (PKB)
ALK	<i>Aktivin receptor like kinase</i>
APS	Ammonium-Persulfat
Art.nr.	Artikelnummer
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia and Rad3 related</i>
Best.nr.	Bestellnummer
Bestr.	Bestrahlt
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase
DDR	<i>DNA-damage response</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure (DNA)
eHsp70	Extrazelluläres Hsp70
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> /Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>
Hsc70	Konstitutiv exprimiertes HSP70
HSF1	<i>Heat shock factor protein 1</i>
HSP70	Protein der HSP70-Familie
Hsp70	Stressinduzierbares Hsp70
IRIF	<i>Ionizing radiation induced foci</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mHsp70	Membranständiges/zellmembrangebundenes Hsp70
mHsp70+	mHsp70 positiv
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS-Tween
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat

Abkürzung	Bedeutung
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sGRP78	Membranständiges GRP78
SMAD	<i>Small body size mothers against decapentaplegic homolog</i>
SMURF	<i>SMAD ubiquitin regulatory factor</i>
T25-ZKF	Zellkulturflasche mit 25cm ³ Zelladhäsionsfläche
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Unbestr.	Unbestrahlt/scheinbestrahlt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZKM	Zellkulturmedium

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Phasen des Zellzyklus	2
Abb. 2: Regulation des Zellzyklus nach Bestrahlung.....	2
Abb. 3: TGF β -abhängige Signalwege	11
Abb. 4: Wirkung von Cripto-1 auf TGF β -abhängige Signalwege	13
Abb. 5: Cripto-1 als Ligand von Glypikan-1	16
Abb. 6: Beispiel einer Gelbeladung mit Proben und Positivkontrollen	33
Abb. 7: Unterschiede in der basalen mHsp70 Expression in den unbestrahlten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ am Tag der Bestrahlung.....	39
Abb. 8: Anteil mHsp70+ Zellen in den Subzelllinien CX- und CX+ 24 h nach Bestrahlung oder Scheinbestrahlung	40
Abb. 9: Western Blot: Proteinbestimmungen von Hsp70 in scheinbestrahlten und bestrahlten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+	44
Abb. 10: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von GRP78.....	46
Abb. 11: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von SMAD2/3.....	47
Abb. 12: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von SMAD4.....	48
Abb. 13: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von PI3K	49
Abb. 14: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von Akt.....	50
Abb. 15: Zusammenfassung der strahleninduzierten Veränderungen der Proteinexpressionen.....	51
Abb. 16: Schematische Darstellung der Lokalisation von strahleninduziert vermehrt synthetisiertem Hsp70 in Zellen der Subzelllinie CX-.....	55
Abb. 17: Schematische Darstellung der Lokalisation von strahleninduziert vermehrt synthetisiertem Hsp70 in Zellen der Subzelllinie CX+	55
Abb. 18: Übersicht über Wechselwirkungen von GRP78, PI3K/Akt und TGF β -Signalwegen	64
Abb. 19: Interaktionen beobachteter Proteine und Ergebnisse von Proteinbestimmungen in Zellen der Subzelllinie CX-.....	73
Abb. 20: Interaktionen beobachteter Proteine und Ergebnisse von Proteinbestimmungen in Zellen der Subzelllinie CX+.....	73

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Software	19
Tab. 2: Wiederholt verwendete Chemikalien und Geräte	19
Tab. 3: Wiederholt verwendete Materialien	20
Tab. 4: Wiederholt verwendete Geräte	20
Tab. 5: Chemikalien für die Zellkultur	21
Tab. 6: Materialien für Zellkultur (Pipettier-Zubehör und Chemikalien ausgenommen)	22
Tab. 7: Chemikalien, Antikörper, Materialien und Geräte für FACS-Analysen.....	22
Tab. 8: Für Proteinisolation und -bestimmung verwendete Chemikalien und Geräte ...	23
Tab. 9: Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte für Gelelektrophoresen und Western Blots	23
Tab. 10: In der Gelelektrophorese eingesetzte Proteine	25
Tab. 11: In der Gelelektrophorese als Positivkontrollen eingesetzte Proteinlysate	25
Tab. 12: Verwendete Antikörper für die Proteinnachweise	26
Tab. 13: Zusammensetzungen der Puffer für die Gele der SDS-PAGE.....	32
Tab. 14: Zusammensetzungen von Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE.....	32
Tab. 15: Zusammensetzung des Proben- und Laufpuffers für die SDS-PAGE	33
Tab. 16: Durchgeführte Vergleiche der Proteinexpressionen	37
Tab. 17: Gehalt an zytosolischem Hsp70 in scheinbestrahlten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+	42
Tab. 18: Vergleich der Proteinexpressionen durch den Vergleich von Mittelwerten, für die Fälle, in denen keine statistischen Trends oder Signifikanzen ermittelt werden konnten.	42
Tab. 19: Vergleich der basalen Proteinexpressionen der Subzelllinien CX- und CX+..	43

1 EINLEITUNG

1.1 STRAHLENTHERAPIE

In der Therapie vieler maligner Tumoren bildet die Strahlentherapie, alleine oder in Kombination mit Chirurgie und Chemotherapie, eine entscheidende Säule. Sie wird dabei meist gut toleriert und führt zu einer hohen lokalen Tumorkontrolle (Frey et al., 2012; Zimmermann et al., 2006). Ionisierende Strahlung schädigt die Desoxyribonukleinsäure (DNS), entweder durch direkten Angriff auf diese oder indirekt über die Produktion von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Bei der Einwirkung von Photonen durch γ - oder Röntgenstrahlung steht die indirekte DNS-Schädigung im Vordergrund.

Um sich vor den Folgen der Bestrahlung zu schützen, können Zellen nach dem Auftreten von DNS-Schäden die sogenannte „*DNA-damage response*“ (DDR) aktivieren (Zhou & Elledge, 2000). Dabei kommt insbesondere den *DNA-damage checkpoints*, einem Netzwerk interagierender Signalwege, eine besondere Bedeutung zu. Eine Schlüsselposition in den *DNA-damage checkpoints* hat dabei die *Ataxia teleangiectasia mutated protein-kinase* (ATM) inne. Die ATM ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche der Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) ähnlich ist und in einem umfangreichen DDR-Signalnetzwerk vermittelt (Savitsky et al., 1995). Durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und die damit einhergehenden DNS-Doppelstrangbrüche wird die Kinase aktiviert (Li, L., Story & Legerski, 2001; Shiloh & Ziv, 2013). Sie ist ein entscheidendes signalisierendes Protein und phosphoryliert Schlüsselproteine der DNS-Reparatur, Apoptose und des Zellzyklusarrests. Insbesondere koordiniert sie den Zellzyklusarrest mit der DNS-Reparatur (Ciccia & Elledge, 2010). Eine ungenügende Anwesenheit oder Aktivierung der Kinase führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Bestrahlung (Shiloh & Ziv, 2013).

Der Zellzyklus beginnt nach der Teilung einer Zelle, welche in der Mitose-Phase (M) stattfindet. Die auf die M-Phase folgende Interphase ist die Abfolge der postmitotischen G1-Phase, der Synthese-Phase (S, hier findet die Verdopplung der DNS im Zellkern statt) und der postsynthetischen beziehungsweise (bzw.) prämitotischen G2-Phase. Sollen sich Zellen nicht weiter vermehren, treten sie von der G1- in die G0-Phase ein. Der Ablauf des Zellzyklus ist in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt.

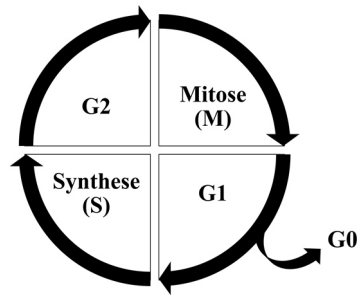


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Phasen des Zellzyklus. G1-, S- und G2-Phase bilden die Interphase, an welche sich die Mitose-Phase (M) anschließt.

Nach Einwirkung ionisierender Strahlung werden die Kinasen ATM und ATR aktiviert und darüber der Zellzyklusprogress reguliert (Abb. 2). Der Übertritt von der G1- in die S-Phase wird dabei wesentlich über die Akkumulation des Tumorsuppressors p53 bestimmt. Diese führt zur transkriptionellen Induktion des Proteins p21. Bindet dieses in der G1-Phase des Zellzyklus an Komplexe von Zyklin E/Cdk2 (Zyklin-abhängige Kinase 2), werden diese in ihrer Aktivität gehemmt. Dies verhindert, dass die Zelle nach dem Auftreten von DNS-Schäden von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus übertritt. Der Progress von der G2- in die M-Phase wird durch die ATM- und ATR-abhängige Phosphorylierung (Aktivierung) der *Checkpoint*-Proteine Chk1 und Chk2 beeinflusst. Die aktivierten Proteine Chk1 und Chk2 phosphorylieren Cdc25C, eine mitose-fördernde Phosphatase. Phosphoryliert kann diese nicht mehr in den Nukleus eintreten und dadurch die Zyklin-abhängige Kinase Cdk1 nicht dephosphorylieren. Da der Progress des Zellzyklus in die M-Phase nur möglich ist, wenn Cdk1 dephosphoryliert vorliegt, kann dieser nach der Aktivierung von Chk1 und Chk2 durch ATM und ATR nicht ablaufen.

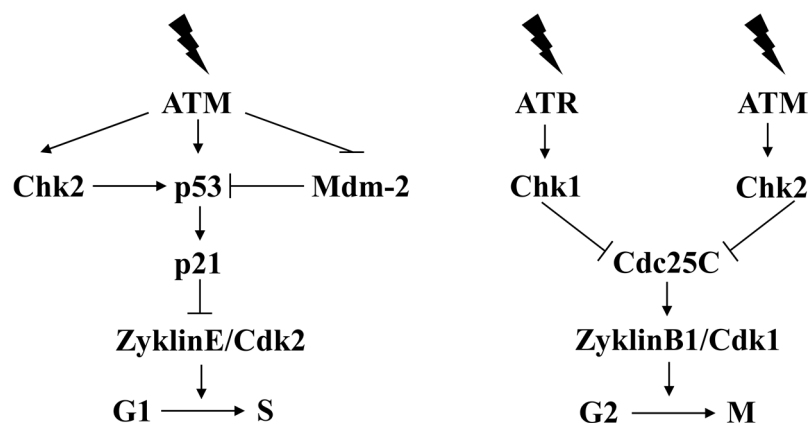


Abb. 2: Regulation des Zellzyklus nach Bestrahlung. Nach Einwirkung ionisierender Strahlung werden die Kinasen ATM und ATR aktiviert und darüber der Zellzyklusprogress reguliert.

Nach der Einwirkung von ionisierender Bestrahlung fallen außerdem vermehrt fehlgefaltete Proteine an. Um die Zelle vor diesem proteotoxischen Stress zu schützen, werden nach Bestrahlung vermehrt Hitzeschockproteine (HSPs) synthetisiert und ihre Aktivität gesteigert (Calini, Urani & Camatini, 2003; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Diese Gruppe von Proteinen, insbesondere das stressinduzierbare Hsp70, soll in dieser Arbeit im Fokus stehen.

1.2 HITZESCHOCKPROTEINE

Hitzeschockproteine (HSPs) sind eine Gruppe hochkonservierter Proteine, deren Expression durch verschiedene Formen von Zellstress induziert wird. Ihre Anwesenheit trägt entscheidend dazu bei, dass sich eine Zelle nach Stresseinwirkung von diesem erholen kann sowie gegenüber zukünftiger Stresseinwirkung resistenter wird (De Maio, 2011). In Säugern erfolgt die Unterteilung der HSPs anhand ihres Molekulargewichts in Familien: Die HSP70-Superfamilie, welche aus der HSP70-Familie im engeren Sinne (HSPA) und HSP110 (HSPH) besteht, die Familie der HSP40 (DNAJ), kleine HSPs (HSPB), die Gruppe der HSP90 (HSPC) sowie die Familie der Chaperonine, denen unter anderem HSP60/HSP10 (HSPD/E) und TRIC (CCT) angehören (Kampinga et al., 2009). Die Familien bestehen aus Mitgliedern, die entweder konstitutiv exprimiert oder induktiv reguliert werden und außerdem in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Daugaard, Rohde & Jaattela, 2007; Schmitt, Gehrman, Brunet, Multhoff & Garrido, 2007).

Die meisten HSPs weisen einen starken zytoprotektiven Effekt auf. Neben Funktionen, welche vor allem unter Stressbedingungen an Bedeutung gewinnen, haben die meisten HSPs auch essentielle Rollen in Bereichen des regulären Zellhaushalts inne. Die Hauptaufgabe der Proteine ist dabei das Sicherstellen einer korrekten Faltung nativer oder falsch gefalteter Proteine sowie das Verhindern einer Aggregation dieser während der Proliferation und Zelldifferenzierung (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Jaattela & Wissing, 1992; Lindquist & Craig, 1988; Mayer & Bukau, 2005; Parsell & Lindquist, 1993). Darüber hinaus gehört der Transport von Proteinen zwischen Organellen und subzellulären Kompartimenten, das Auflösen von Proteinkomplexen, die Enthüllung Clathrin-bedeckter Vesikel sowie die Kontrolle von regulatorischen Proteinen zu den Aufgaben dieser Chaperone (Daugaard et al., 2007; Hartl, 1996; Murphy, 2013).

Die wohl am genauesten untersuchte Gruppe der HSPs ist die Familie der Hitzeschockproteine 70 (HSP70), welche aus Protein-Isoformen von 66-78 kDa besteht. Es existieren mindestens acht humane Isoformen der HSP70-Familie, welche alle eine hohe genetische Homologie aufweisen, sich in ihrer zellulären Lokalisation, Funktion und der Fähigkeit zur Induzierbarkeit jedoch unterscheiden. Zur HSP70-Familie gehören das stark stressinduzierbare Hsp70 (auch Hsp72 oder Hsp70i genannt), das konstitutiv exprimierte Hsc70 (*Heat shock cognate protein 70*, auch Hsp73 genannt) und auch GRP78 (*Glucose-regulated protein 78*, auch BiP oder HSPA5 genannt), welches vor allem im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist (De Maio, 2014; Jaattela, 1999b; Murphy, 2013; Niforou, Cheimonidou & Trougakos, 2014; Tavarria, Gabriele, Kola & Anderson, 1996).

1.3 STRESSINDUZIERBARES HSP70

In seiner Funktion als Chaperon schützt Hsp70 die Zelle gegenüber proteotoxischen Stress-Stimuli wie Hitze, Hypoxie, oxidativem Stress, Schwermetallen und zytostatischen Faktoren wie ionisierender Strahlung (Daugaard et al., 2007; Murphy, 2013; Schmid & Multhoff, 2012). Dazu bindet das Protein an freiliegende hydrophobe Reste von stressexponierten, ungefalteten, denaturierten oder falsch gefalteten Proteinen, hält sie in einem intermediären Zustand und verhindert so deren Aggregation. Hsp70 kann auch, ATP-abhängig, fehlgefaltete Proteine direkt entfalten oder sie dem Abbau zuführen (Murphy, 2013).

Hsp70 ist eine ATPase, welche aus zwei Hauptdomänen besteht: Einer N-terminalen Adenosin-Nukleotid-Bindestelle (ATPase-Domäne, NBD) und einer C-terminalen Substrat-Bindedomäne (SBD), über welche eine Bindung an hydrophobe Aminosäuren von Peptiden erfolgen kann. Außerdem befindet sich C-terminal eine ca. 10 kDa große, α -helikale Struktur, welche für die Vermittlung von Interaktionen mit Co-Chaperonen von Bedeutung ist (Murphy, 2013). Die Wirkung von Hsp70 (wie auch von Hsc70) ist stark von den Ko-Chaperonen HSP40, HSP60, HSP90 oder anderen HSP-interagierenden Proteinen wie HOP oder Chip abhängig (Kelley, 1999).

Unter Bedingungen ohne Zellstress ist die (basale) Expression von Hsp70 in nicht transformierten Zellen gering. Maximale Werte werden in der S- und G1-Phase beobachtet (Milarski & Morimoto, 1986; Taira, Narita, Iguchi-Arigo & Ariga, 1997). Die basale Expression wird durch eine TATA-Box, zwei CCAAT-Boxen, ein *Serum-response-element*, ein *Metall-response-element* und Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, c-

MYC und Foxa1 in der Promotorregion kontrolliert (Morgan, 1989; Morgan et al., 1987; Wu, B. J., Kingston & Morimoto, 1986). In einer Zelle, die keinem Zellstress ausgesetzt ist, wird der Hsp70-Promotor mit einer pausierten RNA-Polymerase II in einem inaktiven, aber schnell aktivierbaren Zustand gehalten (Mason & Lis, 1997). Das *Heat shock factor protein 1* (HSF1), ein Transkriptionsfaktor, befindet sich in diesem Zustand im Zytosol in einem inaktiven Komplex gebunden, mehrheitlich als Monomer mit HSP90 und Hsp70 (Akerfelt, Morimoto & Sistonen, 2010). Nach der Einwirkung von Zellstress fallen vermehrt fehlgefaltete Proteine an, welche unter anderem Bindungen mit HSP90 eingehen. Dies entlässt das Protein HSF1 aus dem Komplex mit HSP90 und ermöglicht ihm, zum Nukleus zu translozieren, wo HSF1 trimerisiert und in der Promotorregion von *Hsp70* an hitzeresponsive Bindeelemente (HSEs) bindet (Akerfelt et al., 2010). Diese Bindung veranlasst, dass die RNA-Polymerase II aus dem pausierten Präinitiationskomplex entlassen wird und die Elongation beginnen kann (Horvath, Multhoff, Sonnleitner & Vigh, 2008; Mason & Lis, 1997; Morimoto, 1998; Murphy, 2013). Die Expression von zytosolischem, stressinduzierbarem Hsp70 kann durch diesen Mechanismus nach Einwirkung von proteotoxischem Stress (wie ionisierender Strahlung) schnell und massiv gesteigert werden (Calini et al., 2003; Daugaard et al., 2007; Murphy, 2013). Ein negativer Feedback-Mechanismus terminiert die vermehrte Hsp70-Produktion, indem das entstandene Hsp70 Komplexe mit HSF1 eingeht und den Transkriptionsfaktor somit von der Translokation in den Zellkern abhält (Shi, Mosser & Morimoto, 1998).

1.4 HSP70 UND MALIGNEN TUMOREN

1.4.1 Zytoplasmatisches Hsp70

Bereits in den 1990er Jahren wurde festgestellt, dass manche Tumoren eine stark erhöhte Hsp70-Expression aufweisen (Ciocca, Arrigo & Calderwood, 2013; Ferrarini, Heltai, Zocchi & Rugarli, 1992). Während zunächst davon ausgegangen wurde, dass dies Folge der kontinuierlich vermehrten Stressexposition (wie Hypoxie, Nährstoffrestriktion und saurem Milieu) von Tumorzellen sei, ist durch neuere Erkenntnisse davon auszugehen, dass die erhöhten Hsp70-Level nicht nur durch kontinuierlichen Zellstress begründbar sind, sondern dass Tumorzellen, anders als normale Zellen, zum Überleben und Wachsen unbedingt auf Hsp70 angewiesen sind (Gabai, Yaglom, Waldman & Sherman, 2009; Murphy, 2013; Nylandsted et al., 2000; Nylandsted et al., 2002; Powers et al., 2010). Die

genaue Ursache der erhöhten Hsp70-Expressionen in Tumorzellen ist nach wie vor unklar (Ciocca et al., 2013).

In vielen Tumoren, in denen gesteigerte Hsp70-Mengen zu finden sind, korrelieren diese direkt mit einer erhöhten Malignität. Darüber hinaus erweisen sie sich überproportional häufig als therapierefraktär, während die Herabregulation von Hsp70 in diesen Krebszellen Zelldifferenzierung und Zelltod induziert (Ciocca & Calderwood, 2005; Nylandsted et al., 2000). Die Frage, ob Hsp70 auch ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt ist, ist letztendlich nicht geklärt, Hinweise darauf liegen jedoch vor (Sherman & Gabai, 2014).

1.4.2 Membranständiges und extrazelluläres Hsp70

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass HSPs zytoplasmatische Proteine seien, deren Funktionen auf den intrazellulären Raum beschränkt sind. Heute ist jedoch klar, dass die HSPs nicht nur im Inneren der Zelle Funktionen erfüllen, sondern auch Kontakt zum extrazellulären Raum aufnehmen können (Hightower & Guidon, 1989; Horvath et al., 2008; Tytell, Greenberg & Lasek, 1986).

Auf der Oberfläche transformierter Tumorzellen kann in 50 % bis 70 % der Fälle membranständiges Hsp70 (mHsp70) nachgewiesen werden (Gehrmann, Radons, Molls & Multhoff, 2008; Multhoff et al., 1995). Während intrazelluläres Hsp70 ubiquitär vorkommt, lässt sich mHsp70 nur auf transformierten Tumorzellen oder auf von Viren befallenen Zellen nachweisen (Brown, G. et al., 2005; De Maio, 2014; Gehrmann, Radons, et al., 2008; Hightower & Guidon, 1989; Multhoff et al., 1995; Shin et al., 2003; Srivastava, 1997). In Abhängigkeit von der Tumorentität ist der Nachweis von mHsp70 als prognostisch günstig oder ungünstig zu beurteilen. Es wird angenommen, dass diese Ambivalenz auf die unterschiedlichen Metastasierungswege der Tumoren zurückzuführen ist (Pfister et al., 2007). Eine 14-mer lange, C-terminale Struktur des mHsp70, welche nach extrazellulär gerichtet ist, dient als Erkennungssequenz für Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Deren zytotoxische Kapazität wird nach der Erkennung von mHsp70 erhöht. Darüber hinaus kann Hsp70 an antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen binden, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine fördern und somit das angeborene Immunsystem unspezifisch stimulieren. Über eine Kreuz-Präsentation von Antigenen kann mHsp70 darüber hinaus auch das adaptive Immunsystem aktivieren. Diese Fähigkeiten machen mHsp70 zum Mediator einer Immun-

antwort, die gegen den Tumor gerichtet ist. Insbesondere für Tumoren, welche vorwiegend in Organe metastasieren, in denen eine hohe Aktivität von NK-Zellen vorzufinden ist, kann die Anwesenheit von mHsp70 daher prognostisch günstig sein (Asea et al., 2000; Gross, Koelch, DeMaio, Arispe & Multhoff, 2003; Kleinjung et al., 2003; Multhoff et al., 1999; Multhoff et al., 2001; Multhoff, Pockley, Schmid & Schilling, 2015).

Andererseits ist der Nachweis von hohen Mengen mHsp70 mit einer verstärkten Resistenz der Tumorzellen gegenüber chemisch und physikalisch induziertem Stress, wie Hypoxie, Chemotherapeutika oder Röntgenbestrahlung, assoziiert. Auf die Proliferationsraten „ungestresster“ Zellen scheint das membranständige mHsp70 dabei keine Auswirkung zu haben (Gehrmann et al., 2005; Pfister et al., 2007; Schilling et al., 2009). Die verstärkten Resistenzen können für Tumorpatienten den Erfolg der Standardtherapie gefährden und damit prognostisch ungünstig sein (Gehrmann, Radons, et al., 2008). Die genauen Mechanismen, über welche mHsp70 Resistenz vermittelt, sind noch unbekannt.

Auch für Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CX2 wurde beobachtet, dass eine vermehrte Menge mHsp70 mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Bestrahlung korreliert (Gehrmann et al., 2005). Darüber hinaus erhöhte sich auf Zellen mit initial geringem mHsp70-Anteil dieser nach Exposition gegenüber subletalen Dosen γ -Strahlung. Für andere Zelltypen wurde dies ebenfalls beschrieben (Kleinjung et al., 2003). Falls diese Zellen nachfolgend weiteren belastenden Stimuli (wie Bestrahlung oder zytostatischen Medikamenten) ausgesetzt waren, zeigten sie sich widerstandsfähiger gegenüber dem programmierten Zelltod (der Apoptose) (Gehrmann et al., 2005; Gehrmann, Radons, et al., 2008).

Nach wie vor ist der genaue Mechanismus der Integration von Hsp70 in die Membran nicht geklärt. Ebenso wenig ist bekannt, weshalb Hsp70 nach der Exposition gegenüber Stressstimuli vermehrt in der Membran vorzufinden ist oder weshalb die Anwesenheit von mHsp70 auf Tumorzellen beschränkt ist. Die stabile Verbindung des Proteins mit der Lipidmembran ist insbesondere deshalb bemerkenswert, weil es keine hydrophoben Domänen aufweist, welche seine Insertion erklären könnten. Während zunächst davon ausgegangen wurde, dass Hsp70 mit Proteinen der Plasmamembran interagiert, wird eine Protein-Protein-Interaktion heute als sehr unwahrscheinlich angesehen. mHsp70 ist in nicht-ionischen, detergentien-resistenten Mikrodomänen, sogenannten *Lipid Rafts*, lokalisiert (Broquet, Thomas, Masliah, Trugnan & Bachelet, 2003; Gehrmann, Liebisch, et al., 2008; Vega et al., 2008). *Lipid Rafts* sind unter anderem reich an Cholesterin und

Sphingolipiden, sie dienen als Plattformen zur Sortierung und der Assemblierung von Komplexen der Signaltransduktion, steigern Zellinteraktionen und fördern so interzelluläre Wechselwirkungen (Gehrmann, Liebisch, et al., 2008). Unter physiologischen Bedingungen ist mHsp70 mit dem Glykosphingolipid Globoyltriaosylceramid in den *Lipid Rafts* kolokalisiert. Nach Einwirkung von Zellstress ist mHsp70 jedoch, außerhalb der *Lipid Rafts*, in erster Linie mit Phosphatidylserin (PS) assoziiert, einem Phospholipid, welches für gewöhnlich auf der zytosolischen Seite von Membranen vorzufinden ist (Arispe, Doh, Simakova, Kurganov & De Maio, 2004; Brown, D. A. & London, 2000; De Maio, 2014; Gehrmann, Liebisch, et al., 2008; Schilling et al., 2009; Vega et al., 2008). Es ist anzunehmen, dass die (von Zellstress abhängige) Integration von Hsp70 in die Membran nur dann stattfinden kann, wenn deren Lipidkomposition dies zulässt (Gehrmann, Liebisch, et al., 2008; Horvath et al., 2008; Vega et al., 2008).

Neben seiner membrangebundenen Form konnte extrazelluläres Hsp70 (eHsp70) auch im Serum von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen detektiert werden, wie koronarer Herzkrankheit, Diabetes oder Tumorleiden (Oglesbee, Herdman, Passmore & Hoffman, 2005; Wu, F. H. et al., 2012; Zhang, X. et al., 2010). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Hsp70 nach der Exposition gegenüber Hitzeschock oder ionisierender Strahlung extrazellulär vermehrt vorzufinden ist (Haen et al., 2011; Lee, K. H., Jeong & Yoo, 2013). Der genaue Mechanismus, über welchen die Sekretion des Proteins stattfindet, ist bislang ungeklärt (De Maio, 2014). Für extrazelluläres Hsp70 scheint ein alternativer, sogenannter nicht-klassischer oder unkonventioneller aktiver Exportmechanismus zu bestehen (Nickel & Seedorf, 2008). Neben Theorien über einen lysosomalen/endosomalen Sekretionsweg (Mambula & Calderwood, 2006) oder sekretorische Granula (Evdonin et al., 2006) geht die Gruppe um De Maio davon aus, dass die Hsp70-Sekretion von Tumorzellen über den Zwischenschritt der membrangebundenen Form des Hsp70 geschieht. Der genaue Mechanismus dieser Freisetzung ist ebenso wenig bekannt wie die Strukturen auf Zielzellen, welche das extrazelluläre Hsp70 bzw. dessen transportierenden Vesikel erkennen (De Maio, 2014).

1.5 CRIPTO-1-ASSOZIIERTE SIGNALWEGE UND PROTEINE

Die Wirkung des Proteins Cripto-1 *via* seinen Signalwegen ist insbesondere in der Embryogenese von Bedeutung, spielt aber auch in Prozessen des Tumorprogresses eine Rolle. Cripto-1 wird in einer Vielzahl von Tumoren verstärkt exprimiert (Bianco & Salomon, 2010; Saloman et al., 2000; Shani et al., 2008; Strizzi, Bianco, Normanno & Salomon,

2005). Dabei fördert es das Überleben von Tumorzellen, die Zellproliferation, treibt die Tumorzellmigration und eine epitheliale-mesenchymale Transition voran, ebenso wie die Angiogenese (Bianco & Salomon, 2010; Strizzi et al., 2005). Das membranständige Cripto-1 (auch CR-1 oder *Teratocarcinoma-derived growth factor 1* (TDGF-1)) ist ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Glykoprotein, welches in seiner *cis*-Form in *Lipid Rafts* von Zellmembranen und Endosomen vorzufinden ist. Wird der GPI-Anker durch die Wirkung der GPI-Phospholipase D entfernt, entsteht eine lösliche Form des biologisch aktiven Cripto-1. Cripto-1 kann auch als lösliches Protein exprimiert werden, welchem die Fähigkeit zum Anheften an einen GPI-Anker fehlt; auch dieses kann aktiviert vorliegen (Bianco & Salomon, 2010). Cripto-1 gehört zur Familie *Epidermal growth factor (EGF)-Cripto-1-FRL-1-Cryptic* (CFC-Familie) und moduliert insbesondere Signale der TGF β -Familie (*Transforming growth factor β*), welche *via Small body size mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD) 2/3-abhängigen Signalwegen wirken. Cripto-1 dient dabei als obligater Ko-Rezeptor für einige Liganden, wie Nodal, GDF1 und GDF3, kann aber auch das Binden von Mitgliedern der TGF β -Superfamilie an deren Rezeptoren behindern (Gray, P. C. & Vale, 2012). Das Protein kann darüber hinaus auch unabhängig von TGF β -Signalwegen Tumorstadium fördern (Gray, P. C. & Vale, 2012). Um seine onkogenen Effekte zu vermitteln, ist Cripto-1 obligat auf die Anwesenheit des Hitzeschockproteins GRP78 angewiesen. Mit diesem kann es in *Lipid Rafts* auf der Zelloberfläche Komplexe bilden (Gray, P. C. & Vale, 2012; Kelber et al., 2009; Shani et al., 2008).

1.5.1 GRP78 - ein verbindendes Element von HSPs und Cripto-1

Das Hitzeschockprotein *Glucose-regulated protein 78* (GRP78) ist ein Chaperon, das für gewöhnlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist, anti-apoptotische und pro-proliferative Eigenschaften aufweist und der Hauptregulator der *unfolded protein response* (UPR) des ER ist, einem Signalweg, welcher nach der Einwirkung von ER-Stress abläuft (Hendershot, 2004; Lee, A. S., 2005). Wenn im ER vermehrt fehlgefaltete Proteine vorliegen, wird die Transkription von *GRP78* gesteigert (Lee, A. S., 2014). Außerdem wird durch alternatives Spleissen eine zytosolische Form des Proteins gebildet sowie die Translokation in Mitochondrien gefördert, wo es die durch ER-Stress induzierte Apoptose hemmen kann (Lee, A. S., 2014). Davon unabhängig kann die Expression von GRP78 auch durch Signalwege der Proteinkinase B (Akt) gesteigert werden (Gray, M. J. et al., 2013). GRP78 wird konstitutiv exprimiert, in Stammzellen und in einer Reihe von

Tumoren verstärkt. Dabei weisen hohe GRP78-Gehalte in Tumorzellen eine positive Korrelation mit Tumorprogress, Malignität und Therapieresistenz auf (Lee, A. S., 2014; Li, J. & Lee, 2006; Liu, R. et al., 2013). Als ER-Chaperon kontrolliert GRP78 die Prozessierung und Reifung einer Vielfalt von Zelloberflächenrezeptoren und sekretorischen Proteinen. Diese Eigenschaft ist für Tumorzellen entscheidend, um auf extrinsische Proliferationssignale antworten zu können (Luo & Lee, 2013). GRP78 ist außerdem ein Regulator proliferationsfördernder Signalwege *via* dem Wnt- β -Catenin-Weg, indem GRP78 Wnt im ER stabilisiert (Lee, A. S., 2014).

Eine Subfraktion von GRP78 kann in bestimmten Zelltypen auch an deren Oberfläche gefunden werden (sGRP78), insbesondere gilt dies für Tumorzellen (Gonzalez-Gronow, Selim, Papalas & Pizzo, 2009; Shin et al., 2003; Zhang, Y., Liu, Ni, Gill & Lee, 2010). Das oberflächliche sGRP78 kann dabei als Transmembranprotein wirken oder als löslicher Faktor, welcher von Tumorzellen sezerniert wird, dabei nimmt es rezeptorähnliche Funktionen wahr. Das Protein interagiert mit zahlreichen Oberflächenproteinen und steigert auf diese Weise das Zellüberleben und die Zellproliferation (Gonzalez-Gronow et al., 2009; Kern et al., 2009; Lee, A. S., 2014; Misra, Gonzalez-Gronow, Gawdi, Wang & Pizzo, 2004; Zhang, Y. et al., 2013). So ist es in einigen Tumoren in der Lage, die Aktivierung der Akt zu steigern, einer Kinase, welche das Zellüberleben, insbesondere nach der Einwirkung von Zellstress, fördert (Gray, M. J. et al., 2013; Wendel et al., 2004).

Außerdem ist die Anwesenheit von sGRP78 obligat für die Wirkung des Proteins Cripto-1. Mit diesem bildet sGRP78 membranständige Komplexe, inhibiert hierüber TGF β 1- und Aktivin-Signalwege, erhöht die Aktivität von Nodal-, MAPK- und PI3K/Akt-Signalwegen, wodurch GRP78 den Tumorprogress fördert (Gray, P. C. & Vale, 2012; Kelber et al., 2009; Shani et al., 2008).

1.5.2 Interaktionen von Cripto-1 mit Proteinen der TGF β -Familie

1.5.2.1 Die TGF β -Superfamilie

Beim Menschen besteht die TGF β -Superfamilie aus über 30 sezernierten Liganden und beinhaltet Nodal-verwandte Familien, TGF β 1, Aktivine sowie das *Bone morphogenetic protein* (Horbelt, Denkis & Knaus, 2012). Diese Proteine binden an einen transmembranösen Typ II-Rezeptor mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität (T β RII). Daraufhin assembliert ein heterotetramerer Komplex, welcher aus zwei Typ II-Rezeptoren (T β RII, den Aktivin-Rezeptoren ActRIIA, ActRIIB) sowie zwei Seronin/Threonin-Kinase-Rezeptoren

Typ I (T β RI, *Aktivin receptor like kinases* ALK4 bis ALK7) besteht. T β RII transphosphoryliert und aktiviert T β RI. Sind die Liganden des T β RII Nodal, Aktivine oder TGF β -1, phosphoryliert T β RI wiederum die rezeptorregulierten (R-)SMADs (*Small body size mothers against decapentaplegic homolog*) SMAD2 und -3 an C-terminalen Serinresten. Hierdurch wird eine Bindungsstelle für den Ko-SMAD SMAD4 geschaffen und ein heterooligomerer Komplex bildet sich. Dieser transloziert in den Nukleus, wo er die Transkription verschiedener Zielgene regulieren kann, was in Abb. 3 dargestellt ist (Gray, P. C. & Vale, 2012; Wakefield & Hill, 2013).

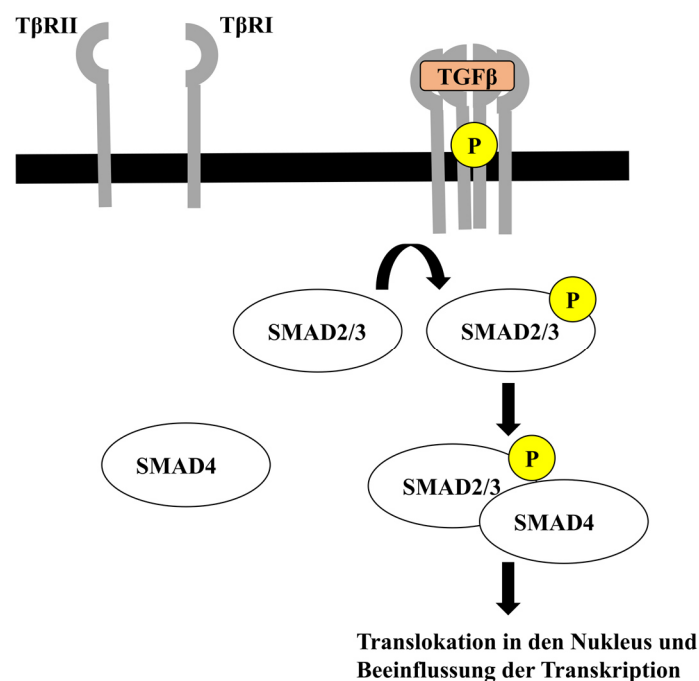


Abb. 3: TGF β -abhängige Signalwege. Nach dem Binden von Liganden der TGF β -Superfamilie (wie Nodal, Aktivine oder TGF β -1) an den T β RII assembliert ein heterotetramerer T β RI/II-Komplex. T β RII transphosphoryliert und aktiviert T β RI, dieser phosphoryliert und aktiviert wiederum die rezeptorregulierten (R-)SMADs SMAD2 und -3. Hierdurch wird eine Bindungsstelle für den Ko-SMAD SMAD4 geschaffen und ein heterooligomerer Komplex bildet sich. Dieser transloziert in den Nukleus, wo er die Transkription verschiedener Zielgene und darüber ein weites Feld zellulärer Prozesse regulieren kann.

Über diesen Mechanismus regulieren TGF β -Liganden ein weites Feld zellulärer Prozesse, wie die Zellproliferation, -homöostase und -differenzierung (Horbelt et al., 2012). Eine Störung der TGF β -Signalkaskaden ist dabei mit zahlreichen pathologischen Zuständen assoziiert, zum Beispiel mit Tumorwachstum und Metastasierung (Massague, 2008).

1.5.2.2 Der Nodal-Signalweg

Das Protein Nodal gehört zur Superfamilie der TGF β -Liganden (Wakefield & Hill, 2013). Viele Krebszellen, insbesondere solche von aggressiven Tumoren, exprimieren und sezernieren Nodal, während das Protein von gesunden Zellen Erwachsener nicht exprimiert wird (Strizzi et al., 2013). Eine Signalvermittlung *via* Nodal kann dabei das Tumorstadium fördern (Lonardo et al., 2011). GPI-verankertes Cripto-1 ist ein obligater Korezeptor von Nodal, dessen signalvermittelnde Kapazität es steigert und auf diese Weise zu einer vermehrten Bildung von aktiven Komplexen aus SMAD2/3 und -4 führt, was in Abb. 4 dargestellt ist (Gray, P. C. & Vale, 2012; Watanabe et al., 2007).

1.5.2.3 TGF β -1 und Aktivine

TGF β -1 ist ein pluripotentes Zytokin, welches kontextabhängig den Tumorprogress fördern oder hemmen kann (Pardali & Moustakas, 2007). Wie Nodal bindet auch aktiviertes TGF β -1 an der Zelloberfläche an T β RII und fördert darüber die Aktivierung und Komplexierung der SMADs 2-4. Cripto-1 kann dabei (in Anwesenheit von GRP78) die Assemblierung des heterotetrameren Rezeptorkomplexes hemmen, sodass TGF β -1-Signale (sowie solche der Aktivine A und B) nur vermindert in das Zellinnere gelangen (Abb. 4). Hierdurch werden die zytostatischen Effekte der Liganden verringert (Gray, P. C., Harrison & Vale, 2003; Kelber et al., 2009; Kelber, Shani, Booker, Vale & Gray, 2008; Shani et al., 2008).

Demzufolge dient Cripto-1, in Anwesenheit von GRP78, als obligater Ko-Rezeptor für Zellsignalwege *via* Nodal, welche Tumorstadium fördern, und begünstigt in diesem Zusammenhang die Aktivierung und Komplexierung von SMAD2/3 und SMAD4. Andererseits hemmt Cripto-1 Signalwege, welche durch die Wirkung von Aktivinen oder TGF β -1 verstärkt ablaufen und zytoprotektiv wirken. Auf diesem Weg hemmt Cripto-1 die Aktivierung und Komplexierung der SMADs 2/3 und -4. Der daraus resultierende Nettoeffekt der Anwesenheit von Cripto-1 ist eine geringe bis moderate Aktivierung von SMAD2/3 und -4 sowie die Förderung des Tumorprogresses. Dies geschieht bemerkenswerterweise auf zwei Wegen, welche die Aktivierungszustände der SMADs gegensätzlich beeinflussen (Adkins et al., 2003; Gray, P. C. & Vale, 2012).

Durch das Hemmen der SMAD2/3-Aktivität verhindert Cripto-1 die Transkription von Genen, welche für ihre Transkription auf größere Mengen von SMAD-Komplexen angewiesen sind. Zu solchen zählen jene, welche zytoprotektiv wirken. Im Gegensatz dazu

werden Gene, deren Transkriptionen durch verringerte SMAD2/3/4-Spiegel gefördert werden, verstärkt transkribiert. Zu diesen Genen zählen insbesondere solche, welche mit dem Tumorprogress assoziiert sind (Nicolas & Hill, 2003; Pardali & Moustakas, 2007).

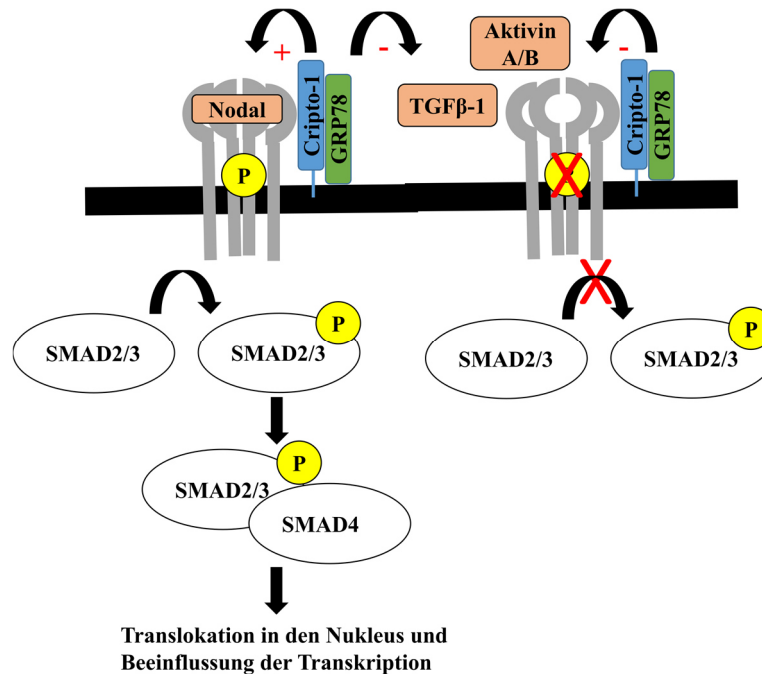


Abb. 4: Wirkung von Cripto-1 auf TGFβ-abhängige Signalwege. Cripto-1 aktiviert, in Anwesenheit von GRP78, Nodal-abhängige Signalwege. Gleichzeitig hemmt das Protein die Wirkungen von TGFβ-1 und Aktivinen. Insgesamt betrachtet überwiegt die Hemmung der SMAD-Aktivierung, sodass das Tumorstadium begünstigt wird.

1.5.2.4 SMADs

Da sie eine geringe DNS-Bindungsaffinität aufweisen, interagieren SMAD-Komplexe mit einer Vielfalt von DNS-Bindeproteinen. Ko(transkriptions)faktoren bestimmen dabei wesentlich die Bindungseigenschaften der SMAD-Komplexe und regulieren die Expression von Synexpressions-Zielgenen. Die Transkriptionsaktivität der SMAD-Komplexe wird darüber hinaus durch rekrutierte Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren moduliert. Die Anwesenheit der Ko-Faktoren/-Aktivatoren/-Repressoren hängt entscheidend von den Wechselwirkungen der SMADs mit anderen Signalwegen ab (Morikawa, Koinuma, Miyazono & Heldin, 2013). Durch diese vielfältigen Einflüsse dienen SMADs als Plattformen, um Signale verschiedener Signalwege zu integrieren. Ihre Wirkung ist hierdurch stark kontextabhängig, variabel und kann auch entgegengesetzte Effekte ausüben (Horbelt et al., 2012; Morikawa et al., 2013; Pardali & Moustakas, 2007).

Die tumorsuppressive Funktion von SMAD2/3 wurde ausführlich beforscht und liegt in seiner Fähigkeit begründet, die Zellproliferation vieler Zelltypen zu inhibieren und, in manchen Fällen, eine terminale Differenzierung oder Apoptose zu verursachen. Dabei ist insbesondere die transkriptionelle Aktivität, welche der SMAD2/3-Aktivierung nachgeschaltet ist, für den tumorsuppressiven Effekt entscheidend (Massague, 2008).

Bei Verlust oder dem verzögertem Ablauf von zytostatischen Programmen – Situationen, welche in Tumorzellen häufig vorzufinden sind – kann die Aktivierung von SMAD2/3-Signalwegen jedoch auch zur Förderung von Tumorwachstum führen. Dieser Effekt kann, im Zusammenspiel mit erhöhten Aktivitäten von Stammzell- oder Wachstumsfaktor-Signalwegen (wie Ras, Wnt und Notch), zusätzlich verstärkt werden (Derynck, Akhurst & Balmain, 2001; Fuxe, Vincent & Garcia de Herreros, 2010; Wakefield & Hill, 2013). So sezernieren beispielsweise Tumorzellen, welche refraktär gegenüber den zytostatischen Effekten von TGF β -Liganden wurden, große Mengen dieser in das extrazelluläre Medium. Diese Liganden wirken para- und autokrin auf Zellen und können unter diesen Umständen zu erhöhter Proliferation, Motilität, Invasivität sowie erhöhter epithelial-mesenchymaler Transition führen (Massague, 2008; Wakefield & Hill, 2013). Die molekularen Mechanismen, welche zur Wandlung des SMAD2/3-Effekts von einer zytostatischen zu einer onkogenen Wirkung führen, sind bislang nicht bekannt und Gegenstand der Forschung (Gray, P. C. & Vale, 2012).

Eine weitere wichtige Determinante der SMAD2/3-Aktivität ist die SMAD7-Expression, welche ein Ziel der transkriptionellen Regulation durch R-SMADs darstellt. Ihre Aktivität kann außerdem durch die Wirkung von IFN- γ verstärkt werden (Fiocchi, 2001; Kavsak et al., 2000). SMAD7 bindet an den T β RI ohne eine Phosphorylierungsstelle aufzuweisen und blockiert damit kompetitiv die Aktivierung von SMAD2 und -3. Darüber hinaus inhibiert SMAD7 die Aktivierung des SMAD-Komplexes, indem es mit den SMURFs (*SMAD ubiquitin regulatory factors*) SMURF1 und SMURF2 assembliert, mit ihnen eine E3 Ubiquitinligase bildet, und als diese den T β RI degradiert (Kavsak et al., 2000).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist es von besonderer Bedeutung, dass SMAD7 das Zellüberleben nach DNS-Beschädigung (zum Beispiel nach der Einwirkung ionisierender Strahlung) fördern kann, indem es ATM-abhängige Signale zur Aktivierung der DNS-Reparatur (*via* der DDR) verstärkt (Park et al., 2015). In Prostatakarzinomzellen, welche mit TGF β stimuliert wurden, war eine SMAD7-abhängige Phosphorylierung der ATM, Zellzyklusarrest und eine verstärkte genetische Stabilität zu

beobachten (Zhang, S. et al., 2006). Nach der Einwirkung von ionisierender Strahlung bzw. nach DNS-Schädigung können die phosphorylierten SMADs SMAD2 und -7 (nicht jedoch SMAD3) im Zusammenspiel mit DDR-Proteinen spezifisch an strahleninduzierte Regionen (*ionizing radiation induced foci*, IRIFs) an oder nahe von Doppelstrangbrüchen binden. Die Anwesenheit von SMAD2 an den IRIFs ist dabei unabhängig von TGF β -Signalen, aber abhängig von der (durch SMAD7 geförderten) ATM-Aktivität. Im Gegensatz dazu hängt die Anwesenheit von phosphoryliertem SMAD7 von der Aktivierung von TGF β -Signalwegen ab (Wang, M. et al., 2013). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass zwischen TGF β - und ATM-Signalwegen rege Wechselwirkungen vorliegen und machen darüber hinaus auch auf eine von TGF β -Signalwegen unabhängige Bedeutung der SMADs aufmerksam (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014).

1.5.2.5 Die Bedeutung von TGF β für maligne Tumoren

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde gezeigt, dass ionisierende Bestrahlung die TGF β -Aktivität steigert (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014). Über TGF β -Signalwege wird dabei die Expression von Schlüsselproteinen der *DNA-damage response*, wie RAD51, reguliert (Kanamoto, Hellman, Heldin & Souchelnytskyi, 2002). Dabei stehen verringerte TGF β -Signale mit einer reduzierten ATM-Aktivität nach Stresseinwirkung in Verbindung (Kirshner et al., 2006). TGF β -Signalwege sind demnach für eine adäquate Aktivierung der ATM nach Einwirkung ionisierender Strahlung notwendig.

Wenn TGF β -Signalwege (vermittelt durch Nodal, TGF β -1 oder Aktivine, im Folgenden TGF β genannt) in Tumorzellen vor der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung inhibiert werden, führt dies in den meisten Tumoren zu verstärkter Strahlenempfindlichkeit (Bouquet et al., 2011; Hardee et al., 2012). Obwohl die meisten epithelialen Tumoren resistent gegenüber TGF β -vermittelter Wachstumskontrolle sind, scheint TGF β in diesen Zellen essentiell zu sein, um eine für das Überleben notwendige, effiziente Reaktion auf eine DNS-Schädigung zu gewährleisten (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014). Andererseits führt eine verringerte Signalvermittlung *via* TGF β in nicht transformierten Epithelzellen zu vermehrter genomischer Instabilität, was wiederum die Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation erhöht (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014).

Somit hat TGF β eine scheinbar widersprüchliche Funktion in der Kanzerogenese. Während es die Zellproliferation hemmen, eine erhöhte Genomstabilität gewährleisten und damit die maligne Transformation von Zellen verhindern kann, besitzt es gleichzeitig die

Fähigkeit, transformierte Tumorzellen vor DNS-Schädigung durch ionisierende Strahlung oder andere Therapeutika zu schützen, sodass deren Widerstandsfähigkeit gefördert wird (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014).

1.5.3 Weitere Einflüsse von Cripto-1

In seiner löslichen Form kann Cripto-1, TGF β -unabhängig, einen Ko-Rezeptor im Wnt-Signalweg darstellen, die Notch-Prozessierung fördern und als Wachstumsfaktor wirken, welcher durch Caveolin-1 negativ reguliert wird (Bianco et al., 2008; Gray, P. C. & Vale, 2012).

1.5.3.1 Glypikan-1-abhängige Wirkung von Cripto-1

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass das Protein Cripto-1 die Fähigkeit hat, unabhängig von Nodal oder ALK4, als Ligand von Glypikan-1, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- und Proteinkinase B (Akt)-abhängige Signalwege zu aktivieren (Bianco et al., 2003; Kelber et al., 2009; Nagaoka et al., 2012). Glypikan-1 ist ein GPI-verankertes Heparansulfat-Proteoglykan, welches in *Lipid-Rafts* mit der Plasmamembran verbunden ist (Klauzinska et al., 2014).

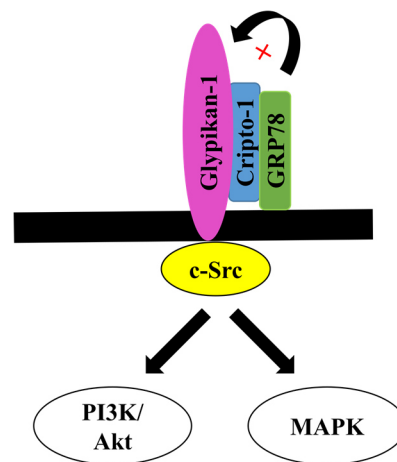


Abb. 5: Cripto-1 als Ligand von Glypikan-1. Als Ligand von Glypikan-1 kann Cripto-1 in Anwesenheit von GRP78 PI3K/Akt- und MAPK-abhängige Signalwege aktivieren.

Die Bindung von Cripto-1 an Glypikan-1 führt zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase c-Src. Diese aktiviert c-Src/Ras/Raf/MAPK- sowie c-Src/PI3K/Akt-Signalkaskaden (Abb. 5). Diese regulieren Zellüberleben, -proliferation und -motilität (Klauzinska et al., 2014; Nagaoka et al., 2012; Strizzi et al., 2005).

Die Wirkung von Cripto-1 ist demnach sowohl mit geringen bis moderaten SMAD2/3-Aktivitäten der Zelle, als auch mit erhöhten PI3K/Akt-Aktivitäten assoziiert (Gray, P. C. & Vale, 2012). Die Mechanismen, *via* welchen Cripto-1 c-Src-aktivierende Signale über die Plasmamembran ins Zellinnere weitergibt, sind derzeit unbekannt, aber sicherlich abhängig von der Anwesenheit von sGRP78 (Gray, P. C. & Vale, 2012; Kelber et al., 2009).

1.5.3.2 PI3K/Akt

Der PI3K/Akt-Signalweg läuft in vielen Tumoren verstärkt ab, dies korreliert mit einer vermehrten Zellproliferation und Therapieresistenz (Liu, P., Cheng, Roberts & Zhao, 2009). Über den Weg der PI3K werden zahlreiche Signale von Tyrosin-Kinasen integriert (Wendel et al., 2004). Die PI3K besteht aus zwei Untereinheiten, der regulatorischen Einheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110. Für die Aktivierung von PI3K wird die regulatorische Untereinheit an einem Tyrosinrest phosphoryliert, was ihre inhibierende Wirkung aufhebt. Nach ihrer Aktivierung wird die PI3K an die Plasmamembran rekrutiert. Dort phosphoryliert sie Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂), wodurch Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) gebildet wird. Dies bedingt die Lokalisierung der Phosphoinositid-abhängigen Kinase (PDK1) an der Membran. Diese phosphoryliert (und aktiviert dadurch) die Proteinkinase B (Akt). Die aktivierte Form der Akt ist dabei Endpunkt verschiedener Signalwege und ein zentrales Element, um Zellüberleben und -proliferation zu propagieren, insbesondere ist die Kinase ein potenter Inhibitor der Apoptose. Auch ist die Proteinkinase entscheidend in die Vermittlung von Chemoresistenz involviert (Wendel et al., 2004). Diese Wirkung übt sie unter anderem über die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase mTOR aus, welche *via* dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E die Translation von Proteinen kontrollieren kann (Wendel et al., 2004). Neben ihrer Aktivierung durch Cripto-1-abhängige Signalwege kann Akt auch davon unabhängig durch sGRP78 und vermutlich auch durch zytoplasmatisches GRP78 aktiviert werden (Gray, M. J. et al., 2013; Lee, A. S., 2014; Zhang, Y. et al., 2013).

1.6 ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit soll die Bedeutung der Hsp70-Membranexpression auf Tumorzellen in Abhängigkeit der Cripto-1 Signaltransduktionswege betrachtet werden. Es ist bekannt, dass sich Zellen, welche Hsp70 auf ihrer Oberfläche tragen, resistenter gegenüber verschiedenen Stresstimuli verhalten als solche, welche das Molekül nicht auf ihrer Zelloberfläche präsentieren (Gehrmann, Radons, et al., 2008). Die molekularen Ursachen für diesen Befund sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Es ist jedoch bekannt, dass das 78 kDa Hitzeschockprotein GRP78 mit dem Protein Cripto-1 auf der Zellmembran interagiert. Um einen möglichen Zusammenhang der mHsp70-Expression mit Cripto-1-abhängigen Signalwegen zu beleuchten, wurden die beiden isogenen Kolonkarzinom-Subzelllinien CX- und CX+ mit niedriger und hoher Hsp70-Membranexpression hinsichtlich ihrer Cripto-1-abhängigen Signalwege nach Strahlenexposition vergleichend untersucht. Die Zellen wurden einer subletalen Röntgenstrahlung ausgesetzt, um der Frage nachzugehen, inwieweit nach ionisierender Bestrahlung die mHsp70-Expression der beiden isogenen Zelllinien auf die Expression Cripto-1 abhängiger Proteine Einfluss nimmt. Erkenntnisse über den Einfluss von mHsp70 auf Cripto-1-abhängige Signalwege könnten dabei zukünftig Angriffspunkte für Tumortherapien bieten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien tabellarisch aufgelistet. Wurden Materialien wiederholt genutzt, sind sie in den Tabellen (Tab.) 1 bis 4 zu finden, wurden sie nur für eine bestimmte Methode eingesetzt, sind sie im jeweiligen Unterkapitel gelistet (Tab. 5 bis 12).

2.1.1 Software, Chemikalien, Geräte und sonstige Materialien

Tab. 1: Verwendete Software

Programm	Firma
Adobe Photoshop CS2, Version 9.0	Adobe Systems Software, Dublin, Irland
ImageJ 1.47v	U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Office 365 Excel, Word, Power Point	Microsoft Corporation, Redford, WA, USA
Inkscape 0.91	Software Freedom Conservancy, NY, USA

Tab. 2: Wiederholt verwendete Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Firma
Vergällter Alkohol 70 % „Alkopharm 70“	Brüggemann Chemical, Heilbronn, D
Ethanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 99,8 % „Rotipuran“	Carl Roth, Karlsruhe, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) „GIBCO Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline Solution“, Charge RNB69627	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Ultrapures Wasser (gewonnen durch reverse Osmose) „Millipore Direct Q“	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Wasser „Aqua ad iniectabilia“, Charge 0191A161	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Isopropanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Tab. 3: Wiederholt verwendete Materialien

Bezeichnung	Firma
Pipettierhilfe „Stripettor Plus“	Corning Inc., NY, USA
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D
Multistep-Pipette „Multipette plus“	Eppendorf AG, Hamburg, D
Einsätze für Eppendorf Multistep Pipette (10 ml, 25 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen „cellstar“ (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D
Pipettierhilfen „Lamda Plus“ (0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 2- 20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 10-1000 µl)	Corning Inc., NY, USA
Pipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D und Eppendorf AG, Hamburg, D
Filterspitzen „Biosphere“ (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D

Tab. 4: Wiederholt verwendete Geräte

Bezeichnung	Firma
Bestrahlungseinheit „Gulmay RS 225“	Xstrahl Ltd, Camberley, Surrey, UK
Zentrifuge „Heraeus Fresco 17“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge „Heraeus Labofuge 400R“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge „Heraeus Multifuge 35R+“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mini-Zentrifuge „neoLab D6015“	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Eismaschine Scotsman „AF100“	Scotsman Ice Systems, Mailand, It
Wasserbad „Y14“	Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Shepreth, Cambridgeshire, UK
Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Thermoblock „Thermostat Plus“	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vortex-Schüttler „Digital Vortex Genie2“	Scientific Industries Bohemia, NY, USA

Bezeichnung	Firma
PH-meter „Seven easy“	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Magnetischer Rührer und Heizplatte „MR3001K“	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Bechergläser (verschiedene Größen)	Schott AG, Mainz, D
Labor-Glasflaschen (verschiedene Größen)	Schott AG, Mainz, D
Zeitnehmer	Carl Roth, Karlsruhe, D
Feinwaage „A560“	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, CH
Präzisionswaagen „EW“	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D
Stereomikroskop „Stemi 2000C“ und Lampe „KL1500LCD“	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

Tab. 5: Chemikalien für die Zellkultur

Bezeichnung	Firma
GIBCO RPMI 1640, Bestellnummer (Best.nr.) 21875091	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
FCS, hitzeinaktiviert	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
L-Glutamin, 200 mM, sterilfiltriert, Best.nr. P04-80100	PAN biotech GmbH, Aidenbach, D
GIBCO Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin), Best.nr. 15140-122	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Natrium-Pyruvat, 100 mM, Best.nr. P04-43100	PAN biotech GmbH, Aidenbach, D
Trypsin-EDTA-Lösung 1x (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA)	PAN biotech GmbH, Aidenbach, D
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Tab. 6: Materialien für Zellkultur (Pipettier-Zubehör und Chemikalien ausgenommen)

Bezeichnung	Firma
T-25 Zellkulturflasche, 25 cm ³	Corning Inc., NY, USA
Filtereinheiten und Auffanggefäße „Nal-gene Rapid Flow“ (250 ml, 50 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inkubator „Thermo electron corporation BBD 6220“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inverses Mikroskop „Axiovert 135“	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Zählkammer „Improved Neubauer“	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Sicherheitswerkbank „Hera Safe“, laminarer Fluss, Seriennummer: 40700139	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.1.3 Materialien für die Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

Tab. 7: Chemikalien, Antikörper, Materialien und Geräte für FACS-Analysen

Bezeichnung	Firma
Propidiumiodid (PI)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Monoklonaler Maus anti-Hsp70 Antikörper cmHsp70.1-FITC, IgG1 2 mg/ml in PBS	Multimmune GmbH, München, D
Monoklonaler Maus anti-HLA-Klasse I-Antigen-FITC, IgG2a	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Maus IgG1-FITC, Best.nr. 345815	BD, Heidelberg, D
Durchflusszytometer „FACS Calibur“	BD, Heidelberg, D
FACS-Röhrchen (Rundboden, 5 ml), Best.nr. 352052	BD, Heidelberg, D

2.1.4 Materialien für Proteinbestimmungen

Tab. 8: Für Proteinisolation und -bestimmung verwendete Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Firma
Nonidet-P40 Substitut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
96-Well-Titerplatte	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Spektralphotometer „BioTek EL 808“	BioTek, Winooski, VT, USA

Tab. 9: Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte für Gelelektrophoresen und Western Blots

Bezeichnung	Firma
Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TRIS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Ammonium-Persulfat (APS), 10 % in doppelt destilliertem Wasser	Carl Roth, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Stammlösung, 99 %, Artikelnummer (Art.nr.) 2367.3	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin \geq 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Glycerol > 99 %	BD, Heidelberg, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Tween 20 Detergens, Best.nr. 655205	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Isopropanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau (BPB), 20 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Methanol \geq 99,5 %, Ph.Eur., reinst	Carl Roth, Karlsruhe, D

Bezeichnung	Firma
Milchpulver, fettarm, Blotting grade, Art.nr. T145.2	Carl Roth, Karlsruhe, D
Wasser „Aqua ad iniectabilia“, Charge 0191A161	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Protein Marker „peqGOLD Protein-Mar- ker IV“, 10-170 kD, Best.nr. 27-2110	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlan- gen, D
Pierce ECL Western Blotting Substrate, Art.nr. 32106, Charge ME157124	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Tischzentrifuge „neoLab D6015“	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Heizblock „Thermostat Plus“	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen zur Gelbeladung „Mul- tiFlex round tips“ (1-200 µl)	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Elektrophorese-Netzanschluss „EPS300“	Hoefler, Holliston, MA, USA
Elektrophoresekammer „Mighty small vertical II“	Hoefler, Holliston, MA, USA
Gelgießstand	Hoefler, Holliston, MA, USA
Abstandhalter „T-Spacer“	Hoefler, Holliston, MA, USA, SE2119T- 2-1,5
Filterpapier „Whatman Gel Blot GB005“, Best.nr. 10426981	GE Healthcare Life Science, Whatman, Frankfurt am Main, D
Halbtrockene Blot-Kammer „Scientific Semiphor TE 70“	Hoefler, Holliston, MA, USA
Pipettenspitzen „MultiFlex round tips“ (1-200 µl)	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Nitrozellulosemembran „Whatman Protran BA83“, Art.nr. 28415007	GE Healthcare Life Science, Whatman, Frankfurt am Main, D
Horizontalschüttler „IKA KS 260 Basic“	IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen, D
Chemilumineszenz-Film „High Perfor- mance Amersham Hyperfilm ECL“	GE Healthcare Life Science, Frankfurt am Main, D
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine „X- Omat M35“	KODAK, Rochester, NY, USA
Röntgenfilm-Entwickler-Vorbereitung „Automixer II“	Kodak, Rochester, NY, USA
Scanner „Bearpaw 2400TA plus“	Mustek System Inc., Oosterhout, NL

Tab. 10: In der Gelelektrophorese eingesetzte Proteine

Protein	Genaue Bezeichnung	Firma
Hsp70	Human Hsp70, recombinant Protein from E.Coli, vom 14.10.2010, Nr. 37	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D
GRP78	Grp78 (BiP) Recombinant Hamster Protein	Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA

Tab. 11: In der Gelelektrophorese als Positivkontrollen eingesetzte Proteinlysate

Zellen	Genaue Bezeichnung	Konzentration
HeLa	HeLa-Proteinlysate, Mathias Gehrman	10 µg/µl
K562	K562-Proteinlysate, Mathias Gehrman	27,5 µg/µl

Tab. 12: Verwendete Antikörper für die Proteinnachweise

Untersuchtes Protein	Genauere Bezeichnung des Primärantikörpers	Firma	Best.nr.	Bande laut Hersteller	Quelle	Typ	Positiv-Kontrolle	Verdünnung
Hsp70	Monoclonal mouse anti-Hsp70 emHsp70.1, 2,5 µg/µl	Multimmune GmbH, München, D		70 kDa	Maus	Monoklonal	Hsp70	1/1000
GRP78	Anti-GRP78 BiP antibody	Abcam, Cambridge, UK	ab32618	75 kDa	Kaninchen	Polyklonal	GRP78	1/500
SMAD2/3	Anti-Smad2/3	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	07-408	50, 60 kDa	Kaninchen	Polyklonal	K562-Zellen	1/500
SMAD4	SMAD4 Antibody (monoclonal) (M02)	Abgent, Maidenhead, UK	AT3943a	60 kDa	Maus	Monoklonal	K562-Zellen	1/500
PI3K	PI3 Kinase p110α (C73F8) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Leiden, NE	4249	110 kDa	Kaninchen	Monoklonal	HeLa-Zellen	1/1000
Akt	Akt Antibody	Cell Signaling Technology, Leiden, NE	9272	60 kDa	Kaninchen	Polyklonal	HeLa-Zellen	1/1000
GAPDH	Monoclonal Anti-GAPDH antibody produced in mouse	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	G8795	37 kDa	Maus	Monoklonal		1/30000
Tubulin	Monoclonal mouse IgG α-Tubulin	Merck Millipore, Billerica, MA, USA		55 kDa	Maus	Monoklonal		1/1000
Sekundär-Antikörper gegen	Genauere Bezeichnung des Sekundär-Antikörpers	Firma	Best.nr.	Konjugat	Quelle	Typ	Verdünnung	
Kaninchen-Primärantikörper	Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	P 0217	HRP	Schwein	Polyklonal	1/1000	
Maus-Primärantikörper	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	P 0260	HRP	Kaninchen	Polyklonal	1/1000	

2.2 METHODEN

In dieser Arbeit wurden die beiden Subzelllinien CX- und CX+, die über Zellsortierung aus der Mutterzelllinie CX2 hervorgegangen sind, als *in vitro*-Modellzellen verwendet um zu untersuchen, ob die Menge an Zellmembran-gebundenem Hsp70 (mHsp70) mit einer quantitativen Veränderung der Expression von Schlüsselproteinen in Cripto-1-abhängigen Signalwegen assoziiert ist. Dazu wurde in FACS-Analysen zunächst untersucht, ob sich die Subzelllinien auch in höheren Passagen in ihren basalen mHsp70-Anteilen unterschieden. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt oder scheinbestrahlt und 24 h nach Bestrahlung/Scheinbestrahlung die mHsp70-Expression in bestrahlten (bestr.) und scheinbestrahlten (unbestr.) Zellen bestimmt. Von den bestrahlten und scheinbestrahlten CX- und CX+ Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und diese mit Western Blots auf ihren Gehalt an zytoplasmatischen Proteinen von Cripto-1-abhängigen Signalwegen 24 h nach Bestrahlung/Scheinbestrahlung untersucht. Außerdem wurde beobachtet, ob sich die zytoplasmatischen Hsp70-Gehalte nach Bestrahlung parallel zu den mHsp70-Anteilen veränderten. Die Expressionsraten der unbestrahlten (scheinbestrahlten) Zellen (CX- unbestr. und CX+ unbestr.) sowie die strahleninduzierten Veränderungen der beiden Subzelllinien wurden dabei jeweils verglichen. Alle Verfahren (Zellkultur, FACS, Bestrahlung, Western Blots) wurden nach den Standardprotokollen des Labors durchgeführt.

2.2.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die vorliegende Arbeit wurden die Subzelllinien CX- und CX+ von humanen Adenokarzinomzellen des Kolons (CX2) verwendet (TZB 61005, Tumorzellbank, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland). Es handelte sich hierbei um adhärenz wachsende CX2 Zellen, welche durch Durchflusszytometrie (FACS) abhängig vom Anteil ihrer membranständigen Hsp70-Expression in die Subzelllinien CX- (mit geringer oberflächlicher Hsp70-Expression) und CX+ (mit starker oberflächlicher Hsp70-Expression) stabil gruppiert wurden. Für die Sortierung wurde der Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierte (FITC-konjugierte) spezifische Hsp70-Antikörper (cmHsp70.1, IgG1, Multimmune GmbH, München, Deutschland) verwendet. Alle Zellkulturverfahren wurden unter sterilen Bedingungen und laminarem Fluss durchgeführt.

Die CX- Zellen (Passage 92, Zellzahl = $4,3 \times 10^6$) und CX+ Zellen (Passage 112, Zellzahl = $4,3 \times 10^6$) wurden in Reaktionsgefäßen aus dem Stickstofftank entnommen und bis

zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. In ein 15 ml fassendes Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml eines B-Zell-Mediums mit 5 % FCS (5 %-BZM = Medium, 4 °C, Zusammensetzung: 5 % FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 93 U/ml Penicillin, 93 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natrium-Pyruvat) vorgelegt. Nachdem die Zellen in den Händen aufgetaut wurden, wurde die Zelllösung in das Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 5 min bei 4 °C mit einer Schleuderziffer von 350 g zentrifugiert, um Dimethylsulfoxid-Rückstände (DMSO, Kryoprotektivum) zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) abpipettiert, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und nochmals bei den oben genannten (o.g.) Bedingungen zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml Medium (RT) resuspendiert und schließlich in eine Zellkulturflasche mit einer Adhäsionsfläche von 25 cm³ (T25-ZKF) überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 3 Tage bebrütet.

Vor jedem Passagieren wurden der Zellrasen und die Dichte der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Die CX⁻ Zellen sowie die CX⁺ Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert. Dazu wurden sie zunächst geerntet: Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 1,5 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Um die Zellen vom Boden zu lösen, wurden sie für 1 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit 1 ml Trypsin versetzt. Um das Trypsin zu inhibieren wurde anschließend 5 ml Medium zugegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt. Vor dem erneuten Aussäen der Zellen wurde die Lebendzellzahl mit Hilfe einer *Neubauer-improved*-Zählkammer nach 1:1-Verdünnung mit Trypanblau unter einem inversen Mikroskop bei mittlerer Vergrößerung bestimmt. Die Zellkonzentration wurde über die Formel

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl ausgezählter Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}}$$

beziehungsweise aufgrund der gegebenen Bedingungen mit der Formel

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl ausgezählter Zellen} \times 2 \times 10^4}{4} \text{ bestimmt.}$$

Jeweils 0,5 x 10⁶ lebende Zellen wurden in 5 ml Medium in eine neue T25-ZKF überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bis zur Versuchsdurchführung oder dem nächsten Passagieren bebrütet. Die soeben beschriebene Durchführung erfolgte für CX⁻ Zellen und CX⁺ Zellen in gleicher Weise.

2.2.2 Bestrahlen der Zellen

Zwei Tage nach dem Passagieren wurden die Zellen 10 Gy [J/kg] Röntgenstrahlung ausgesetzt (15 mA, 200 kV, Dosisleistung 0,91 Gy/min, 0,5 mm Cu-Filter). Damit nach der Bestrahlung, die in vielen Zellen zu Apoptose oder Nekrose führt, noch genügend viele vitale Zellen vorhanden waren, wurden pro Subzelllinie 25 T-25-ZKFs bestrahlt. Als unbestrahlte Kontrollgruppe dienten Zellen, die einer Scheinbestrahlung ausgesetzt waren, die also denselben Transport- und Lagerbedingungen wie die bestrahlten Zellen ausgesetzt waren, ohne jedoch bestrahlt zu werden.

Um eine spätere Proteinisolation durchführen zu können, wurden die Zellen (CX- und CX+, jeweils bestrahlt und unbestrahlt) 24 h nach der Scheinbestrahlung/Bestrahlung geerntet und ausgezählt. Es wurden 1×10^6 lebende Zellen bei 4 °C und 500 g für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand (BZM) im Anschluss verworfen und das entstandene Zellpellet in 1,5 ml PBS resuspendiert. Erneut wurde unter den o.g. Bedingungen für 7 Minuten zentrifugiert, das PBS im Überstand dann verworfen und die gewaschenen Zellen bei -20 °C eingefroren. Aus diesen Zellen wurden zu einem späteren Zeitpunkt Proteinlysate hergestellt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Eine Durchflusszytometrie (FACS) wurde sowohl zwei Tage nach dem Passagieren als auch drei Tage nach dem Passagieren (24 h nach der Scheinbestrahlung/Bestrahlung mit 10 Gy) durchgeführt. Die FACS-Messung am Tag der Bestrahlung diente dem Beweis, dass es sich um Subzelllinien handelte, die am Tag der Bestrahlung (basal) eine unterschiedliche mHsp70-Expression aufwiesen. Durch die Quantifizierung mHsp70-positiver Zellen (mHsp70+ Zellen) 24 h nach Bestrahlung oder Scheinbestrahlung wurde der strahleninduzierte Effekt auf die mHsp70-Expression untersucht.

Die Zellen wurden dazu wie gewohnt geerntet, um die Enzymaktivität des Trypsins zu stoppen wurde jedoch statt 5 % BZM gekühlter FACS-Puffer (PBS + 10 % FCS) verwendet. Um eine Internalisierung von Oberflächenproteinen zu vermeiden, wurden die folgenden Handlungen auf Eis durchgeführt (Stangl et al., 2011). Je $0,1 \times 10^6$ Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml, von denen je drei befüllt wurden: Je eines für die Probe, Positivkontrolle und die Negativkontrolle) gegeben, die Gefäße wurden dann mit kaltem FACS-Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt und bei 4 °C und 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pumpe abgesaugt. Damit es den Antikörpern besser möglich war, an die Zelloberflächen zu binden, musste das Zellpellet weniger dicht

gepackt vorliegen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß mit leichtem Druck über ein Metallgitternetz gestrichen. Der cmHsp70-FITC-Antikörper wurde 1:1 mit PBS verdünnt und auf ein Zellpellet gegeben (4 µl). Als Positivkontrolle fand ein FITC-konjugierter Antikörper gegen das MHC I-Antigen Einsatz, als Isotyp-Kontrolle (Negativkontrolle) ein Maus-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper (Einsatz von je 5 µl pro $0,1 \times 10^6$ Zellen). Unter Lichtausschluss wurden die auf Eis gelagerten Zellen dann für 30 min mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer zentrifugiert (500 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und schließlich in ein FACS-Röhrchen überführt. Unmittelbar vor jeder FACS-Messung wurde die Zellsuspension mit 5 µl Propidiumiodid (PI) versetzt. PI kann die Zellwand von toten Zellen durchdringen und dient somit der Unterscheidung von lebenden und toten Zellen in der Durchflusszytometrie. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Prozentsatz lebender Zellen bestimmt, die mHsp70 oder MHC-1 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Als Negativkontrolle wurde ein *Isotyp-gematchter* Antikörper (IgG1) eingesetzt. Der Anteil mHsp70 positiver Zellen errechnete sich aus der Differenz von cmHsp70.1-spezifisch gefärbten Zellen und dem Anteil der Zellen, die den IgG1 Isotypkontrollantikörper gebunden hatten. Nach der Bestimmung des Anteils mHsp70 positiver Zellen am Tag der Bestrahlung (basales mHsp70) wurde durch einen zweiseitigen, gepaarten t-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05 untersucht, ob sich dieser zwischen CX- und CX+ Zellen unterschied.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse 24 h nach Bestrahlung wurden dahingehend untersucht, ob sich der Anteil mHsp70 positiver Zellen (mHsp70+) durch die Bestrahlung innerhalb einer Subzelllinie veränderte (Vergleich von CX- unbestr. mit CX- bestr. und Vergleich von CX+ unbestr. mit CX+ bestr., gepaarter t-Test). Für die Signifikanztests wurden zweiseitige t-Tests der Software „Microsoft Office 365 Excel“ verwendet.

2.2.4 Western Blots und Vorbereitungen

2.2.4.1 Isolierung zytoplasmatischer Proteine

Die eingefrorenen Zellen (siehe Kapitel 2.2.2) wurden aufgetaut und je 1×10^6 Zellen in 200 µl Zytoplasma-Lysepuffer (TRIS-Cl 10 mM, pH 7,6 in PBS, 1,0 % Nonidet P-40) resuspendiert. Auf Eis wurden sie dann 45 min inkubiert, wobei die Proben im Abstand von 10 min mit dem Vortex-Schüttler gemischt wurden. Eine Zentrifugation über 15 min

bei 10.000 g und 4 °C schloss sich an. Der Überstand, der die Proteinlysate enthielt, wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Je ein Aliquot wurde abgenommen, für dieses schloss sich die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des „Pierce ® BCA Protein Assay Kits“ nach dem Firmenprotokoll an. Die restlichen Lysate wurden bei -80 °C gelagert.

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurden Reagenz und Trägerlösung des Kits gemischt (1:50) und eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) angelegt (6,25 µl/ml bis 800 µg/ml, Doppelbestimmung, Verdünnung im Lysepuffer). Da die Proteinkonzentrationen noch unbekannt waren und sie im optimalen Messbereich des Spektralphotometers liegen sollten, wurden die Proteinlysate pur, in einer 1:5- und einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Um eine möglichst große Menge Proteinlysate für die Western Blots zurückhalten zu können, fand eine Einfachbestimmung statt. In eine 96-Well-Titerplatte wurden pro Well 200 µl Reagens/Trägerlösung sowie 25 µl des Standards, der Probe oder des Lysepuffers (Negativ-Kontrolle) gegeben. Die Platte wurde anschließend für 25 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nachdem sie wieder Raumtemperatur erreicht hatte, wurde sie in das Spektralphotometer eingelegt, in diesem wurden bei 550 nm die Proteinkonzentrationen ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Lysatverdünnungsstufe, deren optische Dichte (OD) sich in einem Intervall befand, in dem die Standardkurve einen linearen Verlauf zeigte. Das Gerät ermittelte über die Formel: $cp(x) = d * g(x)$ die Proteinkonzentration (cp), wobei „d“ den Verdünnungsfaktor der Probe und „x“ deren optische Dichte darstellte. Die Funktion „g(x)“ bezeichnete die polynome Trendlinie der inversen Standardkurve. Diese kann ermittelt werden, indem die OD in Abhängigkeit der BSA-Konzentration der Standardkurve betrachtet und deren Steigung bestimmt wird. Die vom Gerät berechnete Konzentration bestimmte die spätere Einsatzmenge des Proteinlysats in der Gelelektrophorese.

2.2.4.2 Gelelektrophorese

Zur Quantifizierung der Proteine wurde ein Western-Blot mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die dem Proteintransfer („Blotten“) vorhergehende Gelelektrophorese trennt die Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht auf. Eine notwendige Voraussetzung hierzu wird durch SDS hergestellt, einem Tensid, welches Proteine denaturiert und zu einer gleichmäßigen negativen Ladung der Proteine führt, sodass sich diese nach Anlegen eines elektrischen Feldes in dieselbe Richtung (zur Anode) bewegen und im Agarosegel nach

ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979).

Zunächst wurde der Gelgießstand vorbereitet, danach wurden die Gele bei Raumtemperatur gegossen (siehe Tab. 13 und Tab. 14). Nachdem die Polymerisierungsstarter TEMED und Ammonium-Persulfat (APS) dem Gel zugegeben waren, musste es unverzüglich zwischen die Glasplatten der Apparatur gegossen werden. Jedes Gel wurde mit 1 ml Isopropanol (70 %) beschichtet und stehen gelassen, bis eine vollständige Polymerisierung stattfand. Nach dieser Zeit wurde das Isopropanol abgeschüttet und die Geloberfläche vorsichtig mit Wasser abgespült. Das Sammelgel wurde vorbereitet (20 ml). Auch zu diesem wurden TEMED und APS erst unmittelbar vor dem Eingießen gefügt. Die Füllung der Gelgießkammer erfolgte bis zur Oberkante und war gefolgt vom zügigen Einsetzen der Western Blot-Kämme, um Taschen für die spätere Befüllung des Gels mit Proteinproben zu bilden. Eine Polymerisierungszeit von circa 1 h war hier einzuhalten, währenddessen wurden die Elektrophoreseeinheit aufgebaut und die Proben vorbereitet (siehe unten). Gele, die nicht sofort verwendet wurden, wurden in befeuchteten Tüchern bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (die Anfeuchtung der Tücher erfolgte mit Laufpuffer, siehe Tab. 15).

Tab. 13: Zusammensetzungen der Puffer für die Gele der SDS-PAGE

Trenngelpuffer		Sammelgelpuffer	
SDS	0,8 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)
TRIS-Cl, pH 8,8	1,5 M	TRIS-Cl, pH 6,8	0,25 M

Tab. 14: Zusammensetzungen von Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE

Trenngel		Sammelgel	
Acrylamid	10 % (w/v)	Acrylamid	3,9 % (w/v)
Bisacrylamid	0,23 % (w/v)	Bisacrylamid	0,10 % (w/v)
Trenngelpuffer	25 % (v/v)	Sammelgelpuffer	50 % (v/v)
Aqua ad iniectabilia	41 % (v/v)	Aqua ad iniectabilia	37 % (v/v)
APS	0,08 % (w/v)	APS	0,6 % (w/v)
TEMED	0,16 % (w/v)	TEMED	0,3 % (w/v)

Das Proteinlysativolumen der Zellen CX- unbestr., CX- bestr., CX+ unbestr. und CX+ bestr., das einer Proteinmenge von 10 µg entsprach, wurde für die Elektrophorese

verwendet. Gleiches galt auch für Zellen, die als Positivkontrollen in die Taschen eingebracht wurden. Wurden Proteine als Positivkontrollen verwendet (Tab. 10 und Tab. 11), erfolgte der Einsatz gemäß den Herstellerangaben. Das Proteinlysate/die Proteine wurden in einem Reaktionsgefäß (0,5 ml) mit SDS-haltigem Probenpuffer (4-fach Probenpuffer (4xLD), der im Verhältnis 1:4 zum Endvolumen einzusetzen war (siehe Tab. 15), versetzt. Für ein einheitliches Endvolumen wurde die Volumendifferenz zum Endvolumen durch Wasser („*Aqua ad iniectabilia*“) ergänzt. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C erhitzt (Heizblock) und anschließend kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge). Während der Probenvorbereitung wurden zwei in der Zwischenzeit erhärtete Gele in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, diese wurde mit Laufpuffer (Tab. 15) befüllt. Die Kämme wurden vorsichtig aus den Sammelgelen gezogen und die Geltaschen mit einer Pipette (100 µl) mit Laufpuffer durchgespült. So konnten Verklebungen der Taschen gelöst werden. Die Gele wurden mit einem Proteinmarker zur Größenkontrolle der Proteine (peqGOLD, 5 µl), den Probenlösungen der Zellen und Positivkontrollen (22 µl) beladen. Beispielhaft ist ein Schema dazu in Abb. 6 dargestellt. Die Auswahl der Positivkontrollen erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller der Primärantikörper (Tab. 12).

Tab. 15: Zusammensetzung des Proben- und Laufpuffers für die SDS-PAGE

Probenpuffer (4-fach)		Laufpuffer	
DTT	400 mM	Glycin	139 mM
SDS	8 % (w/v)	SDS	0,1 % (w/v)
Glycerol	40 % (v/v)	TRIS-Cl, pH 8,3	25 mM
TRIS-Cl, pH 6,8	250 mM		
BPB	0,02 % (w/v)		

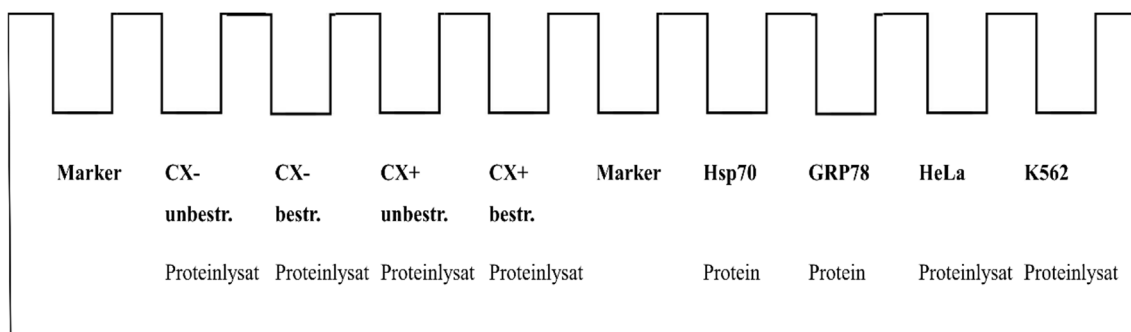


Abb. 6: Beispiel einer Gelbeladung mit Proben und Positivkontrollen. Es wurde Proteinlysate oder reines Protein eingesetzt.

Die Elektrophoresekammer wurde geschlossen und an die Stromquelle angeschlossen. Die Proteinauftrennung erfolgte für 90 min mit $U = 200 \text{ V}$, $I = 20 \text{ mA}$ pro Gel. Im Anschluss daran wurden die Gele aus der Gelelektrophoresevorrichtung entnommen und der Proteintransfer (Blot) durchgeführt.

2.2.4.3 Western Blot (elektrophoretischer Proteintransfer)

Die Gele mit den aufgetrennten Proteinen wurden nach Abschluss der SDS-PAGE in eine Blotting-Kammer gelegt (Semidry-Blot-System). Direkt auf der Kontaktplatte der Kammer wurden je zwei in Transferpuffer (192 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v), 25 mM TRIS PH 8,8, 20 % Methanol (v/v)) getränkte Filterpapiere unter einem Gel positioniert, je zwei darüber, wobei sich direkt auf dem Gel anodenseitig eine Trägermembran (Nitrozellulosemembran) befand. Auch die Membran wurde zuvor für wenige Minuten in Transferpuffer gelegt. Nachdem der Deckel der Blot-Apparatur geschlossen war, wurden 500 g Gewicht aufgelegt und der Transfer begonnen. Hierzu wurde ein Strom von 0,8 mA pro cm^2 Gel (45 mA pro Membran) bei einer Spannung von 50 V für 45 min angeschlossen. Das erzeugte elektrische Feld stand senkrecht zum Polyacrylamidgel, sodass die Proteine in Richtung der Anode bewegt wurden. Nach Beendigung des Transfers befanden sich die nach Größe aufgetrennten Proteine auf der anodenseitigen Nitrozellulosemembran.

2.2.4.4 Immunchemischer Nachweis

Die Nitrozellulosemembran wurde zum Absättigen (Blockieren) von proteinfreien Zonen nach dem Proteintransfer für eine Stunde in 5 %iger Milchlösung (PBST mit 5 % Milchpulver) geschwenkt (RT). Dadurch konnte verhindert werden, dass Primärantikörper unselektive Bindungen mit der Membran eingehen.

Im Anschluss daran konnte die Membran mit den spezifischen Antikörpern inkubiert werden. Um mehrere Proteine der Zellen, die auf ein Gel aufgetragen wurden, gleichzeitig bestimmen zu können, wurde die Membran zwischen den Banden vorsichtig horizontal durchtrennt. Die genaue Platzierung der Durchtrennung erfolgte abhängig vom Ort der zu erwartenden Proteinbanden. Als Maß hierfür wurden die Angaben der Hersteller der Primärantikörper zum Molekulargewicht und Detektionsort der Proteine herangezogen. Die Primärantikörper wurden in 1 %iger Milchlösung verdünnt (PBST mit 1 % Milchpulver) und mit den entsprechenden Membranabschnitten über Nacht in Kontakt gebracht (4 °C im Rotierer, in 15 ml Zentrifugenröhrchen, befüllt mit 7,5 ml Primärantikörperverdünnung). Während dieser Zeit konnten die Antikörper spezifisch an das Epitop des Proteins binden, zu dessen Detektion sie bestimmt waren. In drei Waschschrritten bei RT von einmal 15 min und zweimal 5 min mit PBST (PBS mit 0,5 % Tween-20-Detergens) auf dem Horizontalschüttler wurden unspezifische Bindungen anschließend wieder gelöst.

Für den Proteinnachweis wurde die Membran hernach auf einem Horizontalschüttler für eine Stunde lichtgeschützt in Kontakt mit dem polyklonalen konjugierten Sekundärantikörper gebracht. Das Sekundärantikörperkonjugat war zuvor in 1 %iger Milchlösung verdünnt worden (Tab. 12). Der Sekundärantikörper bindet an den F_c-Teil des Primärantikörpers und ermöglicht durch sein Reporterenzym, in diesem Fall der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), einen Nachweis der Bindung des Primärantikörpers an das Protein. Um überschüssiges Antikörperkonjugat zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss drei Mal für 10 min bei RT auf dem Horizontalschüttler mit PBST gewaschen. Es schloss sich die Detektion der Proteine mit Hilfe des Chemilumineszenz-Kits „Pierce® ECL-Western Blotting Substrate“ nach den Angaben des Herstellers an. Auf jede Membran wurde für 5 min 4 ml der Reagenzmischung gegeben, diese dann vorsichtig abgetupft, um im Anschluss Bilder von den noch feuchten Membranabschnitten zu entwickeln. Die Belichtungszeiten (in einer Belichtungskassette) betragen 15 sec, 30 sec, 1 min, 3 min und 30 min. War nach 30 min noch immer keine Bande zu erkennen, erfolgte eine Belichtung über Nacht.

Um das verfügbare Proteinlysate so effizient wie möglich zu nutzen, wurde jede Nitrozellulosemembran mehrfach zur Proteinbestimmung verwendet (maximal drei Mal). Nach der Entwicklung des jeweiligen Films wurde sie bei RT über Nacht auf dem Horizontalschüttler in PBST gelegt, um entstandene Bindungen weitgehend zu lösen. Die gewaschene Membran wurde im Anschluss für 1 h in 5 %iger Milchlösung geblockt und nach

dem oben beschriebenen Protokoll mit der Inkubation mit einem Primärantikörper weiterverfahren.

Die quantifizierten Proteine waren Hsp70 sowie Mitglieder Cripto-1-abhängiger Signalwege und sind in Tab. 12 mit ihren Positivkontrollen aufgeführt. Um den Gehalt eines speziellen Proteins in der Probe zu bestimmen, wurde dessen Menge stets in Relation zu dem eingesetzten Gesamtproteingehalt in der jeweiligen Probenlösung betrachtet. Als Maß für die eingesetzte Menge Gesamtprotein pro Tasche wurde der jeweilige Gehalt der internen Referenzproteine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Bande bei 37 kDa) oder Tubulin (Bande bei 55 kDa) bestimmt.

2.2.4.5 Auswertung der Western Blots

Die entwickelten Röntgenfilme wurden eingescannt, mit dem Programm “Adobe® Photoshop®” am PC geöffnet, darin die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten und als JPEG-Dateien gespeichert. Diese Grafikdateien wurden in das Programm “ImageJ®” importiert. Mit Hilfe von ImageJ® wurde densitometrisch (auf der Basis von Breite und Intensität der Banden) der spezifische Proteingehalt quantifiziert (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012). Zur Normalisierung wurden, wie oben erwähnt, die Proteine GAPDH oder Tubulin verwendet.

Die Quantifizierung mit ImageJ® wurde für jedes Protein an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, um intraindividuelle Varianzen zu berücksichtigen. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet, welcher für den jeweiligen Versuchstag, beziehungsweise die jeweilige Membran, den Ergebniswert darstellte. Dieser Ergebniswert wurde mit den Ergebniswerten der Proteinbestimmung dieses Proteins an den anderen Versuchstagen verglichen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet ($n = 2-5$).

Der spezifische Proteingehalt wurde dahingehend untersucht, ob er sich 24 h nach Scheinbestrahlung zwischen den scheinbestrahlten (unbestrahlten) CX- Zellen und scheinbestrahlten CX+ Zellen unterschied (Vergleich von CX- unbestr. mit CX+ unbestr., gepaarter t-Test) und ob er innerhalb der Subzelllinien einer strahleninduzierten Veränderung unterlag (Vergleich von CX- unbestr. mit CX- bestr. und Vergleich von CX+ unbestr. mit CX+ bestr., gepaarter t-Test, siehe Tab. 16). Auch in bestrahlten Zellen wurden die Proteingehalte 24 h nach der Bestrahlung ermittelt. Für die Signifikanztests wurden zweiseitige t-Test der Software “Microsoft Office 365 Excel” verwendet.

Tab. 16: Durchgeführte Vergleiche der Proteinexpressionen

Vergleich der Proteingehalte „A” und „B”		
Proteingehalt A	Proteingehalt B	Statistik
CX- unbestr.	CX+ unbestr.	Zweiseitiger, gepaarter t-Test
CX- unbestr.	CX- bestr.	Zweiseitiger, gepaarter t-Test
CX+ unbestr.	CX+ bestr.	Zweiseitiger, gepaarter t-Test

Der Nachweis von Signifikanz bei einer geringen Anzahl von Versuchswiederholungen, wie sie hier vorlag, ist nur bei großen strahleninduzierten Veränderungen oder großen Unterschieden zwischen den Subzelllinien möglich. Um bei der Darstellung der Ergebnisse und der Diskussion Proteine nicht unberücksichtigt zu lassen, deren Unterschiede bzw. Veränderungen zu gering waren, um bei den gegebenen geringen Fallzahlen statistische Signifikanz aufweisen zu können, wurde in den Fällen, in denen kein statistischer Trend oder keine statistische Signifikanz nachgewiesen wurde, ein Vergleich der Mittelwerte der Western-Blot-Ergebnisse angestellt.

Die Bestimmung des zytosolischen Hsp70-Gehalts der Subzelllinien half dabei zur Findung eines Wertes (Grenzwertes), ab dem ein Ergebnis innerhalb einer Subzelllinie oder zwischen den Subzelllinien im relativen Mittelwertvergleich als verändert oder unterschiedlich zu bewerten war. Vorhergehende Studien zeigten, dass sich die zytosolische Hsp70-Expression zwischen nicht gestressten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ nicht unterscheidet (Gastpar et al., 2005; Gehrman et al., 2005). Die im Experiment beobachtete relative Abweichung von zytosolischem Hsp70 zwischen den scheinbestrahlten Subzelllinien ($A(\text{Hsp70})$) wurde daher als Anhaltspunkt für die Ungenauigkeit der Proteinbestimmung verwendet. Unterschiede der Proteinexpression zwischen den Subzelllinien oder strahleninduzierte Veränderungen der Proteinexpressionen, die geringer ausfielen als $A(\text{Hsp70}) + 25\%$ dieses Wertes ($0,25 \times A(\text{Hsp70})$), wurden als mögliche Folgen der Ungenauigkeit bewertet und sind daher im Ergebnisteil nicht als unterschiedlich oder strahleninduziert verändert aufgeführt. Die relativen Mittelwerte werden im Folgenden bei der Darstellung der Ergebnisse darüber hinaus auch dann besonders erwähnt, wenn sich die oben ermittelten Quotienten zwischen den beiden Subzelllinien um mindestens $120\% \times A(\text{Hsp70})$ unterschieden. Liegt für CX- Zellen beispielsweise ein Quotient (CX- bestr./CX- unbestr.) von 0,90 vor, für CX+ Zellen von 1,16, so unterscheiden sich die Quotienten um 26%. Dieses Ergebnis würde als Veränderung/Unterschied erwähnt werden, wenn $120\% \times A(\text{Hsp70}) \leq 26\%$ wäre. Falls $120\% \times A(\text{Hsp70}) > 26\%$ wäre,

würde die Abweichung zwischen den Subzelllinien als mögliche Folge der Ungenauigkeit der Methodik interpretiert und im Ergebnisteil nicht als Unterschied beschrieben werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 BASALE mHSP70-EXPRESSION

Um die basale mHsp70-Expression der Subzelllinien CX- und CX+ vor ihrer Bestrahlung zu bestimmen, wurde am Tag der Bestrahlung (zwei Tage nach dem Passagieren) eine FACS-Analyse durchgeführt. Durch sieben Versuche an drei Versuchstagen konnte gezeigt werden, dass ein Unterschied in der mHsp70-Expression zwischen den Subzelllinien bei hohen Passagezahlen (Passage 103 bis Passage 127) noch immer gewährleistet war. Der Anteil an mHsp70 positiven (mHsp70+) Zellen in der CX+ Subzelllinie betrug $71 \% \pm 6 \%$ ($n = 7$), in CX- Zellen $59 \% \pm 11 \%$ ($n = 7$). Der Anteil von mHsp70+ Zellen war in der CX+ Subzelllinie am Tag der Bestrahlung gegenüber der CX- Subzelllinie damit signifikant erhöht (zweiseitiger, gepaarter t-Test, $p = 0,014$, Abb. 7).

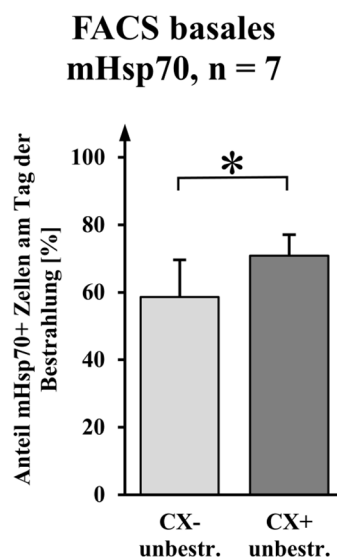


Abb. 7: Unterschiede in der basalen mHsp70 Expression in den unbestrahlten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ am Tag der Bestrahlung. In der CX+ Subzelllinie wiesen signifikant mehr Zellen mHsp70 auf als in der Subzelllinie CX- ($p = 0,014$).

3.2 STRAHLENINDUZIERTE VERÄNDERUNGEN DES mHsp70+ ANTEILS

Einen Tag (24 h) nach der Bestrahlung mit 10 Gy erfolgte die Bestimmung des Prozentsatzes von mHsp70+ Zellen durch eine FACS-Analyse. Untersucht wurden, an zwei Tagen in vier Versuchen, bestrahlte Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ (bestr.) sowie deren scheinbestrahlte Kontrollen (unbestr.).

In der Subzelllinie CX- war ein strahleninduzierter Trend zur Zunahme des membrangebundenen Hsp70 erkennbar. Der Anteil mHsp70+ Zellen erhöhte sich in dieser Subzelllinie durch die Bestrahlung im Durchschnitt von $67\% \pm 6\%$ (CX- unbestr. 24 h nach der Scheinbestrahlung) auf $84\% \pm 8\%$ (CX- bestr. 24 h nach der Bestrahlung, $n = 4$, zweiseitiger t-Test, $p = 0,07$, Abb. 8). Dem entgegen wurde in den CX+ Zellen nach Bestrahlung ein unveränderter Anteil mHsp70 positiver Zellen festgestellt (Anteil mHsp70+ Zellen in CX+ unbestr.: $76\% \pm 6\%$, nach Bestrahlung (CX+ bestr.): $65\% \pm 10\%$, $n = 4$, zweiseitiger t-Test, $p > 0,10$).

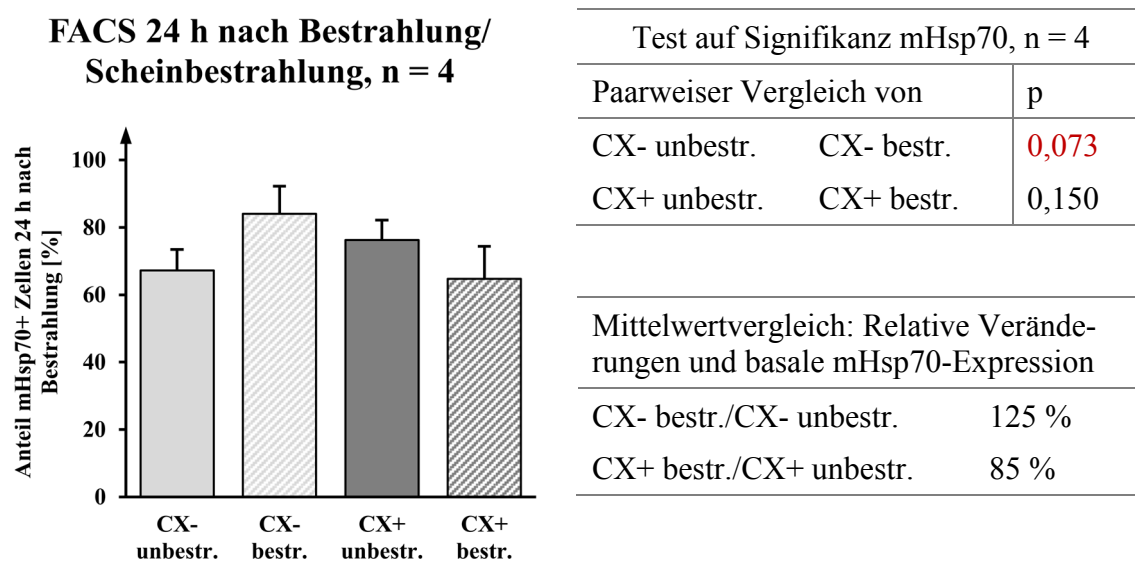


Abb. 8: Anteil mHsp70+ Zellen in den Subzelllinien CX- und CX+ 24 h nach Bestrahlung oder Scheinbestrahlung. Nach Bestrahlung zeigte sich ein Trend zur erhöhten Expression von mHsp70 nur in Zellen der Subzelllinie CX- ($p = 0,07$).

Im Folgenden soll beleuchtet werden, inwiefern die strahleninduziert vermehrte Expression von mHsp70 auf Zellen der Subzelllinie CX-, oder die unveränderte Expression des Proteins auf Zellen der Subzelllinie CX+, mit zytosolischem Hsp70 oder Cripto-1-abhängigen Proteinen in Zusammenhang steht. Dazu wurden mittels Western Blots die Expressionen von zytosolischem Hsp70 sowie die Expressionen von Schlüsselproteinen in Cripto-1-abhängigen Signalwegen quantifiziert.

3.3 WESTERN BLOTS

Die bestrahlten (bestr.) und scheinbestrahlten (unbestr.) Zellen wurden dahingehend untersucht, ob die Unterschiede und Veränderungen der mHsp70-Expression mit Veränderungen der Expression zytosolischer Proteine der Cripto-1-abhängigen Signalwege sowie einer veränderten zytosolischen Hsp70-Proteinexpression einhergingen. Dabei wurde betrachtet, ob sich die Proteinexpressionen zwischen den scheinbestrahlten Subzelllinien unterschieden (Vergleich der „basalen“ Proteingehalte von CX- unbestr. mit CX+ unbestr., 24 h nach der Scheinbestrahlung) und ob innerhalb einer Subzelllinie nach Bestrahlung eine veränderte Proteinexpression vorlag (strahleninduzierte Veränderungen des Proteingehalts, Vergleich von CX- unbestr. mit CX- bestr. und Vergleich von CX+ unbestr. mit CX+ bestr., jeweils 24 h nach der Scheinbestrahlung bzw. Bestrahlung). Da der Nachweis von signifikanten Unterschieden bei geringer Wiederholungsanzahl, wie in dieser Arbeit gegeben, nur bei starken Unterschieden in den Expressionsraten möglich ist, wurde ebenfalls untersucht, ob sich die Mittelwerte der Proteinexpressionen der Experimente basal oder nach der Bestrahlung voneinander unterschieden. Um diese Beurteilung vornehmen zu können, wurde über die Bestimmung von zytosolischem Hsp70 ein Grenzwert ermittelt, unterhalb dessen beim Vergleich von Mittelwerten von keiner Veränderung oder keinem Unterschied gesprochen werden soll (siehe 2.2.4.5). Die Proteinbestimmungen wurden für die Zellen der Subzelllinie CX- (Passage 107) und CX+ (Passage 127) durchgeführt.

3.3.1 Festlegung eines Grenzwerts für Mittelwertvergleiche

Zunächst wurde der Gehalt an zytosolischem Hsp70 zwischen den beiden scheinbestrahlten Subzelllinien CX- und CX+ verglichen, welcher sich zwischen den beiden Subzelllinien in vorangegangenen Studien nicht unterschied (Gastpar et al., 2005; Gehrman, Liebisch, et al., 2008; Gehrman et al., 2005). In CX+ Zellen zeigte sich eine Hsp70-Expression, welche 16 % (= A(Hsp70)) geringer ausfiel als in CX- Zellen (CX+ unbestr./CX- unbestr. = 84 %, $p = 0,580$, Tab. 17). Da der zu findende Grenzwert, ab welchem eine Veränderung/ein Unterschied diskutiert werden soll, 25 % und damit absolut 4 % ($0,25 * 0,16$) größer sein soll als der im Western Blot ermittelte Wert, wurde ein Grenzwert von $16 \% + 4 \% = 20 \%$ ermittelt. Beträgt die Abweichung einer Proteinexpression (innerhalb einer Subzelllinien oder zwischen den beiden Subzelllinien) weniger als 20 %, wird daher von keinem Unterschied/keiner Regulation einer Proteinexpression

gesprochen, beträgt eine Abweichung $\geq 20\%$, so wird diese im Folgenden als Veränderung/Unterschied bezeichnet (Tab. 18).

Tab. 17: Gehalt an zytosolischem Hsp70 in scheinbestrahlten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+. Der Gehalt an Hsp70 unterschied sich zwischen den Subzelllinien in vorhergehenden Studien nicht. In CX+ Zellen zeigte sich eine zytosolische Hsp70-Expression, welche 16 % geringer ausfiel als in CX- Zellen.

	Mittelwertvergleich	Paarweiser Vergleich
Protein	CX+ unbestr./CX- unbestr.	p
Hsp70	0,84	0,580

Tab. 18: Vergleich der Proteinexpressionen durch den Vergleich von Mittelwerten, für die Fälle, in denen keine statistischen Trends oder Signifikanzen ermittelt werden konnten. $\overline{CX+unbestr.}$ = Mittelwert der Ergebnisse von CX+ unbestr., $\overline{CX-unbestr.}$ = Mittelwert der Ergebnisse von CX- unbestr., $\overline{CX+bestr.}$ = Mittelwert der Ergebnisse von CX+ bestr., $\overline{CX-bestr.}$ = Mittelwert der Ergebnisse von CX- bestr..

Vergleich der Proteingehalte „A“ und „B“ auf Basis der Mittelwerte	
Wenn	Dann/Interpretation
$0,80 \geq \frac{\overline{CX+unbestr.}}{\overline{CX-unbestr.}} \geq 1,20$	Unterschiedliche basale Proteinexpressionen der CX- und CX+ Subzelllinien
$0,80 \geq \frac{\overline{CX-bestr.}}{\overline{CX-unbestr.}} \geq 1,20$	Strahleninduzierte Veränderung der Proteinexpression in CX- Zellen
$0,80 \geq \frac{\overline{CX+bestr.}}{\overline{CX+unbestr.}} \geq 1,20$	Strahleninduzierte Veränderung der Proteinexpression in CX+ Zellen

Darüber hinaus werden die Mittelwerte bei der Darstellung der Ergebnisse auch dann besonders erwähnt, wenn sich die oben ermittelten Quotienten zwischen den beiden Subzelllinien um mindestens 20 % voneinander unterschieden. Liegt für CX- Zellen beispielsweise ein Quotient von 0,90 vor, für CX+ Zellen von 1,16, so unterscheiden sich die Quotienten um 26 %, sodass dies als Unterschied bezeichnet wird. Falls der Quotient der CX- Zellen 0,90 beträgt und der der CX+ Zellen 1,06, so würden sich die Quotienten um nur 16 % unterscheiden und fänden damit bei der Darstellung der weiteren Ergebnisse und in der Diskussion keine weitere Beachtung.

3.3.2 Vergleich der basalen Proteingehalte der beiden Subzelllinien

Es wurden die Expressionen von Proteinen von Cripto-1-abhängigen Signalwegen (GRP78, SMAD2/3, SMAD4, PI3K, Akt) in scheinbestrahlten Zellen bestimmt. Für keines der Proteine zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der basalen Expressionsrate zwischen den Subzelllinien. Der Quotient der Proteinbestimmungen von CX+ unbestr./CX- unbestr. betrug für GRP78 1,00 ($p = 0,986$), für SMAD2/3 1,36 ($p = 0,194$), für SMAD4 1,00 ($p = 0,984$), für PI3K 0,77 ($p = 0,484$) und für das Protein Akt 0,69 ($p = 0,264$). Wenngleich keine statistische Signifikanz vorlag, zeigte der mit dem Grenzwert von 20 % getätigte Mittelwertvergleich der Proteinexpressionen in CX- und CX+ Zellen eine erhöhte basale Expression von SMAD2/3 in scheinbestrahlten Zellen der Subzelllinie CX+. In CX+ Zellen waren außerdem die Proteinexpressionen von PI3K und Akt vermindert. Für die Proteine GRP78 und SMAD4 wurden keine Unterschiede in den basalen Expressionen beobachtet (Tab. 19).

Tab. 19: Vergleich der basalen Proteinexpressionen der Subzelllinien CX- und CX+. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subzelllinien detektierbar ($p > 0,05$). Ein Vergleich der Mittelwerte zeigte Unterschiede ($\geq 20\%$) zwischen den Subzelllinien. Eine erhöhte basale Expression von SMAD 2/3 in CX+ Zellen war ebenso zu beobachten wie eine verminderte Expression von Akt und PI3K in dieser Subzelllinie.

Protein	Mittelwertvergleich	Paarweiser Vergleich	Protein	Mittelwertvergleich	Paarweiser Vergleich
	CX+ unbestr./CX- unbestr.	p		CX+ unbestr./CX- unbestr.	p
Hsp70	0,84	0,580	SMAD4	1,00	0,984
GRP78	1,00	0,986	PI3K	0,77	0,484
SMAD2/3	1,36	0,194	Akt	0,69	0,264

3.3.3 Strahleninduzierte Veränderungen der Proteingehalte

Um eine strahleninduzierte Veränderung eines Proteingehalts zu beurteilen, wurden 24 h nach Bestrahlung oder Scheinbestrahlung Zellen zur späteren Proteinisolation gewonnen. Durch einen gepaarten t-Test wurde untersucht, ob eine strahleninduzierte Veränderung einer Expression vorliegt, indem die Gehalte von scheinbestrahlten und bestrahlten Zellen einer Subzelllinie verglichen wurden. Konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden, fand ein Mittelwertvergleich statt (siehe 3.3.1). Dazu wurde die basale Expression eines Proteins (die Expression in den scheinbestrahlten Zellen) mit 100 % quantifiziert und die relative Abweichung der bestrahlten Zellen davon betrachtet.

3.3.3.1 Zytosolisches Hsp70

Die zytosolische Hsp70-Expression unterschied sich 24 h nach Scheinbestrahlung zwischen unbestrahlten (scheinbestrahlten) CX- und CX+ Zellen nicht, obwohl in CX+ Zellen ein erhöhter Anteil an mHsp70+ Zellen vorlag. Es wurde untersucht, ob sich 24 h nach Scheinbestrahlung/Bestrahlung ein Unterschied der zytosolischen Hsp70-Expression zwischen bestrahlten und scheinbestrahlten Zellen zeigte und ob sich dieser zwischen den Subzelllinien CX- und CX+ unterschied.

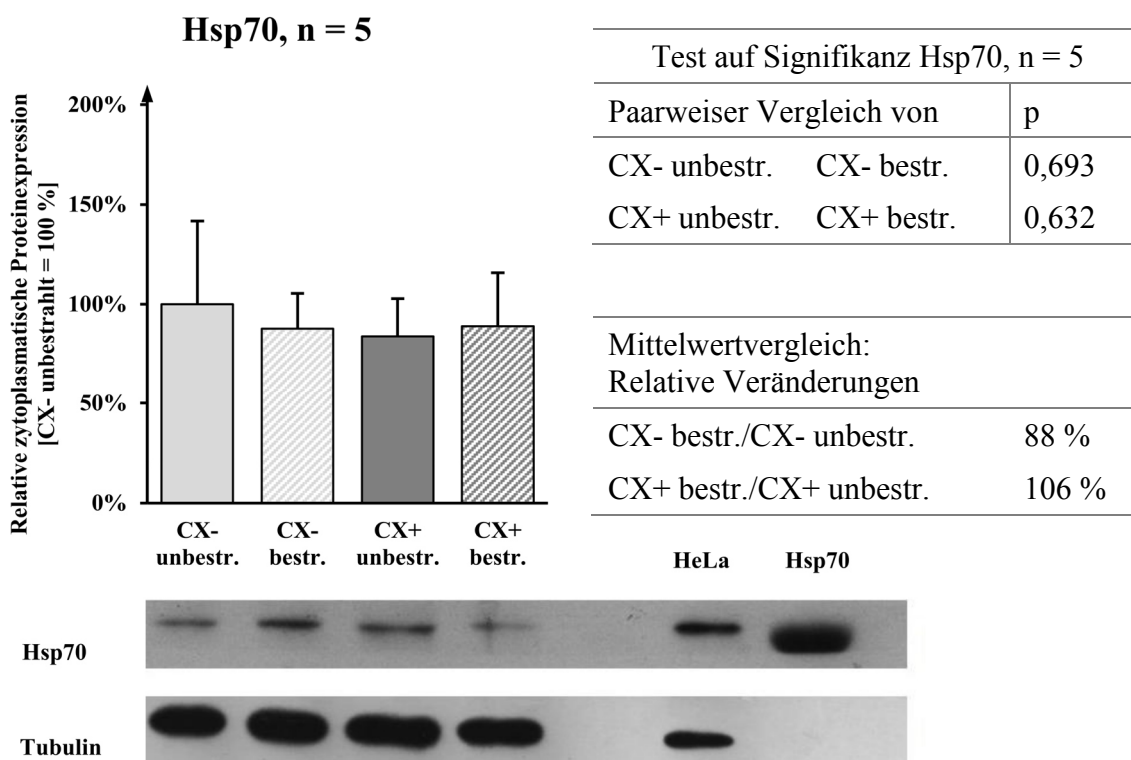


Abb. 9: Western Blot: Proteinbestimmungen von Hsp70 in scheinbestrahlten und bestrahlten Zellen der Subzelllinien CX- und CX+, in der Grafik normiert auf CX- unbestr. = 100 %. Positivkontrollen: Hsp70-Protein und HeLa-Zelllysate; n = 5. Zwischen bestr. und unbestr. Zellen innerhalb der Subzelllinien CX- und CX+ waren keine unterschiedlichen Hsp70-Expressionen zu beobachten.

In keiner der Subzelllinien zeigte sich eine strahleninduzierte signifikante Veränderung der Hsp70-Expression (CX-: $p = 0,693$, CX+: $p = 0,632$, zweiseitiger, gepaarter t-Test, Abb. 9). Bei dem anschließenden Mittelwertvergleich wurde die basale Expression des Proteins mit 100 % quantifiziert. Ausgehend von einer Expression von 100 % in unbestr. CX- Zellen betrug diese in bestr. CX- Zellen 88 %. In CX+ Zellen war (basierend auf CX+ unbestr. = 100 %) nach der Bestrahlung eine Expression von 106 % festzustellen und damit für beide Subzelllinien keine strahleninduzierte Veränderung erkennbar (Mittelwertdifferenzen stets < 20 %, Abb. 9).

Die strahleninduzierte Erhöhung des mHsp70-Anteils auf CX- Zellen wurde demnach nicht von einer vermehrten zytosolischen Hsp70-Menge in den Zellen begleitet, denn auch die basalen Expressionen von zytoplasmatischem Hsp70 unterscheiden sich zwischen den Subzelllinien nicht (Gehrmann et al., 2005).

Aufgrund dieser Ergebnisse können die unterschiedlichen Resistenzen der Subzelllinien CX- und CX+ gegenüber Bestrahlung nicht direkt auf unterschiedliche Mengen an zytosolischem Hsp70 zurückzuführen sein. Um der Frage nachzugehen, ob Cripto-1-abhängige Signalwege in die Resistenzvermittlung involviert sind, wurden im Folgenden Schlüsselproteine dieser Signalwege quantifiziert.

3.3.3.2 Proteine Cripto-1-abhängiger Signalwege

In bestrahlten und scheinbestrahlten CX- und CX+ Zellen wurden die zytosolischen Proteingehalte von GRP78, SMAD2/3, SMAD4, PI3K und Akt mittels Western Blots bestimmt und deren strahleninduzierte Veränderungen verglichen, wie unter 3.3.3 beschrieben.

3.3.3.2.1 GRP78

Bei vergleichbaren basalen Expressionswerten des Hitzeschockproteins GRP78 in scheinbestrahlten CX- und CX+ Zellen zeigte sich der Proteingehalt in bestrahlten CX- Zellen nahezu unverändert (CX- unbestr. 100 % vs. CX- bestr. 117 %, $p = 0,348$, Mittelwertdifferenz < 20 %). In der CX+ Subzelllinie war hingegen ein signifikanter, strahleninduzierter Unterschied im Gehalt von GRP78 zu verzeichnen (Steigerung von 100 % auf 115 %, $p = 0,004$, Abb. 10).

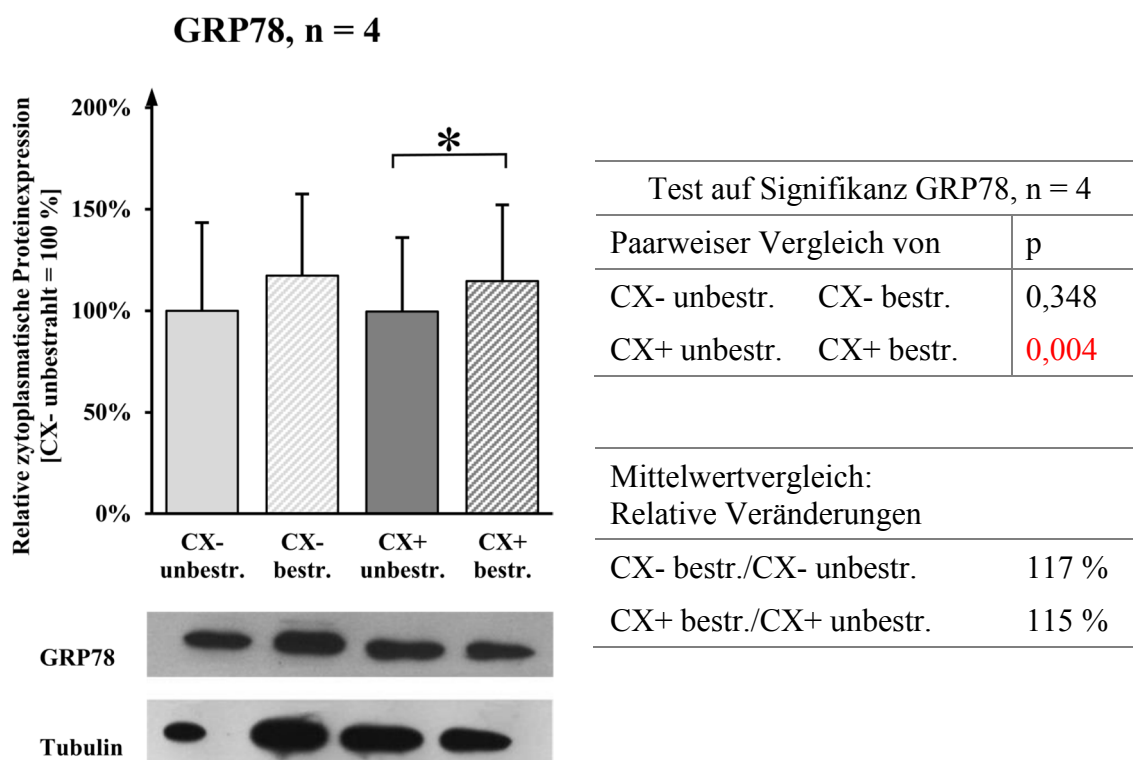


Abb. 10: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von GRP78, in der Grafik normiert auf CX- unbestr. = 100 %. Vergleichbare basale Expressionsraten zwischen der CX- und CX+ Subzelllinie. Signifikante strahleninduzierte Erhöhung des GRP 78-Gehalts in CX+ Zellen, nicht jedoch in CX- Zellen.

Das Protein GRP78 ist für Cripto-1-abhängige Signalwege essentiell. Im Folgenden werden die Expressionen von weiteren Proteinen dargestellt, welche in Cripto-1-abhängige Signalwege involviert sind.

3.3.3.2.2 SMAD2/3

Beim Vergleich von unbestrahlten CX- und CX+ Zellen zeigte sich ein nicht signifikant erhöhter SMAD2/3-Gehalt in Zellen der Subzelllinie CX+. In beiden Subzelllinien wurden diese zentralen Proteine des TGF β -Signalwegs innerhalb von 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy nicht signifikant reguliert. Dennoch ist durch den Vergleich der Mittelwerte festzustellen, dass die Menge SMAD2/3-Protein in CX- Zellen nach der Bestrahlung gegenüber deren scheinbestrahlten Kontrollen etwas erhöht war (CX- unbestr. = 100 % vs. CX- bestr. = 112 %, $p = 0,295$), während sich in den CX+ Zellen strahleninduziert eher verringerte Proteingehalte nachweisen ließen (CX+ unbestr. = 100 % vs. CX+ bestr. = 90 %, $p = 0,668$). Zwischen den bestrahlten Subzelllinien waren die SMAD2/3-Gehalte vergleichbar (Abb. 11).

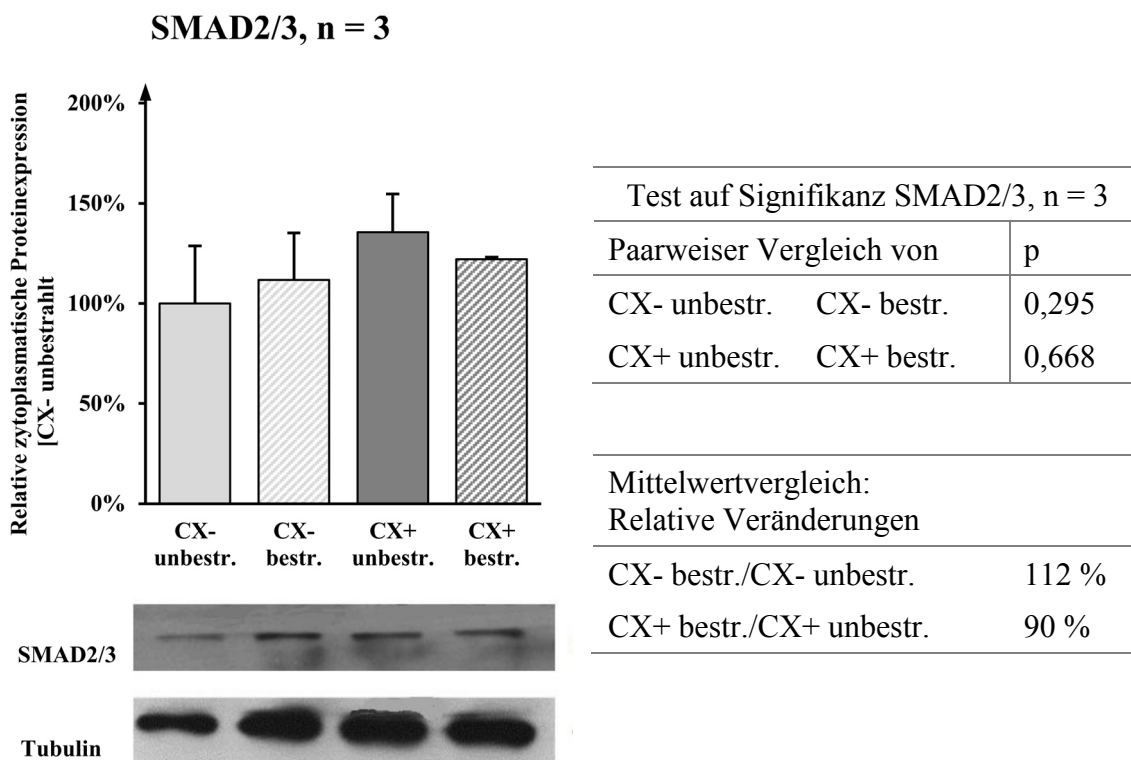


Abb. 11: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von SMAD2/3, in der Grafik normiert auf CX- unbestr. = 100 %. Eine erhöhte basale Expressionsrate der CX+ Subzelllinie war zu erkennen, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. Ebenfalls war eine geringe strahleninduzierte Erhöhung der Proteinexpression in CX- Zellen sowie eine leichte strahleninduzierte Verringerung derer in CX+ Zellen zu verzeichnen.

3.3.3.2.3 SMAD4

Die Proteinmenge von SMAD4 unterschied sich zwischen den unbestrahlten CX- und CX+ Zellen nicht. In beiden Subzelllinien wurde die Expression des Proteins, welches in TGF β -Signalwegen SMAD2/3 nachgeschaltet ist, innerhalb von 24 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy nicht signifikant gesteigert oder gesenkt. Beim Vergleich der Mittelwerte der SMAD4-Expressionen war jedoch, wie auch für SMAD2/3, zu beobachten, dass der durchschnittliche Gehalt des Proteins in bestrahlten CX- Zellen tendenziell eher höher lag als in den scheinbestrahlten Kontrollen (CX- unbestr. = 100 % vs. CX- bestr. = 114 %, $p = 0,321$), während er in den Zellen der Subzelllinie CX+ eher vermindert vorlag (CX+ unbestr. = 100 % vs. CX+ bestr. = 80 %, $p = 0,331$, Abb. 12).

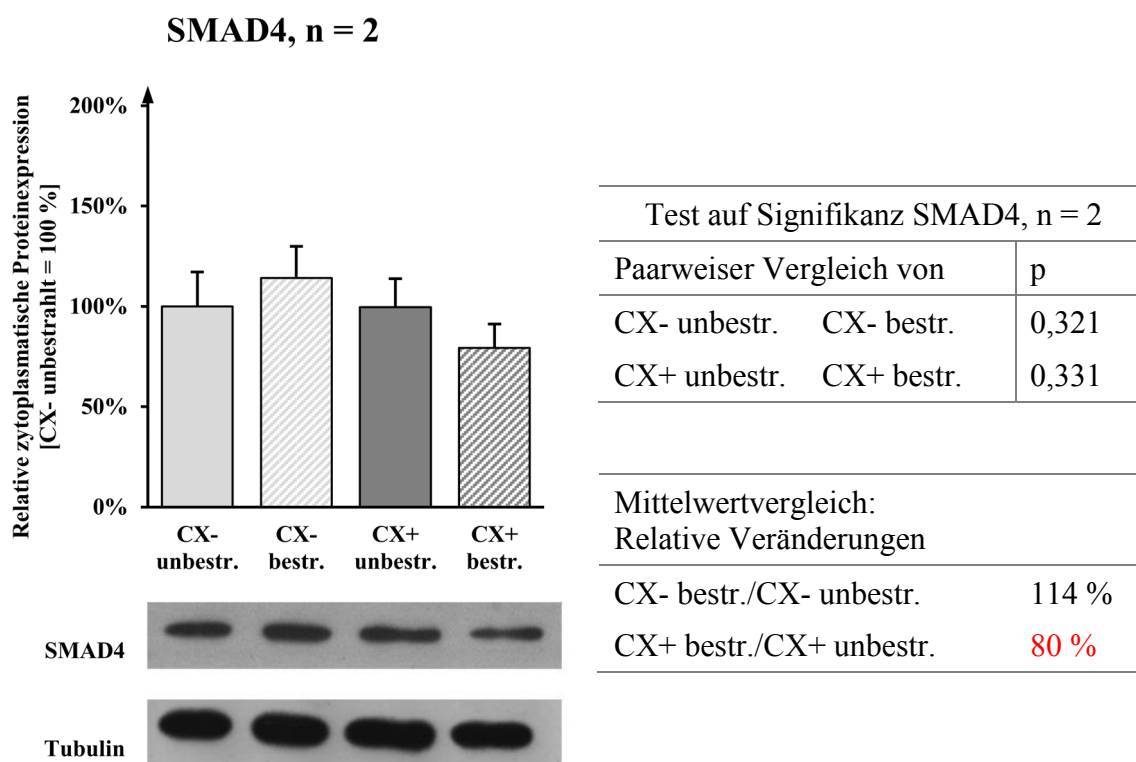


Abb. 12: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von SMAD4, in der Grafik normiert auf CX- unbestr. = 100 %. Es ließen sich vergleichbare basale Expressionsraten zwischen der CX- und der CX+ Subzelllinie sowie keine signifikanten strahleninduzierten Veränderungen in beiden Subzelllinien finden. Dennoch ist in bestrahlten CX- Zellen tendenziell eine Zunahme, in CX+ Zellen eine Abnahme der SMAD4-Expression zu erkennen.

Neben Unterschieden in den Expressionen der SMAD-Proteine wurden die Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ im Folgenden auf die Gehalte von zentralen Proteinen SMAD-unabhängiger Cripto-1-abhängiger Signalwege untersucht.

3.3.3.2.4 PI3K

Die Mengen der Kinase PI3K unterschieden sich zwischen den scheinbestrahlten CX- und CX+ Zellen nicht signifikant. Beim Vergleich der Mittelwerte war jedoch eine verminderte Expression in CX+ Zellen zu verzeichnen. In beiden Subzelllinien wurde die Expression der Kinase, welche unter anderem auch durch Cripto-1-abhängige Signalwege aktiviert werden kann, innerhalb von 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy nicht signifikant gesteigert oder gesenkt. Der Vergleich der Mittelwerte zeigte für das Protein PI3K eine verminderte Expression in bestrahlten CX- Zellen, wenn diese mit scheinbestrahlten Kontrollen verglichen wurden (CX- unbestr. = 100 % vs. CX- bestr. = 67 %, $p = 0,474$). Eine eher verminderte Proteinmenge *post radiationem* konnte auch in CX+ Zellen vorgefunden werden, jedoch betrug diese Veränderung weniger als 20 % (CX+ unbestr. = 100 % vs. CX+ bestr. = 82 %, $p = 0,415$). Die stärkere strahleninduzierte Reduktion der Proteinexpression in CX- Zellen bei einer erhöhten basalen Expressionsrate führte zum Angleich der PI3K-Expressionsraten der beiden Subzelllinien nach Bestrahlung (Abb. 13).

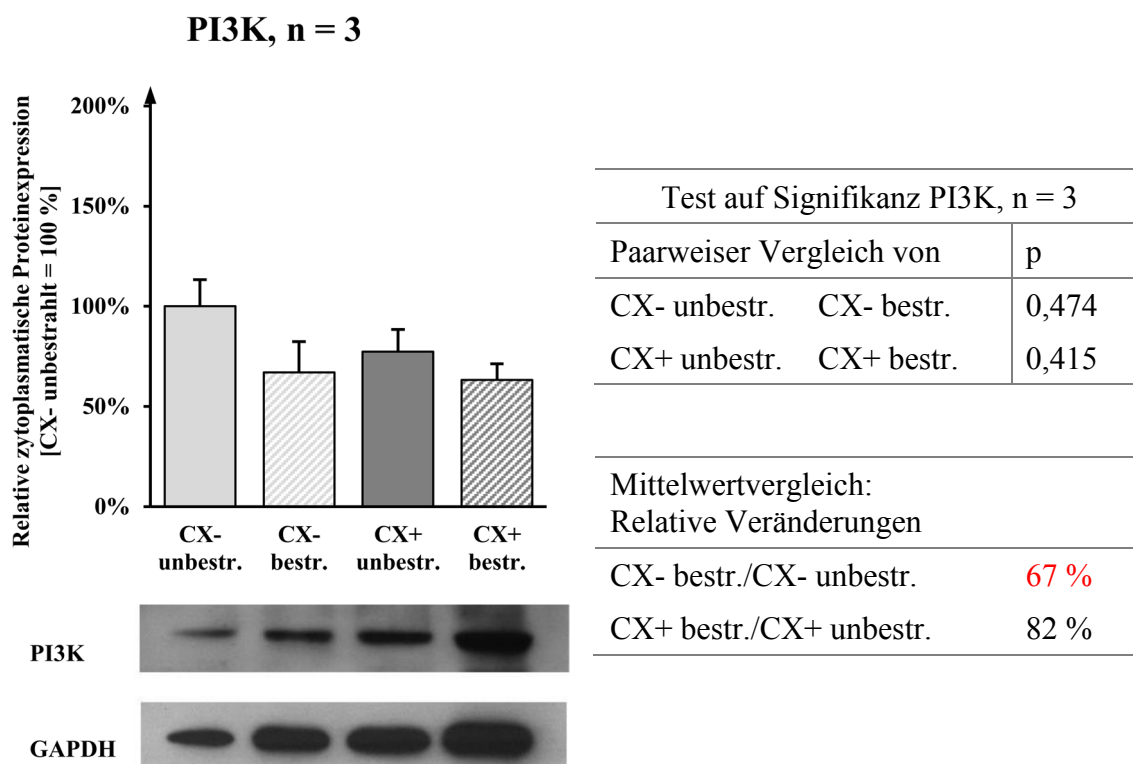


Abb. 13: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von PI3K, in der Grafik normiert auf CX- unbestr. = 100 %. Basal war eine geringere PI3K-Expressionsrate in CX+ Zellen zu erkennen, die basalen Expressionsraten unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen der CX- und CX+ Subzelllinie. In beiden Subzelllinien wurden keine signifikanten, strahleninduzierten Veränderungen beobachtet. Dennoch zeigte der Vergleich der Mittelwerte eine strahleninduziert verminderte Expression der PI3K, besonders in den Zellen der Subzelllinie CX-.

3.3.3.2.5 Akt

Der zytosolische Gehalt der pro-proliferativ und anti-apoptotisch wirkenden Protein-kinase B (Akt, PKB) unterschied sich zwischen scheinbestrahlten CX- und CX+ Zellen nicht signifikant. Wurden die Mittelwerte der basalen Akt-Expressionen der beiden Subzelllinien verglichen, war jedoch eine stärkere basale Expression der Kinase in CX- Zellen zu beobachten. Während sich die Akt-Expression in den CX- Zellen durch die Bestrahlung nicht signifikant änderte, zeigte sich in den CX+ Zellen ein statistischer Trend zu einer erhöhten Expression (CX+ unbestr. = 100 % vs. CX+ bestr. = 120 %, $p = 0,060$) (Abb. 14). Beim Vergleich der mittleren Proteinexpressionslevel in CX- Zellen war dementsprechend eine strahleninduzierte Abnahme der Akt-Expression zu verzeichnen, welche jedoch, wie oben erwähnt, keine statistische Signifikanz aufwies (CX- unbestr. = 100 % vs. CX- bestr. = 73 %, $p = 0,301$).

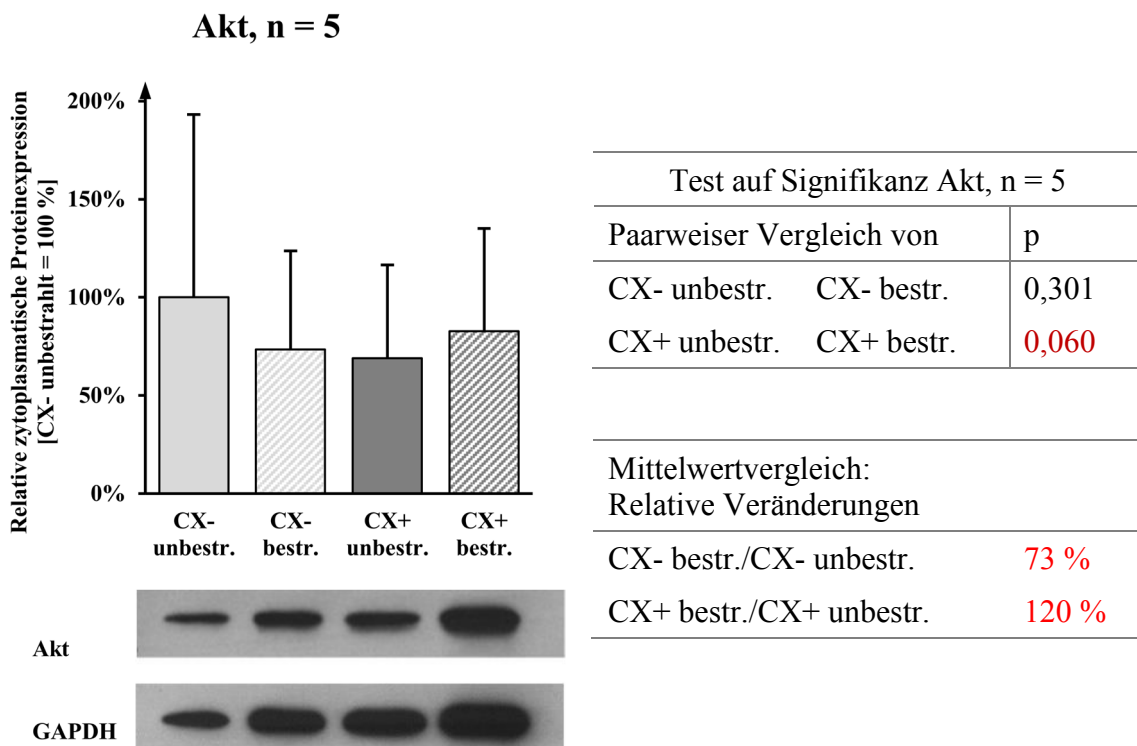


Abb. 14: Western Blot: Zytosolische Proteinexpression von Akt, in der Grafik normiert auf CX- unbestr. = 100 %. Basal lag eine geringere Akt-Expressionsrate in CX+ Zellen vor, welche sich jedoch nicht signifikant von der in CX- Zellen unterschied. In beiden Subzelllinien wurden keine signifikanten strahleninduzierten Veränderungen beobachtet. Ein Vergleich der Mittelwerte zeigte jedoch eine strahleninduziert verminderte Akt-Expression in CX- Zellen, eine erhöhte in CX+ Zellen.

Auch hinsichtlich der Proteingehalte von PI3K und Akt waren demnach Unterschiede zwischen den Subzelllinien zu verzeichnen. Die erhaltenen Ergebnisse sollen im Folgenden kurz zusammengefasst und ihre Bedeutung im Anschluss daran diskutiert werden.

3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In unbestrahlten humanen Kolonkarzinomzellen (CX2) korrelierten erhöhte mHsp70-Anteile (CX+) mit einer verstärkten SMAD2/3 Expression sowie mit geringeren Proteingehalten von PI3K und Akt. Vierundzwanzig Stunden nach Röntgenbestrahlung mit einer subletalen Dosis von 10 Gy wurde in CX+ Zellen der Anteil mHsp70+ Zellen nicht mehr gesteigert, jedoch steigerte sich die Expression von GRP78 in diesen Zellen signifikant. Proteine von TGF β -Signalwegen (SMAD2/3 und -4) waren nach der Bestrahlung eher vermindert vorzufinden, während die Kinasen PI3K und Akt in CX+ Zellen (im Vergleich mit CX- Zellen) vermindert reprimiert (PI3K) oder vermehrt (Akt) vorzufinden waren. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen mit ursprünglich geringerer mHsp70-Expression (CX- Zellen) nach der Bestrahlung ein gesteigerter Anteil mHsp70+ Zellen detektiert werden. Es konnte keine vermehrte Expression von GRP78 gezeigt werden. Die Mengen von exprimierten SMADs (2/3/4) stiegen eher an, die der Kinasen PI3K und Akt verringerten sich (Abb. 15).

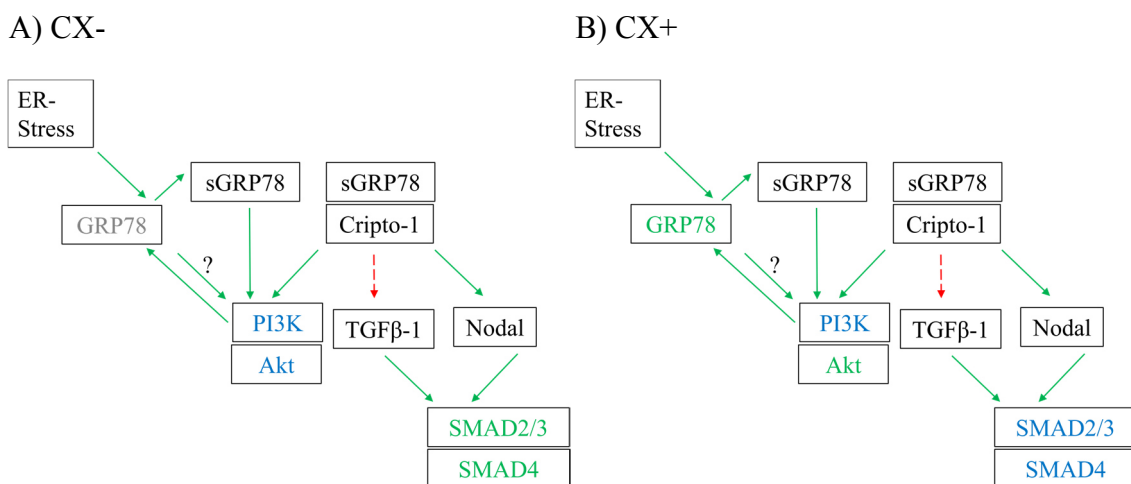


Abb. 15: Zusammenfassung der strahleninduzierten Veränderungen der Proteinexpressionen. Grüner Pfeil, durchgezogene Linie: Aktivierung/positive Regulation; roter Pfeil, gestrichelte Linie: Hemmung/negative Regulation; **grüne Schrift:** Nach der Bestrahlung verstärkt exprimiert; **blaue Schrift:** Nach der Bestrahlung vermindert exprimiert; **graue Schrift:** Nach der Bestrahlung unverändert exprimiert; schwarze Schrift: Keine Proteinbestimmung. A) Zusammenfassung der Western Blot Ergebnisse für die Subzelllinie CX-. Nach der Bestrahlung mit 10 Gy war keine vermehrte Expression von GRP78 vorzufinden. Die Proteine SMAD2/3 und SMAD4 waren eher vermehrt, PI3K und Akt eher vermindert exprimiert. B) Zusammenfassung der Western Blot Ergebnisse für die Subzelllinie CX+. Die Expression von GRP78 war nach Bestrahlung mit 10 Gy signifikant erhöht. Proteine von TGF β -Signalwegen (SMAD2/3 und SMAD4) sowie PI3K waren eher vermindert vorzufinden, die Kinase Akt wurde nach Bestrahlung vermehrt exprimiert.

4 DISKUSSION

4.1 BASALE UND STRAHLENINDUZIERTER mHSP70-EXPRESSION

Durch die Bestimmung des mHsp70 Anteils auf Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Subzelllinien am Tag der Bestrahlung hinsichtlich ihres Anteils an mHsp70+ Zellen signifikant unterschieden. Einen Tag (24 h) nach der Bestrahlung mit 10 Gy war in der Subzelllinie CX- ein strahleninduzierter Trend zur Zunahme des membrangebundenen Hsp70 erkennbar, während dies in den Zellen mit basal erhöhtem mHsp70-Anteil nicht zu erkennen war. Als Kontrollen dienten dabei scheinbestrahlte (unbestrahlte) Zellen der jeweiligen Subzelllinie, deren Anteil mHsp70+ Zellen 24 h nach der Scheinbestrahlung ermittelt wurde. Diese Beobachtungen wurden für CX- und CX+ Zellen bereits 2005 beschrieben, wobei auch gezeigt werden konnte, dass ein strahleninduziert erhöhter Anteil von mHsp70 positiven Zellen in der Subzelllinie CX- mit einer erhöhten Dichte von mHsp70 auf der Zellmembran dieser Zellen einhergeht (Gehrmann et al., 2005). Nach der Bestrahlung mit 10 Gy wiesen CX- Zellen ähnlich hohe Anteile mHsp70+ Zellen auf wie unbestrahlte CX+ Zellen. In der Arbeit von Gehrmann et al. aus dem Jahr 2005 unterschieden sich die Anteile mHsp70+ Zellen zwischen den Subzelllinien vor und nach der Bestrahlung. Allerdings differierten in diesen Untersuchungen die Anteile mHsp70+ Zellen vor der Bestrahlung zwischen den Subzelllinien stärker (CX+ > 80 %, CX- < 20 %) (Gehrmann et al., 2005). Eine Annäherung der mHsp70-Expressionen der Subzelllinien nach der Bestrahlung war auch damals zu erkennen (Gehrmann et al., 2005). Die erhöhte mHsp70-Anwesenheit in CX- Zellen nach der Bestrahlung wurde dabei mit einer erhöhten Resistenz gegenüber folgendem Zellstress in Verbindung gebracht (Gehrmann, Radons, et al., 2008). Auch der erhöhte Anteil an Zellen mit mHsp70 in unbestrahlten Zellen der Subzelllinie CX+ wurde mit einer verstärkten Strahlenresistenz (im Vergleich zu unbestrahlten CX- Zellen) vorbeschrieben (Gehrmann et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit schlossen sich der Analyse von mHsp70 via Durchflusszytometrie Proteinquantifizierungen mittels Western Blots an, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden sollen.

4.2 PROTEINBESTIMMUNGEN

4.2.1 Hsp70

Die zytosolische Hsp70-Expression unterscheidet sich zwischen Zellen der unbestrahlten Subzelllinien CX- und CX+ nicht (Gastpar et al., 2005; Gehrman et al., 2005). Mithilfe dieser Vorkenntnis wurde ein Grenzwert von 20 % festgelegt, unter Zuhilfenahme dessen die Ergebnisse der weiteren Proteinbestimmungen interpretiert wurden. Es soll hierbei betont werden, dass dies kein statistisches Vorgehen war. Unter Berücksichtigung der geringen n-Zahlen stellte es jedoch einen guten Kompromiss dar, um davor zu bewahren, kleinste Unterschiede der Proteinexpressionen als Veränderungen zu interpretieren oder jegliche Beobachtungen, welche unterhalb von häufig gewählten Grenzen (wie dem 1,5-fachen des Ausgangswertes) lagen, zu missachten.

Nach der Bestrahlung mit 10 Gy wurde in den beiden Subzelllinien keine strahleninduzierte, veränderte Expression des Proteins Hsp70 beobachtet. Auch zwischen den Subzelllinien unterschieden sich die zytosolischen Proteingehalte in bestrahlten Zellen nicht. Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen aus vorhergehenden Experimenten (Gehrman et al., 2005; Schilling et al., 2009). Hohe zytosolische Gehalte an Hsp70 gehen mit einer verstärkten Resistenz der Zelle gegenüber stressbedingtem Zelltod durch Apoptose einher (Jaattela, 1999a; Jaattela, Wissing, Kokholm, Kallunki & Egeblad, 1998). Dass eine erhöhte Resistenz der CX+ Zellen gegenüber Bestrahlung auf unterschiedliche zytosolische Hsp70-Gehalte zurückzuführen ist, ist vor dem Hintergrund der erhaltenen Ergebnisse damit sehr unwahrscheinlich (Gehrman et al., 2005).

Im Vergleich zu untransformierten („normalen“) Zellen sind in transformierten Zellen größere Mengen zytosolisches Hsp70 zu erwarten (Ciocca & Calderwood, 2005). Ein negativer Feedback-Mechanismus, durch welchen die Transkription von *Hsp70* durch die Anwesenheit von Hsp70 gehemmt wird, kann zur Limitierung der *Hsp70*-Transkription führen. Jedoch ist sowohl für normale, als auch für Tumorzellen, eine Induktion der Synthese von Hsp70 nach der Einwirkung von ionisierender Strahlung, vorbeschrieben (Calini et al., 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Hsp70 im Zellkulturmedium, wie sie nach Stresseinwirkung vorbeschrieben ist, in ausgewählten Zelltypen *via Toll-like* Rezeptoren (TLRs) die Expression von Hsp70 steigern kann, dass also auch ein positiver Feedback-Mechanismus für die Hsp70-Expression existiert (Lee, K. H. et al., 2013).

Es ist daher vorstellbar, dass nach der Bestrahlung zwar eine vermehrte Hsp70-Synthese stattfand, sich diese 24 h nach der Exposition gegenüber dem Stressstimulus jedoch nicht direkt im zytosolischen Gehalt des Proteins widerspiegelte. Dies legt nahe, dass es Mechanismen gibt, welche den zytosolischen Gehalt von Hsp70 limitieren, was insbesondere deshalb sinnvoll erscheint, da eine zu hohe Hsp70-Expression toxisch wirken kann (Feder, Rossi, Solomon, Solomon & Lindquist, 1992). Diese Annahme wird durch Beobachtungen gestützt, wonach zytosolisches Hsp70 in transfizierten, Hsp70-überexprimierenden Prostatakarzinomzellen nicht vermehrt vorlag, wenn es mit seinen nicht transfizierten, wenig Hsp70 exprimierenden Kontrollen verglichen wurde (Wang, M. H., Grossmann & Young, 2004).

Die Beobachtungen legen nahe, dass im Zytosol nur eine begrenzte Kapazität für Hsp70 existiert. Von der renommierten Gruppe um De Maio wird gemutmaßt, dass nach Stresswirkung ein Überschuss von Hsp70 im Zytosol oligomerisiert und darauf folgend spontan an die zytosolische Seite der Plasmamembran transloziert. Dort angelangt kann Hsp70 hochspezifisch an Phosphatidylserin binden und gemeinsam mit diesem durch spontanes *Flipping* über die Lipiddoppelschicht auf die Zelloberfläche gelangen, wo es sich dann als mHsp70 präsentiert (De Maio, 2014; Schilling et al., 2009). Es ist anzunehmen, dass PS durch die ATP-abhängige Flippase sehr schnell wieder auf die zytosolische Seite der Membran transloziert wird, während mHsp70 nach extrazellulär gerichtet verbleibt (Vega et al., 2008). Neu synthetisierte Hsp70-Proteine sind demnach nicht unbedingt im Zytosol wiederzufinden, sondern können, über einen im Detail unbekanntem Mechanismus, an die Membran translozieren, wenn deren Lipidkomposition dies zulässt (De Maio, 2014; Horvath et al., 2008).

In Anbetracht der beschriebenen Ergebnisse könnte dies bedeuten, dass bereits in den scheinbestrahlten CX- und CX+ Zellen die zytosolische Hsp70-Kapazität gesättigt war. Hohe zytosolische Hsp70-Gehalte sind in Tumorzellen häufig zu beobachten (Sherman & Gabai, 2014). In unbestrahlten CX- wie auch CX+ Zellen könnte demnach ein Überschuss an Hsp70 vorgelegen haben, welcher sich auf der Plasmamembran präsentierte, und zwar auf unbestrahlten CX+ Zellen häufiger als auf unbestrahlten CX- Zellen (Abb. 16). Strahleninduziert war auf Zellen der Subzelllinie CX- mHsp70 vermehrt nachweisbar, was auf einer verstärkten Hsp70 Expression beruhen kann, welche nach der Einwirkung von Zellstress üblich ist (Calini et al., 2003; De Maio, 1999). Die überschüssigen Hsp70-Proteine oligomerisierten möglicherweise, sodass sie nach der Bestrahlung auf der

Zelloberfläche von CX- Zellen nachweisbar waren, während das zytosolische Hsp70 stets in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden konnte (De Maio, 2014).

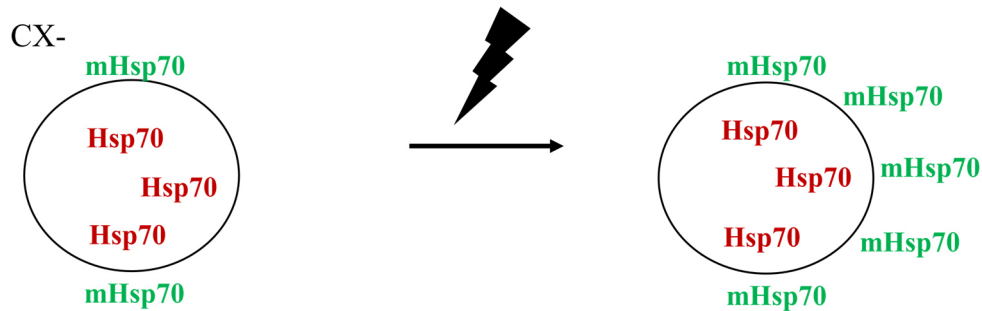


Abb. 16: Schematische Darstellung der Lokalisation von strahleninduziert vermehrt synthetisiertem Hsp70 in Zellen der Subzelllinie CX-. Nach Bestrahlung war auf CX- Zellen vermehrt mHsp70 zu finden, die zytosolischen Hsp70-Gehalte blieben unverändert.

In Zellen der Subzelllinie CX+ war nach Bestrahlung keine erhöhte mHsp70-Expression zu erkennen. Möglicherweise ist auch die Kapazität der Zellmembran für mHsp70 begrenzt und durch den schon initial hohen mHsp70-Anteil von $71 \% \pm 6 \%$ gesättigt. Der Hypothese um De Maio folgend, können Abschnitte der Plasmamembran, welche membrangebundenes Hsp70 enthalten, in Form von Vesikeln (welche am ehesten als Exosomen zu klassifizieren sind) freigesetzt werden (De Maio, 2014; Fang et al., 2007; Gastpar et al., 2005; Vega et al., 2008). Hsp70, welches nach der Bestrahlung neu synthetisiert wurde, zeigte sich demnach möglicherweise in der Subzelllinie CX+ nicht auf der Zelloberfläche, sondern wurde in/auf Vesikeln in das Zellkulturmedium abgegeben (Abb. 17).

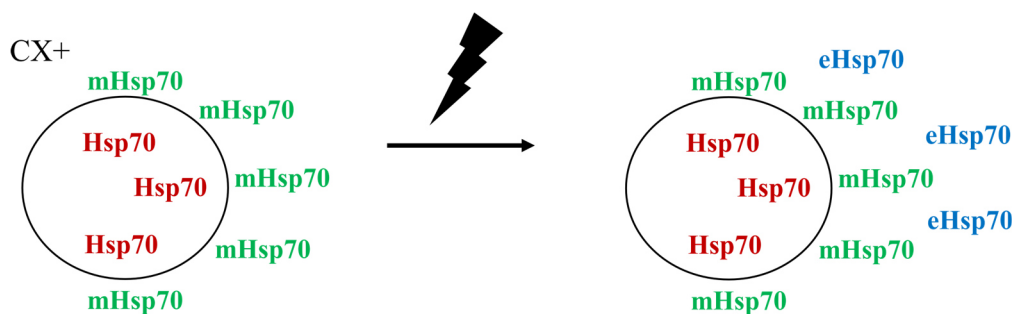


Abb. 17: Schematische Darstellung der Lokalisation von strahleninduziert vermehrt synthetisiertem Hsp70 in Zellen der Subzelllinie CX+. Nach Bestrahlung änderte sich der Anteil mHsp70+ Zellen nicht, die zytosolischen Hsp70-Gehalte zeigten sich ebenfalls unverändert. Möglicherweise geben CX+ Zellen nach Bestrahlung vermehrt synthetisiertes Hsp70 als eHsp70 in das extrazelluläre Medium ab.

In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass nach der Einwirkung von Zellstress vermehrt extrazelluläres Hsp70 vorzufinden ist, insbesondere wurde eine Überexpression von Hsp70 mit einer vermehrten Anwesenheit von eHsp70 assoziiert. Demzufolge scheint es plausibel, dass auch CX2 Zellen überschüssiges mHsp70 über Vesikel als eHsp70 in das extrazelluläre Medium freisetzen können (De Maio, 2011, 2014; Gehrman, Specht, et al., 2014; Lee, K. H. et al., 2013; Vega et al., 2008; Wong, 2011). Dies könnte bedingen, dass sowohl der zytosolische als auch der membranständige Gehalt des Proteins Hsp70 limitiert wird.

Inwiefern die basalen und strahleninduzierten Veränderungen zwischen den Subzelllinien mit Proteinmengen Cripto-1-abhängiger Signalwege korrelierten, soll nun diskutiert werden.

4.2.2 GRP78

GRP78 ist ein Mitglied der HSP70-Familie und ist unter physiologischen Bedingungen im ER sowie in einigen Tumorzellen und gestressten Endothelzellen auch an der Zelloberfläche lokalisiert (Lee, A. S., 2014). Unbestrahlte Zellen der beiden Subzelllinien enthielten vergleichbare Mengen von zytosolischem GRP78. In CX+ Zellen wurde nach Bestrahlung eine signifikant verstärkte Expression des Proteins detektiert, dieser Effekt war in Zellen der Subzelllinie CX- nicht zu beobachten. Obwohl therapieresistente Tumorzellen häufig basal erhöhte zytosolische und oberflächliche GRP78-Gehalte zeigen, kann die Expression von GRP78 nach der Einwirkung von ER-Stress, wie er durch ionisierende Strahlung ausgeübt werden kann, weiter gesteigert werden (Foti, Welihinda, Kaufman & Lee, 1999; Lee, A. S., 2014; Zhang, Y. et al., 2013). Die Regulation der *GRP78*-Transkription nach der Exposition gegenüber ER-Stress erfolgt dabei ähnlich wie für andere ER-ständige HSPs, wie GRP95, GRP75 und GRP170. Darüber hinaus wird die Transkription des Gens *GRP78* auch durch die Aktivität der Proteinkinase B (Akt) oder Histondeacetylase-Inhibitoren gefördert (Baumeister, Dong, Fu & Lee, 2009; Gray, M. J. et al., 2013). Diese Mechanismen scheinen in CX+ Zellen 24 h nach Bestrahlung aktiver zu sein als in CX- Zellen.

Eine erhöhte GRP78-, sGRP78- oder auch GRP75-Expression in Tumorzellen wird mit einem beschleunigten Tumorprogress und Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie in Verbindung gebracht (Chang, Huang, Li & Chen, 2012; Dong et al., 2008; Feng et al., 2010; Firczuk et al., 2013; Fu & Lee, 2006; Gray, M. J. et al., 2013; Lee, A. S., 2014; Lee, H. Y. et al., 2015; Li, B., Cheng, Yang & Li, 2013; Sadekova, Lehnert &

Chow, 1997; Zhang, Y. et al., 2013). Vor diesem Hintergrund stehen die erhaltenen Ergebnisse in Einklang mit der Beobachtung, dass CX+ Zellen, welche nach der Einwirkung von ionisierender Strahlung hohe Gehalte an GRP78 aufwiesen, resistenter gegenüber dieser sind als solche Zellen, welche diesen Schutzmechanismus weniger effektiv aktivieren können, wie CX- Zellen (Gehrmann et al., 2005; Gehrmann, Radons, et al., 2008; Li, B. et al., 2013).

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinbestimmungen ist allerdings nicht festzustellen, ob die intrazellulär erhöhten GRP78-Gehalte auch von einer vermehrten Anwesenheit des Proteins auf der Zellmembran begleitet wurden. In hormontherapieresistenten Prostata- und Mammakarzinomzellen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Erhöhung des intrazellulären GRP78-Gehalts mit einer verstärkten Anwesenheit von sGRP78 einhergeht. Dabei fiel die Erhöhung von sGRP78 im Vergleich zur Erhöhung des zytoplasmatischen GRP78-Gehalts überproportional stark aus (Zhang, Y. et al., 2010; Zhang, Y. et al., 2013). Eine verstärkte GRP78-Expression korreliert also vermutlich nicht nur positiv mit einer intrazellulären Erhöhung des Proteingehalts, sondern auch mit seinem Gehalt auf der Plasmamembran (Zhang, Y. et al., 2013). Dies spricht dafür, dass auch in den vorliegenden CX+ Zellen strahleninduziert vermehrt sGRP78 vorlag.

Die verstärkte Anwesenheit von sGRP78, besonders auf CX+ Zellen, scheint auch unter Einbeziehung des detektierten mHsp70-Anteils der Zellen plausibel. CX+ Zellen zeigten 24 h nach der Bestrahlung keine verstärkte mHsp70-Expression. Dies kann daher rühren, dass die Membran mit mHsp70-Molekülen gesättigt war und zusätzlich synthetisiertes Hsp70 als eHsp70 ins Medium abgegeben wurde (De Maio, 2014). Auch scheint es vor dem Hintergrund der erhaltenen Ergebnisse möglich, dass sGRP78, welches, wie mHsp70, in *Lipid Rafts* der Zellmembran lokalisiert ist, nach der Bestrahlung vermehrt auf der Oberfläche von CX+ Zellen exprimiert wurde und somit den Platz, welchen mHsp70 einnehmen konnte, zusätzlich limitierte. Hierdurch könnte die Abgabe von eHsp70 in das Zellkulturmedium (ZKM) zusätzlich gefördert worden sein, sodass in CX+ Zellen kein strahleninduzierter Anstieg des mHsp70-Anteils erkennbar war. In CX- Zellen hingegen war der mHsp70-Anteil auf unbestrahlten Zellen geringer als auf CX+ Zellen, außerdem war keine strahleninduzierte Steigerung der GRP78-Expression zu verzeichnen. Eine limitierte Kapazität der Plasmamembran für HSPs stand in dieser Subzelllinie demnach möglicherweise einer Steigerung des mHsp70-Anteils nach Bestrahlung nicht oder nur in geringerem Ausmaß im Weg.

Auf der Zelloberfläche ist GRP78, wie auch Cripto-1 und mHsp70, in *Lipid Rafts* lokalisiert. Dort kann sGRP78 einen Komplex mit Cripto-1 bilden, fördert so die Zellproliferation (*via* einer Aktivierung von Nodal- und Glypikan-1-abhängigen Signalwegen) und hemmt zytostatische TGF β -Signalwege (Abb. 4 und Abb. 5) (Bianco et al., 2008; Gonzalez-Gronow et al., 2006; Gray, P. C. & Vale, 2012; Misra, Deedwania & Pizzo, 2006; Misra et al., 2004; Shani et al., 2008; Zhang, Y. et al., 2013). Für Prostatakarzinomzellen wurde darüber hinaus beschrieben, dass sGRP78 auch unabhängig von Cripto-1 eine Aktivierung von Akt-, MAPK- und NF- κ B-Signalkaskaden bedingen kann (Misra et al., 2006; Misra & Pizzo, 2012; Zhang, Y. et al., 2013). Die Mechanismen, *via* welchen GRP78 an die Zellmembran transloziert wird, sind zelltypabhängig und bislang nicht vollständig verstanden (Lee, A. S., 2014). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass insbesondere strahlungsresistentere Zellen (CX+) nach der Bestrahlung eine erhöhte GRP78-Expression (und daher vermutlich auch eine verstärkte sGRP78-Expression) aufweisen. Dies steht in Einklang mit Beobachtungen, welchen zufolge sGRP78 Resistenz gegenüber Strahlentherapie vermitteln kann (Lee, A. S., 2014; Li, B. et al., 2013). So konnte beispielsweise für Kopf-Hals-Tumoren-initiierende Zellen gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibierung von sGRP78 Radioresistenz reduziert (Wu, M. J. et al., 2010).

Ein vermehrtes sGRP78 auf CX+ Zellen könnte somit für die erhöhte Strahlenresistenz von CX+ Zellen gegenüber CX- Zellen ausschlaggebend sein. Vermehrt vorliegendes sGRP78 kann eine verstärkte Aktivierung von Cripto-1-abhängigen Signalwegen ermöglichen, was wiederum in einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Bestrahlung resultieren kann (Firczuk et al., 2013; Gray, P. C. & Vale, 2012; Kelber et al., 2009; Shani et al., 2008; Wu, M. J. et al., 2010). Darüber hinaus kann sGRP78 auch Cripto-1 unabhängig wirken. Eine strahleninduzierte Verstärkung dieser Wirkungen könnte ebenfalls zur vorbeschriebenen erhöhten Strahlenresistenz von Zellen der Subzelllinie CX+ beitragen (Gehrmann et al., 2005; Lee, A. S., 2014).

Ob GRP78 in den vorliegenden Zellen einen resistenzfördernden Effekt durch erhöhte intrazelluläre Gehalte oder auch über eine Modifikation der Menge von oberflächlichem sGRP78 ausübte, bleibt zu eruieren. Ebenfalls bleibt unklar, welche Mechanismen dazu führten, dass in CX+ Zellen eine gegenüber CX- Zellen erhöhte strahleninduzierte Expression von GRP78 vorlag.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Quantifizierung von Proteinen, welche in sGRP78/Cripto-1-abhängige Signalwege involviert sind, diskutiert werden.

4.2.3 SMAD2/3 und -4

In unbestrahlten CX2 Zellen zeigten solche der Subzelllinie CX+ einen gegenüber den CX- Zellen erhöhten Gehalt von SMAD2/3 (136 %). Nach der Bestrahlung mit 10 Gy war in CX+ Zellen eher ein leichter Rückgang der SMAD2/3 Expression (auf 90 % des Ausgangswertes), in CX- Zellen eher ein leichter Anstieg zu verzeichnen (112 % des Ausgangswertes). Die strahleninduzierten Veränderungen zeigten sich für das Protein SMAD4 noch ausgeprägter (in CX- Zellen 80 % des Ausgangswertes, in CX+ Zellen 114 % dessen). Die Proteine SMAD2/3 und -4 sind Schlüsselproteine in TGF β -Signalwegen, ihre Aktivität wird durch die Aktivierung des TGF β -Rezeptorenkomplexes gesteigert (siehe Abb.3). Die Proteine beeinflussen, zu SMAD2/3/4 komplexiert, im Nukleus Gentranskriptionen und wirken darüber hinaus auch unabhängig ihrer transkriptionsmodulierenden Funktionen (Kamoto et al., 2013).

Die in unbestrahlten CX+ Zellen erhöhten Gehalte von SMAD2/3 können Ausdruck einer verstärkten Aktivität von TGF β -Signalwegen sein (Horbelt et al., 2012). Diese kann vor Bestrahlungsschäden schützen, indem die genomische Stabilität der Zellen erhöht wird. Die Assemblierung des SMAD2/3/4-Komplexes und dessen Translokation in den Nukleus führt unter anderem zur Transkription des Gens *SMAD7* und damit zu einer verstärkten Expression des Proteins SMAD7. Dieses kann, nach der Einwirkung ionisierender Strahlung, die ATM und andere Komponenten der DDR aktivieren (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014). Erhöhte basale SMAD-Mengen könnten dazu beitragen, dass die Aktivierung der DDR nach der Einwirkung ionisierender Strahlung frühzeitig stattfinden kann, sodass Zellen der Subzelllinie CX+ ein Schutz gegenüber den Folgen der Bestrahlung vermittelt werden könnte (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014).

Diesen Annahmen steht gegenüber, dass in scheinbestrahlten Zellen der Subzelllinie CX+ zwar vermehrt SMAD2/3, jedoch nicht SMAD4, zu detektieren war. Als Vermittler von Strahlenresistenz wurde insbesondere SMAD7 beobachtet, wobei auch phosphoryliertes SMAD2, unabhängig von TGF β (und SMAD4), an IRIFs lokalisiert werden konnte (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014). Nichts desto trotz wirkt aktiviertes SMAD2/3 nur über den Zwischenschritt der Komplexierung mit aktiviertem SMAD4 auf die *SMAD7*-Transkription und somit auf die Komponente des TGF β -Signalwegs, welche entscheiden-

den Einfluss auf die Vermittlung von Strahlenresistenz hat. Eine vermehrte Strahlenresistenz von CX+ Zellen scheint ohne die vermehrte Aktivierung von SMAD4 in diesem Kontext daher kaum erklärbar.

Dabei muss festgehalten werden, dass durch die durchgeführten Western Blots nur die Mengen, nicht jedoch die Aktivitäten der SMADs detektiert werden konnten. Dies rührt daher, dass die verwendeten Antikörper nicht zwischen den phosphorylierten und unphosphorylierten Formen des jeweiligen Proteins unterscheiden konnten. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine verstärkte Anwesenheit der Proteine auch eine erhöhte Aktivität widerspiegelt. Wohl aber kann ein Anhaltspunkt über maximal zu erreichende Signalaktivitäten geboten werden. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass eine vermehrte Aktivität von SMAD4 in Zellen der Subzelllinie CX+ vorlag, diese jedoch nicht mit der Gesamtmenge von SMAD4 korrelierte. Falls dies nicht der Fall war, sondern in CX+ Zellen gegenüber CX- Zellen vergleichbare SMAD4-Aktivitäten vorlagen, würde der resistenzvermittelnde Effekt, welchen erhöhte SMAD2/3-Aktivitäten mit sich bringen können, vermutlich verloren gehen.

Die in CX+ Zellen gegenüber CX- Zellen basal vergleichbare SMAD4-Expression bei erhöhter SMAD2/3-Expression könnte außerdem Folge einer, im Vergleich zu SMAD2/3, verstärkten Degradierung von SMAD4 sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in unbestrahlten CX+ Zellen verstärkte Aktivierungen von SMAD2/3 und -4 zu einer verstärkten Strahlenresistenz beitragen könnten. Ob die SMADs2/3/4 tatsächlich vermehrt aktiviert vorlagen, oder ob nur deren Gesamtproteinmengen erhöht waren, war in dieser Arbeit nicht zu eruieren, sodass dieser Weg der Resistenzvermittlung unter den gegebenen Bedingungen als spekulativ erscheint. Weitere Proteinbestimmungen mit Antikörpern, welche gegen aktivierte SMADs und auch SMAD7 gerichtet sind, sollten die erhaltenen Ergebnisse daher verifizieren.

Nach der Bestrahlung mit 10 Gy war in CX+ Zellen eine eher verminderte Menge an SMAD2/3 detektierbar, in CX- Zellen stieg der Gehalt der Proteine eher an. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde gezeigt, dass ionisierende Bestrahlung die TGF β -Aktivität steigert, was sich in einer verstärkten Aktivität von SMAD2/3 und -4 widerspiegeln kann (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014; Derynck et al., 2001; Tabatabai, Frank, Mohle, Weller & Wick, 2006). Stärker aktivierte TGF β -Signalwege wurden dabei als Vermittler einer erhöhten Strahlenresistenz beobachtet (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014;

Tabatabai et al., 2006). Möglicherweise ist die verstärkte Expression von SMAD2/3 in CX- Zellen nach Bestrahlung Ausdruck einer *post radiationem* verstärkten Aktivität von TGF β -Signalwegen in CX- Zellen. Diese wäre mit einer verstärkten Strahlenresistenz der CX- Zellen nach Bestrahlung einhergehend, über welche in vorhergehenden Veröffentlichungen bereits berichtet wurde (Gehrmann, Radons, et al., 2008). Gleichzeitig fördert eine verstärkte Aktivierung der Tumorsuppressoren SMAD2/3/4 die Transkription von Genen, welche für ihre Transkription hohe SMAD2/3/4-Aktivitäten benötigen. Zu Genen, welche bei hohen SMAD2/3/4-Aktivitäten transkribiert werden, zählen insbesondere solche, welche Tumorprogress vermindern (Gray, P. C. & Vale, 2012). Eine verminderte Proliferation von Zellen der Subzelllinie CX- im Vergleich zu solchen der CX+ Subzelllinie *post radiationem* sind ebenfalls vorbeschrieben (Gehrmann et al., 2005). Diese Ergebnisse lassen es plausibel erscheinen, dass eine vermehrte Expression der SMAD-Proteine auch mit einer vermehrten Aktivierung dieser einherging. Daher soll die Diskussion im Folgenden unter dieser Annahme fortgeführt werden.

Weshalb weisen Zellen der Subzelllinie CX+ nach Bestrahlung jedoch verringerte SMAD-Gehalte auf als ihre scheinbestrahlten Kontrollen und was bedeutet dies für diese Zellen? In CX+ Zellen *post radiationem* verminderte SMAD2/3-Aktivitäten könnten durch vermehrtes sGRP78 und dessen Interaktionen mit dem häufig in Tumorzellen vorzufindenden Protein Cripto-1 erklärbar sein. An der Zelloberfläche befindliches GRP78 (sGRP78) ist für die Wirkung von Cripto-1 essentiell. Solange sGRP78 nicht im Überschuss vorliegt, birgt eine verstärkte Anwesenheit des Proteins damit die Möglichkeit, die Wirkung von quantitativ mehr Cripto-1 Proteinen zuzulassen (Gray, P. C. & Vale, 2012). Cripto-1 hat einen aktivitätsmindernden Effekt auf die SMADs SMAD2/3 und -4. Dieser liegt darin begründet, dass Cripto-1 zwar über eine Interaktion mit Nodal zu einer verstärkten SMAD-Aktivierung und damit Zellproliferation führt, gleichzeitig aber über eine hemmende Wirkung auf das Binden von TGF β -1 und Aktivinen an deren Rezeptoren SMAD-Aktivitäten hemmt. Im Gesamten gesehen überwiegt bei der Wirkung von Cripto-1 die Reduktion der SMAD2/3/4-Aktivitäten (Gray, P. C. & Vale, 2012). Ein verstärktes Ablaufen Cripto-1-abhängiger Signalwege durch eine strahleninduziert verstärkte sGRP78-Anwesenheit könnte somit strahleninduziert geringere SMAD2/3/4-Aktivitäten (-Gehalte) in CX+ Zellen erklären.

Geringe Aktivitäten von SMAD2/3/4 sind mit der Transkription von Genen assoziiert, welche den Tumorprogress fördern (Gray, P. C. & Vale, 2012). Im Gegensatz dazu sind

hohe SMAD2/3/4 Aktivitäten mit der Transkription von Genen assoziiert, welche tumorsuppressive Wirkungen zeigen. Auf diese Weise könnte erklärt werden, weshalb in CX+ Zellen nach Bestrahlung im Vergleich zu CX- Zellen erhöhte Proliferationsraten vorbeschrieben wurden (Gehrmann et al., 2005; Gehrmann, Radons, et al., 2008; Gray, P. C. & Vale, 2012; Klauzinska et al., 2014; Schilling et al., 2009).

Andererseits ist vorbeschrieben, dass die Inhibierung von TGF β -Signalwegen mit einer verminderten Strahlenresistenz korreliert (Barcellos-Hoff & Cucinotta, 2014). Diese Eigenschaft wurde bestrahlten CX+ Zellen bislang nicht zugewiesen (De Maio, 2011; Gehrmann, Radons, et al., 2008). Möglicherweise wird in bestrahlten CX+ Zellen der Effekt von geringeren SMAD-Aktivitäten auf die (folglich verminderte) Strahlenresistenz durch die effizient gesteigerte GRP78-Expression (und Akt-Aktivierung, dazu später mehr) in diesen Zellen kompensiert. Oberflächliches sGRP78 kann dabei Cripto-1-abhängig, aber auch *via* Cripto-1-unabhängigen Signalwegen Strahlenresistenz fördern, worauf später genauer eingegangen werden soll (Hu, Li, Yang, Vandervalk & Xing, 2007).

In CX+ Zellen sind verringerte SMAD2/3/4-Aktivitäten *post radiationem* demnach mit einer verstärkten, sGRP78-abhängigen Wirkung von Cripto-1 auf TGF β -Signalwege in Einklang zu bringen. Abschließend muss limitierend bemerkt werden, dass durch die durchgeführten Western Blots nur die Gesamtmenge der jeweiligen Proteine bestimmt werden konnte, nicht jedoch deren Aktivierungszustände, da die verwendeten Antikörper nicht zwischen phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen unterscheiden konnten. Darüber hinaus ist auch die DNS-Bindungsaffinität der aktivierten SMADs durch verschiedene posttranslationale Modifikationen sehr variabel, sodass, auch wenn deren Aktivität bekannt wäre, nicht mit Sicherheit postuliert werden könnte, welche Gene transkribiert werden (Morikawa et al., 2013). Die Durchführung einer quantitativen RT-qPCR wäre zur abschließenden Klärung dessen notwendig.

4.2.4 PI3K und Akt

PI3K und Akt sind Kinasen, welche Schlüsselpositionen in der Regulierung des Zellzyklus innehaben und proliferationsfördernd wirken (Wendel et al., 2004). Eine verstärkte Aktivität der Akt wurde in Epithelzellen als überlebensfördernd beschrieben (Philippova et al., 2008). Ihre Aktivität kann dabei über die Wirkung sGRP78-abhängiger Cripto-1-Signalwege oder unabhängig derer gesteigert werden (Gray, M. J. et al., 2013; Gray, P. C. & Vale, 2012). Da PI3K und Akt in zahlreiche Signalwege involviert sind, ist nicht

davon auszugehen, dass eine Veränderung der Proteinmenge oder -aktivität einer der beiden untersuchten Kinasen ausschließlich auf eine veränderte GRP78- oder Cripto-1-Aktivität zurückzuführen ist. Vielmehr können zahlreiche Faktoren die Expressionen und Aktivierungszustände der beiden Proteine beeinflussen (Gray, M. J. et al., 2013; Pfaffenbach et al., 2012; West, Castillo & Dennis, 2002).

Verglichen mit der Expression in unbestrahlten CX+ Zellen lag in unbestrahlten CX- Zellen eine erhöhte PI3K-Expression vor. In CX- Zellen zeigte sich eine starke strahleninduzierte Reduktion der pro-proliferativen PI3K, welche in CX+ Zellen deutlich schwächer ausfiel. Die CX+ Zellen scheinen demnach eine geringere Empfindlichkeit gegenüber einer strahleninduzierten Senkung der PI3K-Expression aufgewiesen zu haben. Auch zeigten unbestrahlte CX- Zellen gegenüber CX+ Zellen eine erhöhte Expression der Akt. Strahleninduziert wurde die Akt-Expression in CX- Zellen gesenkt, während sie in CX+ Zellen nach der Stresseinwirkung erhöht vorzufinden war. Die strahleninduzierte erhöhte Expression der Akt in CX+ Zellen, nicht aber die verminderte Expression in CX- Zellen, zeigte dabei einen statistischen Trend ($p = 0,06$).

Dass in unbestrahlten CX- Zellen sowohl die PI3K- als auch die Akt-Expression gegenüber CX+ Zellen erhöht war und dabei dennoch vergleichbare basale Proliferationsraten zwischen den Subzelllinien vorbeschrieben wurden (Gehrmann et al., 2005; Schilling et al., 2009), deutet darauf hin, dass in CX+ Zellen Mechanismen vorliegen, welche, unabhängig der PI3K/Akt-Expression, vergleichbare Proliferationsraten zwischen den Subzelllinien ermöglichen. Wie auch für die SMADs SMAD2/3/4 konnten in den vorliegenden Bestimmungen nur die Gesamtproteingehalte der Kinasen, nicht jedoch deren Aktivierungsstatus (Phosphorylierungsstatus) bestimmt werden. Der beobachtete Effekt der vergleichbaren basalen Proliferationsraten könnte demzufolge durch eine unterschiedliche Regulation der Aktivierung bzw. Deaktivierung von PI3K/Akt zwischen den Subzelllinien begründbar sein. Wird das Augenmerk dabei auf die Deaktivierung gerichtet, nimmt insbesondere die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) eine zentrale Stellung ein. PTEN dephosphoryliert PIP3, unterbricht damit den PI3K/Akt-Signalweg und verhindert die Aktivierung der Akt. Unter bestimmten Begleitumständen wird die Aktivität von PTEN hierbei durch TGF β inhibiert (Assinder, Dong, Kovacevic & Richardson, 2009). In unbestrahlten CX+ Zellen war ein erhöhter Gehalt von SMAD2/3 vorzufinden, welcher für eine verstärkte Aktivität von TGF β -Signalwegen sprechen kann. Dies könnte in einer verstärkten Inhibierung der PTEN, einer dadurch verminderten PIP3-Dephosphorylierung und respektive einer verstärkten Aktivierung der

Akt resultieren. Dieser Ansatz bietet eine mögliche Erklärung für vergleichbare Proliferationsraten zwischen den Subzelllinien trotz unterschiedlicher Proteingehalte von PI3K/Akt in den unbestrahlten Subzelllinien. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass in unbestrahlten CX- und CX+ Zellen vergleichbare Mengen GRP78 vorlagen. Die Expression des Proteins wird durch die Aktivität von Akt-Signalwegen mitbestimmt. Es ist daher denkbar, dass sich eine erhöhte Akt-Aktivität in erhöhten GRP78-Gehalten widerspiegeln würde (Gray, M. J. et al., 2013; Pfaffenbach et al., 2012). Diese waren hier jedoch nicht vorzufinden.

Liegen in den beiden Subzelllinien unterschiedlich starke Aktivierungen des PI3K/Akt-Signalweges vor, bleiben weitere Signalwege zu eruieren, welche PI3K/Akt-unabhängig die Proliferation unbestrahlter CX+ Zellen fördern können.

Dass ein pro-proliferativ wirkendes Protein wie Akt nach der Einwirkung von Zellstress vermehrt exprimiert wird, scheint zunächst merkwürdig. Jedoch ist eine stressinduzierte Aktivierung von PI3K/Akt-Wegen häufig zu beobachten (West et al., 2002). Am ehesten wird sie dabei als protektiver kompensatorischer Mechanismus gedeutet, um dem stressinduzierten Zelltod zu entgehen (Martelli et al., 2006). Dieser Mechanismus scheint in CX+ Zellen stärker ausgeprägt zu sein als in CX- Zellen. Nach der Bestrahlung war die Expressionsrate von Akt in CX+ Zellen gegenüber CX- Zellen leicht erhöht.

Dass die beiden Kinasen PI3K und Akt nach Bestrahlung in CX- Zellen stärker reprimiert vorlagen als in CX+ Zellen, kann unter anderem durch eine verstärkte Aktivierung Cripto-1-abhängiger Signalwege in CX+ Zellen begründet werden (Abb. 18).

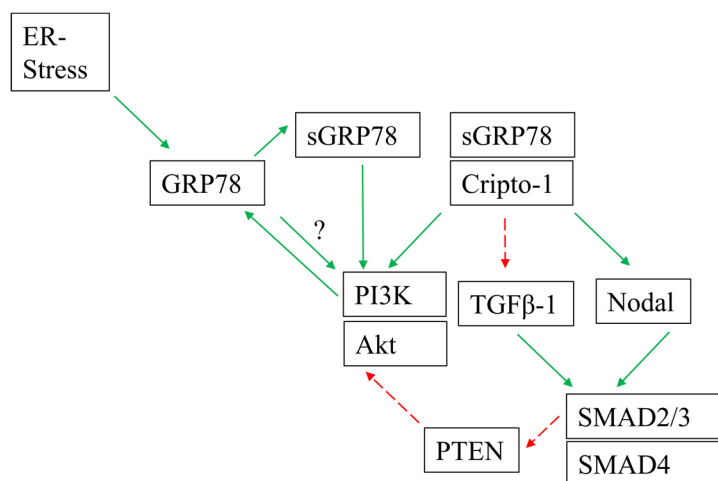


Abb. 18: Übersicht über Wechselwirkungen von GRP78, PI3K/Akt und TGFβ-Signalwegen. Grüner Pfeil, durchgezogene Linie: Aktivierung/positive Regulation; Roter Pfeil, gestrichelte Linie: Hemmung/negative Regulation.

Neben einer Hemmung von TGF β -Signalwegen fördert Cripto-1 in löslicher Form die c-Src-abhängige Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs (Gonzalez-Gronow et al., 2006; Gray, P. C. & Vale, 2012; Hu et al., 2007; Zhang, Y. et al., 2013). Auch für diese Wirkung ist das Protein auf die Anwesenheit von sGRP78 angewiesen. Erhöhte Expressionsraten von GRP78 in bestrahlten CX+ Zellen wurden unter 4.2.2 beschrieben und legen eine erhöhte sGRP78-Menge nahe (Kelber et al., 2009; Zhang, Y. et al., 2013). Ebenso konnten in CX+ Zellen *post radiationem* verminderte Expressionen von SMAD2/3 und -4 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine vermehrte Aktivität von Cripto-1-abhängigen Signalwegen in bestrahlten Zellen der Subzelllinie CX+ hin. Strahleninduziert weniger reduzierte oder gar erhöhte Expressionsraten der Kinasen PI3K und Akt in CX+ Zellen (verglichen mit CX- Zellen) können diese Theorie weiter bekräftigen.

Jedoch kann sGRP78 die Akt nicht nur aktivieren, auch seine eigene Expression wird durch die Kinase gefördert (Abb. 18) (Gray, M. J. et al., 2013; Zhang, Y. et al., 2010). Die in dieser Arbeit gezeigte, in CX+ Zellen *post radiationem* verstärkte Expression von GRP78 könnte also auch Ausdruck einer verstärkten Aktivierung der Akt sein: Diese fördert die GRP78-Expression, dies kann eine erhöhte Menge sGRP78 bedingen und somit das verstärkte Abfließen Cripto-1-abhängiger Signalwege ermöglichen. Darüber können TGF β -Signalwege gehemmt sowie zusätzlich Cripto-1-abhängig und -unabhängig der PI3K/Akt Signalweg gefördert werden (Gray, M. J. et al., 2013; Lee, A. S., 2014; Zhang, Y. et al., 2013). Ob auch zytosolisches GRP78 PI3K/Akt-Signalkaskaden fördert, bleibt noch zu erforschen, es existieren jedoch Anhaltspunkte dafür (Gray, M. J. et al., 2013; Lee, A. S., 2014).

Es wurde beobachtet, dass CX+ Zellen resistenter gegenüber ionisierender Bestrahlung sind als solche der Subzelllinie CX- (Gehrmann et al., 2005). Bei der Einwirkung von Zellstress, wie ionisierender Bestrahlung, wird der SAPK/JNK-Signalweg aktiviert. Die JNK-Aktivität fördert dabei die Aktivierung der Procaspase 9 zu Caspase 9 und den darauffolgenden mitochondrialen intrinsischen Weg der Apoptose (Tournier et al., 2000). In Leukämiezellen konnte gezeigt werden, dass Cripto-1, im Zusammenspiel mit GRP78, durch Aktivierung der Akt die Aktivität des SAPK/JNK-Signalwegs hemmen kann. Neben einer verminderten Aktivität der Caspase 9 wurde in dieser Veröffentlichung außerdem das pro-apoptische Protein BAD vermehrt inaktiviert vorgefunden. Diese Erkenntnisse lassen die Annahme zu, dass die Wirkung von Cripto-1 *via* Akt den intrinsischen Weg der Apoptose hemmen kann (Hu et al., 2007). Möglicherweise ist diese Wirkung auch in CX2 Zellen zu finden. Das vermehrte Abfließen Cripto-1-abhängiger Signalwege

ließe sich somit durch seinen Einfluss auf TGF β -/SMAD-abhängige Signalwege sowie durch seinen Einfluss auf PI3K/Akt-Signalwege mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Verbindung bringen (Gehrmann et al., 2005; Hu et al., 2007).

Abgesehen davon ist die Bedeutung einer PI3K-unabhängigen Akt-Aktivierung in Zukunft näher zu beleuchten. Einen Tag nach Bestrahlung mit 10 Gy war in CX+ Zellen keine vermehrte PI3K-Expression detektierbar, jedoch war eine erhöhte Akt-Expression vorzufinden. Es ist daher naheliegend, dass, insbesondere in CX+ Zellen, Einflüsse aus PI3K-unabhängigen Signalwegen zu einer verstärkten Akt-Expression führen können.

Dass Tumorzellen mit erhöhter mHsp70-Expression eine verstärkte Proliferationsfähigkeit beziehungsweise Resistenz gegenüber Zellstress aufweisen, wurde mehrfach beschrieben (Gehrmann et al., 2005; Gehrmann, Radons, et al., 2008; Liu, P. et al., 2009; Schilling et al., 2009). In dieser Arbeit wurden Anhaltspunkte dafür geliefert, dass Zellen mit erhöhter mHsp70-Expression *post radiationem* verstärkt Cripto-1-abhängige Signalwege fördern können und darüber Resistenz gegenüber ionisierender Bestrahlung vermittelt wird.

Um die erhaltenen Erkenntnisse in ihrer Gesamtheit zu beleuchten, soll sich nun eine abschließende Diskussion anschließen.

4.3 ABSCHLIEßENDE DISKUSSION

In unbestrahlten CX2 Zellen gingen erhöhte Anteile mHsp70 positiver (mHsp70+) Zellen der Subzelllinie CX+ mit einer erhöhten SMAD2/3-Expression sowie geringeren Gehalten von PI3K und Akt einher. Diese Zellen sind gegenüber ionisierender Bestrahlung resistenter als solche mit geringeren mHsp70-Anteilen (Gehrmann et al., 2005). In bestrahlten Zellen der Subzelllinie CX+ war der Anteil mHsp70 positiver Zellen nicht gesteigert, jedoch erhöhte sich die Expression von GRP78 in diesen Zellen signifikant. Darüber hinaus war zu beobachten, dass sich die strahleninduzierten Proteinexpressionen zwischen den Subzelllinien so unterschieden, dass eine vermehrte Aktivität von Cripto-1-Signalwegen in CX+ Zellen naheliegend ist: Proteine von TGF β -Signalwegen (SMAD2/3 und -4) waren nach der Bestrahlung vermindert vorzufinden, während die Kinasen PI3K und Akt in CX+ Zellen vermindert reprimiert (PI3K, im Gegensatz zu CX- Zellen) oder vermehrt (Akt) vorlagen.

Im Gegensatz dazu konnte in CX- Zellen nach der Bestrahlung ein erhöhter Anteil mHsp70+ Zellen detektiert werden. Es konnte keine vermehrte Expression von GRP78

gezeigt werden, ebenso zeigten sich keine Anzeichen für ein verstärktes Ablaufen Cripto-1-abhängiger Signalwege: Die Mengen exprimierter SMADs (SMAD2/3/4) stiegen eher an, die von PI3K und Akt sanken.

Im Folgenden sollen zwei plausible Erklärungen für dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Subzelllinien gegeben werden. Bei beiden stehen Erklärungsmodelle für die vermehrte Expression von GRP78 in Zellen der Subzelllinie CX+ im Vordergrund.

Ausgangspunkt 1 (A1): Eine verstärkte Hsp70-Expression nach Bestrahlung führt in CX+ Zellen zur vermehrten eHsp70-Sekretion *via* Vesikeln, eHsp70 ist für die beobachteten Unterschiede zwischen CX- und CX+ Zellen verantwortlich. Nach Bestrahlung, wenn aus dem Zytosol vermehrt Hsp70 an die Oberfläche transloziert werden „soll“, wird das Protein auch vermehrt, über Vesikel, ins extrazelluläre Medium abgegeben (Vega et al., 2008). Nach Endozytose oder rezeptorabhängiger Wirkung könnten diese Vesikel/eHsp70 den Zellen verstärkte Strahlenresistenz vermitteln (Abb. 19 und Abb. 20).

Ausgangspunkt 2 (A2): CX+ Zellen sind vermehrt fähig, HSPs zu exprimieren. Die Transkription von GRP78 ist unter anderem von der Aktivität der Akt abhängig (Gray, M. J. et al., 2013). Akt-unabhängig wird die Transkription von GRP78 und anderen HSPs komplex reguliert und nach dem Auftreten von (ER-)Stress gesteigert (Lee, A. S., 2014). Möglicherweise ist der ausschlaggebende Unterschied zwischen Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ bezüglich deren Strahlungsresistenz, dass Zellen der Subzelllinie CX+ nach Bestrahlung effizienter in der Lage sind, HSPs zu exprimieren und somit besser gegen strahleninduzierte Schäden gewappnet sind (Abb. 19 und Abb. 20).

4.3.1 Freigesetztes eHsp70 als resistenzvermittelnde Komponente

Besonderes Augenmerk soll auf die Hypothese gelegt werden, dass die Mechanismen, die in CX+ Zellen *post radiationem* zu weniger Zellzyklusarrest führen, mit extrazellulärem/exosomalem Hsp70 (eHsp70) in Verbindung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass humane Prostatakarzinomzellen, welche Hsp70 überexprimieren, das Protein ohne die zusätzliche Einwirkung von Zellstress in ihr umliegendes Medium abgeben können (Wang, M. H. et al., 2004). Ebenfalls wurde nach der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung ein vermehrtes extrazelluläres Vorkommen von Hsp70 beschrieben (Haen et al., 2011). Der genaue Mechanismus, über welchen die Sekretion des Proteins stattfindet, ist nach wie vor ungeklärt (De Maio, 2014). Die Gruppe um De Maio geht davon aus, dass die Hsp70-Sekretion durch Tumorzellen über den Zwischenschritt der membrange-

bundenen Form des Hsp70 geschieht (Vega et al., 2008). Die Abschnitte der Plasmamembran, welche das membrangebundene Hsp70 enthalten, sollen dabei in Form von Vesikeln, welche am ehesten als Exosomen zu klassifizieren sind, freigesetzt werden (De Maio, 2014; Fang et al., 2007; Gastpar et al., 2005; Vega et al., 2008). *In vivo* und *in vitro* konnten von der Zellmembran abstammende, Hsc70-, Hsp70- und mHsp70-enhaltende Vesikel im extrazellulären Medium verschiedener Tumoren nachgewiesen werden, welche von Zellen mit intakten Zellmembranen abstammten (Barreto, Gonzalez, Kabingu, Asea & Fiorentino, 2003; Broquet et al., 2003; Guzhova et al., 2001; Haen et al., 2011; Pockley, Muthana & Calderwood, 2008).

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigen, dass in Zellen der Subzelllinie CX+ nach Bestrahlung weder erhöhte Mengen von zytosolischem noch von oberflächlichem Hsp70 vorzufinden waren. Möglicherweise wurde nach der Bestrahlung überschüssiges Hsp70/mHsp70 über Vesikel in das Zellkulturmedium abgegeben (der Theorie der Gruppe um De Maio folgend, Abb. 17). Beobachtungen, welchen zufolge Hsp70-überexprimierende Tumoren Hsp70 in ihr umliegendes Medium abgeben, stehen in Einklang mit dieser Überlegung (Wang, M. H. et al., 2004). Auch für die hier verwendete Zelllinie CX2 gelang der Nachweis mHsp70-präsentierender Vesikel, welche neben Hsp70 auch zytosolische Proteine wie Tubulin, Bag-4 und Hsc70 enthielten (De Maio, 2011, 2014; Gastpar et al., 2005).

Dabei scheint es möglich, dass eHsp70 die Tumorzellen *via* Endozytose, parakrin oder autokrin beeinflussen kann. Nimmt man, der zuvor aufgestellten Theorie folgend, an, dass CX+ Zellen nach Bestrahlung vermehrt Vesikel mit hohem mHsp70-Anteil freisetzen, könnte dies eine Erklärung für die Beeinflussung von Therapieresistenzen darstellen.

Es ist vorbeschrieben, dass eHsp70 auf unilamellären Vesikeln (welche oberflächliches Phosphatidylcholin und PS in einem für Membranen typischen Verhältnis aufweisen) an PS binden kann und dass es eHsp70 möglich ist, in diese Vesikel zu inserieren (Schilling et al., 2009). Davon ausgehend kann vermutet werden, dass Mechanismen bestehen, welche eine Aufnahme von eHsp70 in Zellen ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine 14-mer umfassende Peptidsequenz an die Oligomerisierungsdomäne von Hsp70 (TPP), welche von mHsp70 extrazellulär präsentiert wird, binden kann. Das Peptid kann nach eingetretener Bindung internalisiert und *via* endosomalen Wegen transportiert werden. Intrazellulär konnte es insbesondere in der Nähe von mitochondrialen Membranen wiedergefunden werden (Gehrmann, Stangl, et al., 2014;

Stangl et al., 2014). Welche Funktionen es dort erfüllt, ist bislang unklar (Gehrmann, Stangl, et al., 2014). Ebenfalls ist bislang unbekannt, ob auch das gesamte eHsp70-Protein nach der Internalisierung durch mHsp70+ Zellen diesen Weg beschreiten kann, es wäre jedoch vorstellbar.

Die Zugabe von Hsp70 in das ZKM von CX- Zellen, welche dann Hypoxie oder ionisierender Strahlung (4 Gy) ausgesetzt waren, führte dabei konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion von deren Zellüberleben. Wurde nur die eHsp70 Menge erhöht, jedoch kein Stressstimulus appliziert, hatte dies keine hemmende Auswirkung auf die Zellproliferation (Schilling et al., 2009). Auch von Arispe et al. wurde 2004 für PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen der Ratte) eine Verringerung des Zellüberlebens festgestellt, wenn diese extrazellulärem Hsp70 ausgesetzt wurden (Arispe et al., 2004). Über die Wirkung von eHsp70 als Beschleuniger der Apoptose liegen dabei unterschiedliche Informationen vor: Während CX- Zellen keine vermehrte PS-Anwesenheit auf der Oberfläche zeigten, wenn diese vermehrt eHsp70 ausgesetzt waren, war dies für PC12-Zellen sehr wohl zu beobachten (Arispe et al., 2004; Schilling et al., 2009). Die Präsentation von PS auf der Zelloberfläche ist dabei eine früh detektierbare Veränderung auf Zellen, welche den Weg der Apoptose beschreiten. Eine verstärkte Expression von aktivierter Caspase 3, welche ebenfalls für das verstärkte Ablaufen von apoptotischen Signalwegen spricht, wurde in CX- Zellen ebenfalls nicht beobachtet (Schilling et al., 2009).

Diese Beobachtungen scheinen im Widerspruch zu der aufgestellten Theorie zu stehen, dass eHsp70 Strahlenresistenz vermitteln kann. Jedoch ist in den vorliegenden Studien nicht untersucht worden, wie sich eHsp70 auf Zellen mit initial hohen mHsp70- (und SMAD2/3-) Gehalten auswirkt. Schilling et al. beobachteten allerdings, dass ein geringer Anteil der CX- Zellen selbst unter physiologischen Bedingungen im unbestrahlten Zustand PS auf der Membran präsentierte, während dies für CX+ Zellen nicht zutraf. Gegenüber ungestressten CX- Zellen wies eHsp70 dabei eine geringere Affinität auf als gegenüber solchen, welche Zellstress (Hypoxie) ausgesetzt waren und daher vermehrt PS auf ihrer Oberfläche zeigten (Schilling et al., 2009). Diese Eigenschaft kann einen entscheidenden limitierenden Faktor bei der Vergleichbarkeit der von Schilling et al. untersuchten CX- Zellen mit Zellen der Subzelllinie CX+ darstellen. In der vorliegenden Arbeit ist, unter Annahme der aufgestellten Hypothesen, jedoch davon auszugehen, dass insbesondere Zellen der Subzelllinie CX+ erhöhten eHsp70-Gehalten ausgesetzt waren.

In vitro-Experimente mit Neuronen zeigten, dass die Anwesenheit von extrazellulärem Hsp70 deren Apoptoseraten senken und ihre Resistenz gegenüber Stress erhöhen kann (Guzhova et al., 2001). Auf Hepatokarzinom-Zellen zeigte die Anwesenheit von eHsp70 pro-proliferative und anti-apoptotische Effekte (Wu, F. H. et al., 2012). Für Antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen und B-Zellen ist vorbeschrieben, dass diese *via* den *Toll-like* Rezeptoren TLR2 und TLR4 das Protein Hsp70 binden und darüber immunstimulatorische Effekte vermitteln können (Multhoff et al., 2015). TLRs sind jedoch auch auf Epithelzellen des Colons zu finden sowie auf transformierten Zellen dieses Organs (Sato, Goto, Narita & Hoon, 2009). Nach deren Aktivierung wird insbesondere der Transkriptionsfaktor NF- κ B verstärkt aktiv, dies resultiert unter anderem in einer vermehrten Expression anti-apoptotischer Proteine. Außerdem wird die Expression des Zellzyklusregulators Zyklin D1 gesteigert und insgesamt der Tumorprogress gefördert (Baldwin, 2001; Russo et al., 2001). Durch die Exposition gegenüber eHsp70 konnten in Hepatokarzinom-Zellen diese TLR-vermittelten anti-apoptotischen, pro-proliferativen Effekte erzeugt werden. Auch zeigte sich hierbei eine verstärkte TLR4-Expression sowie die Sekretion von HMGB1, einem Protein, welches extrazellulär vorkommend ebenfalls Tumorstadium fördern kann (Wu, F. H. et al., 2012). Bereits 2001 konnte gezeigt werden, dass in Kolonkarzinomzellen eine verringerte NF- κ B-Aktivität mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung korreliert (Russo et al., 2001). Dies legt nahe, dass eHsp70 auch in Zellen der Zelllinie CX2 *via* TLRs zu erhöhten NF- κ B-Aktivitäten führen und darüber strahlenresistenzfördernde Wirkungen entfalten könnte (Abb. 19 und Abb. 20, A1).

TLRs werden aktiviert, indem Lipopolysaccharide (LPS, insbesondere von gramnegativen Bakterien) oder PAMPS (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) wie Hsp70 an das Protein CD14 binden, dieses ist in *Lipid Rafts* in der Zellmembran verankert. Ein TLR4/MD-2 Komplex dimerisiert und TIRAM/Myd88- und TRAM/TRIF-abhängige Signalwege werden aktiviert. Für verschiedene Zelltypen wurde vorbeschrieben, dass *via* TLR2 und -4 die Aktivitäten der Proteinkinasen PI3K und Akt gesteigert werden können (Arbibe et al., 2000; Fukao & Koyasu, 2003; Lee, K. H. et al., 2013; Lu et al., 2011; Plociennikowska, Hromada-Judycka, Borzecka & Kwiatkowska, 2015). Möglicherweise gilt dies auch für CX2 Zellen, sodass eine vermehrte Akt-Expression in CX+ Zellen Ausdruck einer verstärkten Aktivierung TLR2 und -4-abhängiger Signalwege durch eHsp70 sein könnte.

Möglicherweise stellt also eine, eHsp70/TLR-vermittelte, erhöhte NF- κ B- und Akt-Aktivität den entscheidenden Unterschied in der Strahlenresistenz zwischen Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ dar (Abb. 19 und Abb. 20). Eine verstärkte Aktivität der Akt kann eine erhöhte GRP78-Expression bedingen und darüber möglicherweise die Aktivität von Cripto-1-abhängigen Signalwegen fördern (Gray, M. J. et al., 2013). Darüber hinaus kann das vermehrt exprimierte GRP78 auch Cripto-1-unabhängig die Zellproliferation fördern und Apoptoseraten vermindern (Lee, A. S., 2014).

Unabhängig der TLRs ist es weiterhin möglich, dass endozytotisch aufgenommenes eHsp70 für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. In Vesikeln transportiertes Hsp70 liegt, wegen des geringen Volumens, in hohen Konzentrationen vor, sodass es plausibel erscheint, dass dieses eine starke lokale Wirkung entfalten kann (Vega et al., 2008). Darüber hinaus können sezernierte Vesikel neben Hsp70/mHsp70 weitere Proteine enthalten, wie Hsc70, Bag-4 oder eventuell auch HMBG-1. Auch diese Proteine könnten *post radiationem* die Proliferation von CX+ Zellen fördern.

4.3.2 EHsp70-unabhängige Unterschiede zwischen den Subzelllinien

Es ist auch denkbar, dass unterschiedliche Resistenzen der Subzelllinien gegenüber Bestrahlung eHsp70-unabhängig vermittelt werden. Für diesen Fall legen die erhaltenen Ergebnisse die Hypothese nahe, dass der Unterschied zwischen CX- und CX+ Zellen darin besteht, dass CX+ Zellen nach Strahleneinwirkung effizient(er) die Expression und Translokation von GRP78 ermöglichen können, zum Beispiel durch eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs (unabhängig von TLRs), oder durch Einflüsse auf die Regulation der Expression und/oder Degradierung von Proteinen (Abb. 19 und Abb. 20, A2).

4.3.2.1 Akt-abhängige verstärkte Stressantwort in CX+ Zellen

GRP78 kann, wie diskutiert, die Akt-Aktivierung fördern. Allerdings ist das Protein auch gleichzeitig Zielprotein der Akt und wird nach deren Aktivierung verstärkt exprimiert (Gray, M. J. et al., 2013). Ein erhöhter strahleninduzierter Gehalt der Akt konnte in Zellen der Subzelllinie CX+ in dieser Arbeit beobachtet werden und könnte daher die Ursache einer vermehrten strahleninduzierten GRP78-Expression in diesen Zellen sein (Gray, M. J. et al., 2013; Pfaffenbach et al., 2012). Da die Proteinkinase Akt in zahlreiche Signalwege involviert ist, wird die Expression und Aktivierung der Kinase auch durch die Aktivierung anderer Signalwege, TLR/eHsp70-unabhängig, maßgeblich beeinflusst. Damit

eröffnet sich eine enorm weites, zum Teil unzureichend erforschtes, Feld von Signalwegen, hinsichtlich welcher sich Zellen der Subzelllinien CX- und CX+ unterscheiden könnten (West et al., 2002).

4.3.2.2 Akt-unabhängige verstärkte Stressantwort in CX+ Zellen

Andererseits scheint es auch möglich, dass Zellen der Subzelllinie CX+ die Hitzeschockantwort unabhängig der Akt-Aktivität effizienter steigern können als solche der Subzelllinie CX-. Damit ließe sich eine verstärkte GRP78-Expression, ein in der Folge verstärktes Ablaufen Cripto-1-abhängiger Signalwege sowie eine erhöhte Akt-Aktivität erklären. Auch auf andere HSPs könnte diese These ausgeweitet werden oder in ihnen sogar ihren Ursprung haben. Insbesondere Proteinen der Familie HSP90 könnte dabei eine besondere Bedeutung zukommen. Zellen der Subzelllinie CX+ zeigten Protein-Expressionsmuster, welche in einer (im Vergleich zu CX- Zellen) stressinduziert verstärkten Aktivität von HSP90-Proteinen (mit)begründet sein könnten. Proteine der Familie HSP90 ermöglichen die Reifung, Stabilität, Aktivität und die intrazelluläre Ordnung von über 200 „Klientenproteinen“ (Hong et al., 2013). Wie Hsp70 sind auch Hitzeschockproteine der Familie HSP90 (im Folgenden HSP90 genannt) nach der Einwirkung von Zellstress vermehrt vorzufinden und helfen als Chaperone, die Zelle vor proteotoxischen Folgen des Stresses zu schützen (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). In zahlreichen Tumoren wird HSP90 überexprimiert und ermöglicht Tumorzellen, gegen Umweltstressoren gewappnet zu sein. Dabei stabilisiert es auch onkogene Klientenproteine und reguliert ihre aktiven Zustände. Beispielsweise gehören die Proteinkinase B (Akt), Zyklin D1 und zahlreiche Zyklin-abhängige Kinasen (wie CDK1-6) zu den Klienten von HSP90, sodass deren Degradierungen durch HSP90 gehemmt werden. Auf diese Weise kann HSP90 anti-apoptotisch und pro-proliferativ wirken (Hong et al., 2013; Paraiso et al., 2012). Eine erhöhte Menge Akt in CX+ Zellen könnte demnach auch durch eine verstärkte HSP90-Expression bedingt oder begünstigt sein. Des Weiteren kann HSP90 einen Komplex mit GRP78 eingehen und das Protein dadurch stabilisieren. Eine Hemmung von HSP90 resultiert dabei in einer Dissoziation des HSP90/GRP78-Komplexes mit darauffolgender Depletion von GRP78 (Roue et al., 2011). Die dargestellten Zusammenhänge lassen somit auch die These plausibel erscheinen, dass in CX+ Zellen strahleninduziert möglicherweise größere Mengen von HSP90 vorlagen als in solchen der Subzelllinie CX-, sodass HSP90 in CX+ Zellen eine stärkere stabilisierende Funktion gegenüber den Proteinen GRP78 und Akt einnehmen konnte. Die dadurch erhöhten Expressionen von GRP78 und Akt in CX+ Zellen

könnten dann, unter anderem *via* der verstärkten Aktivierung Cripto-1-abhängiger Signalwege, die Strahlenresistenz von Zellen der Subzelllinie CX+ fördern.

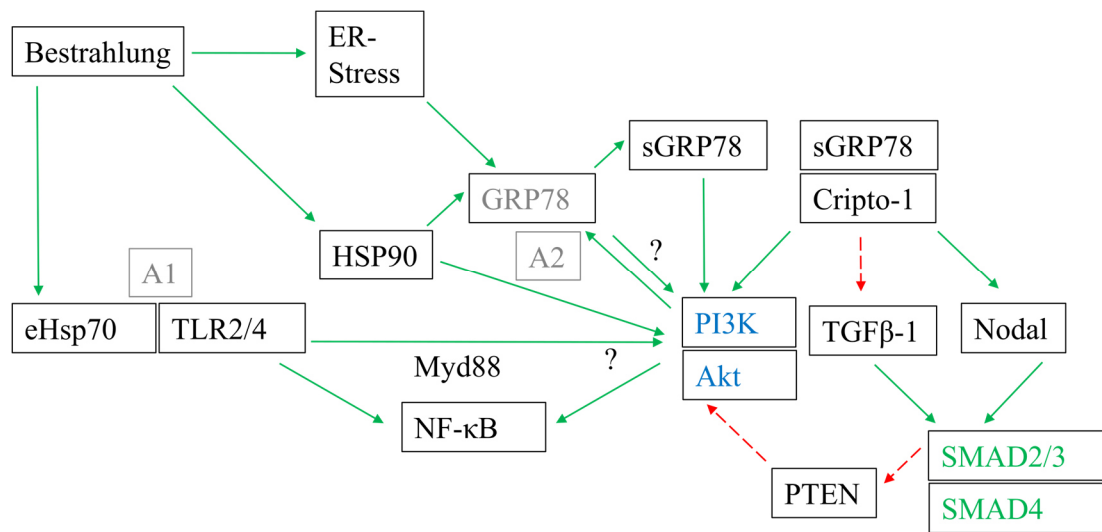


Abb. 19: Interaktionen beobachteter Proteine und Ergebnisse von Proteinbestimmungen in Zellen der Subzelllinie CX-. Ausgangspunkte 1 und -2 = A1 und A2. Grüner Pfeil, durchgezogene Linie: Aktivierung/positive Regulation; roter Pfeil, gestrichelte Linie: Hemmung/negative Regulation; **grüne Schrift**: Nach der Bestrahlung in CX- Zellen verstärkt exprimiert; **blaue Schrift**: Nach der Bestrahlung in CX- Zellen vermindert exprimiert; **graue Schrift**: Nach der Bestrahlung in CX- Zellen unverändert exprimiert; schwarze Schrift: Keine Proteinbestimmung.

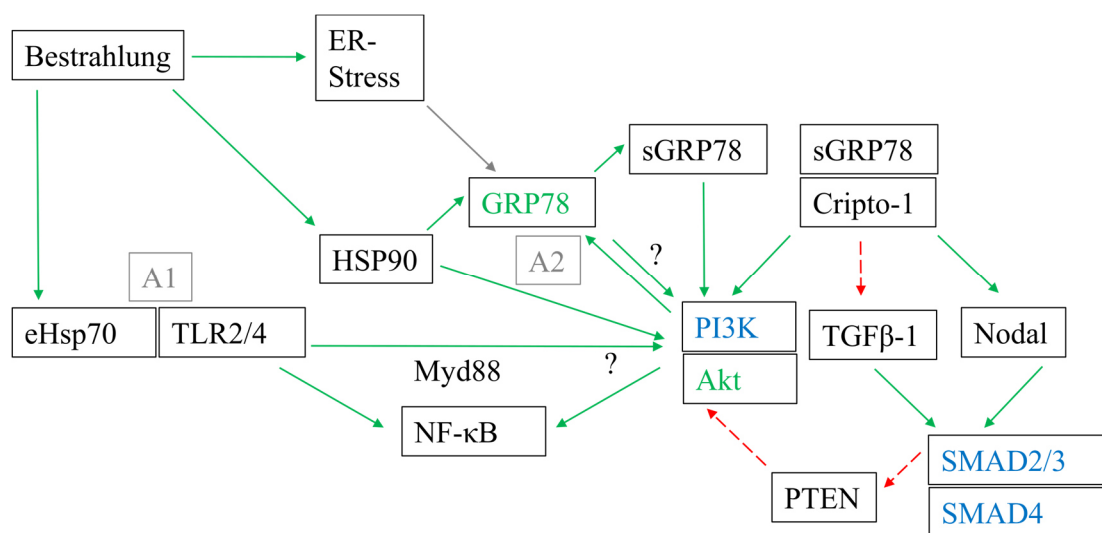


Abb. 20: Interaktionen beobachteter Proteine und Ergebnisse von Proteinbestimmungen in Zellen der Subzelllinie CX+. Ausgangspunkte 1 und 2 = A1 und A2. Grüner Pfeil, durchgezogene Linie: Aktivierung/positive Regulation; roter Pfeil, gestrichelte Linie: Hemmung/negative Regulation; **grüne Schrift**: Nach der Bestrahlung in CX+ Zellen verstärkt exprimiert; **blaue Schrift**: Nach der Bestrahlung in CX+ Zellen vermindert exprimiert; **graue Schrift**: Nach der Bestrahlung in CX+ Zellen unverändert exprimiert; schwarze Schrift: Keine Proteinbestimmung.

4.4 AUSBLICK

Um die aufgestellten Theorien zu überprüfen scheint es sinnvoll, die Genexpression von *Hsp70* vor und nach der Bestrahlung in CX- und CX+ Zellen zu quantifizieren. Somit könnte eruiert werden, ob auch in den hier vorliegenden Subzelllinien eine strahleninduziert vermehrte Transkription des Gens stattfindet. Um auszuschließen, dass sich vorliegende Veränderungen und Unterschiede innerhalb und zwischen den Subzelllinien aufgrund des ausgewählten Zeitpunkts der Proteinbestimmungen nicht detektieren ließen, sollten zusätzliche Proteinbestimmungen beispielsweise 8 h und 48 h nach der Bestrahlung stattfinden (Kiang, Gist & Tsokos, 2000).

Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, welche Unterschiede zwischen unbestrahlten CX- und CX+ Zellen dazu führen, dass diese vergleichbare Proliferationsraten aufweisen, obwohl CX+ Zellen im unbestrahlten Zustand geringere Mengen PI3K und Akt exprimierten. Insbesondere der Quantifizierung der aktivierten Formen der Proteine PI3K, Akt, SMAD2/3/4 und -7 mittels Antikörpern, welche zwischen phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinformen unterscheiden können, kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. So konnten in der vorliegenden Arbeit nur Unterschiede in der Gesamtmenge der jeweiligen Proteine beleuchtet werden. Trotz identischem Gesamtproteingehalts kann jedoch eine unterschiedliche Aktivierung der Proteine vorliegen, dies gilt es in weiteren Analysen zu eruieren.

Essentiell für die Beurteilung der Rolle von GRP78 in der vorliegenden Arbeit ist die Analyse, wie viel GRP78 auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, wie sich dieser Gehalt zwischen den Subzelllinien unterscheidet und wie er durch eine subletale Bestrahlung beeinflusst wird. Diesen Fragen kann durch FACS-Analysen mit einem gegen GRP78 gerichteten FITC-konjugierten Antikörper nachgegangen werden.

Eine Analyse von (m)Hsp70-enhaltenden Vesikeln im Zellkulturmedium vor und nach der Bestrahlung, zum Beispiel mittels ELISA, sollte außerdem erfolgen. Somit kann beleuchtet werden, ob, bei Betrachtung der Subzelllinie CX+, nach der Bestrahlung übermäßig viel mHsp70 auf Vesikeln im Extrazellulärraum/Zellkulturmedium erscheint. Der Nachweis von überdurchschnittlich vielen oder dicht gepackten Vesikeln mit mHsp70 im Medium von CX+-Zellen würde die zuvor aufgestellte Hypothese erhärten, dass CX+ Zellen überschüssiges mHsp70 als Vesikel in das EZM freisetzen, wenn die Kapazität ihrer Membran zur Integration von mHsp70 erschöpft ist (Gastpar et al., 2005).

Außerdem sollte nach weiteren Strukturen auf CX-/CX+ Zellen gesucht werden, welche als Erkennungssignale für eHsp70 dienen können und somit das Potenzial besitzen, extrazellulär erhaltene Signale nach intrazellulär weiterzuleiten, um darüber Signalwege zu modulieren.

Von besonderer Bedeutung ist darüber hinaus die Durchführung von klonogenen Assays mit den beiden Subzelllinien. Damit könnte bewiesen werden, dass sich auch in den beobachteten Zellen Unterschiede in der Proliferation nach Bestrahlung finden lassen. Assays mit einer Aussaat von 1600, 800, 400, und 200 Zellen/cm³ wurden durchgeführt, diese Zellen wurden Strahlendosen von 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy ausgesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse waren nicht auswertbar, da sich die Zellen jeweils zu ungewöhnlichen Ansammlungen (Haufen) formierten. Dieses Experiment sollte daher wiederholt werden.

Zusammengefasst ist vorstellbar, dass beobachtete strahleninduzierte Unterschiede zwischen CX- und CX+ Zellen in CX+ Zellen *via* Vesikeln vermittelt wurden, und zwar direkt durch eHsp70 oder durch die Wirkung anderer Vesikelinhalte wie den Proteinen mBag-4 oder HMGB1. Ebenfalls scheint es plausibel, dass in CX+ Zellen, im Vergleich zu CX- Zellen, nach Bestrahlung HSPs effektiver aktiviert werden können. Ob einer der beiden Mechanismen tatsächlich dafür verantwortlich ist, dass CX+ Zellen resistenter gegenüber Bestrahlung sind als solche der Subzelllinie CX-, konnte letzten Endes nicht geklärt werden. Wohl aber liegen starke Hinweise dafür vor, dass *post radiationem* in CX+ Zellen Cripto-1-abhängige Signalwege verstärkt aktiviert werden können. Durch wenige zusätzliche Experimente könnten einige noch offene Fragen zeitnah beantwortet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass Zellen, die Hsp70 auf ihrer Oberfläche tragen (mHsp70), resistenter gegenüber verschiedenen Stressstimuli sind als solche, welche das Protein nicht auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch Proteinbestimmungen in den Subzelllinien CX- und CX+ der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie CX2, welche wenig (CX-) oder viel (CX+) Hsp70 auf ihrer Oberfläche zeigten, wurde der Zusammenhang von mHsp70 und Cripto-1-abhängigen Signalwegen untersucht.

Dazu wurden die Anteile mHsp70 positiver Zellen in scheinbestrahlten und bestrahlten Zellen (nach Einwirkung einer subletalen Röntgenstrahlung der Dosis 10 Gy) jeder Subzelllinie bestimmt. Mittels Western Blots wurden die zytosolischen Proteingehalte der Subzelllinien 24 h nach Scheinbestrahlung bzw. 24 h nach Bestrahlung quantifiziert und Unterschiede der basalen und strahleninduzierten Proteinexpressionen zwischen den Subzelllinien analysiert. Bestimmt wurden dabei die Proteine Hsp70, GRP78, SMAD2/3, SMAD4, PI3K und Akt.

Die Bestrahlung veränderte die Expressionen des zytosolischen Hsp70 in CX- und CX+ Zellen nicht. Auf der Membran wurde ein strahleninduziert erhöhter Hsp70-Anteil nur für Zellen der Subzelllinie CX- beobachtet, für CX+ Zellen blieb der Anteil mHsp70 positiver Zellen unverändert. Der Grund hierfür könnte sein, dass es eine Kapazitätsgrenze für die Membranexpression von Hsp70 gibt. Auf CX+ Zellen war diese möglicherweise bereits im unbestrahlten Zustand erreicht, während der Anteil mHsp70 positiver CX- Zellen durch die Bestrahlung noch bis zu diesem Maximalwert gesteigert werden konnte.

Nach der Bestrahlung war in Zellen der Subzelllinie CX+ eine signifikant erhöhte GRP78-Expression zu verzeichnen, in CX- Zellen konnte diese nicht beobachtet werden. GRP78 ist für die Wirkung von Cripto-1 essentiell. Durch das Zusammenwirken der beiden Proteine kann Tumorprogress gefördert und Resistenz vermittelt werden.

Die erhaltenen Daten legen die Vermutung nahe, dass in CX+ Zellen nach der Einwirkung von Röntgenstrahlung Cripto-1-abhängige Signalwege verstärkt aktiviert werden können. Es liegen keine Hinweise darauf vor, dass dies auch für Zellen der Subzelllinie CX- gilt.

Die verstärkte Aktivierbarkeit von Cripto-1-abhängigen Signalwegen könnte auf die vermehrte Anwesenheit von GRP78 in und auf CX+ Zellen zurückzuführen sein. Diese könnte wiederum Folge einer erhöhten PI3K/Akt-Aktivität der Zellen sein oder in einer

verstärkten strahleninduzierten Aktivierbarkeit von HSPs in CX+ Zellen begründet liegen. Darüber hinaus ist es auch vorstellbar, dass die Beobachtungen Folge einer verstärkten Anwesenheit von extrazellulärem Hsp70 im Zellkulturmedium von Zellen der Subzelllinie CX+ sind und beobachtete Effekte autokrin, parakrin oder *via* Vesikeln vermittelt wurden.

Eine Quantifizierung von sGRP78 mittels einer FACS-Analyse sowie die Quantifizierung der aktivierten Formen der untersuchten Proteine SMAD2/3, SMAD4, PI3K und Akt mittels entsprechenden Antikörpern im Western Blot sollten die nächsten Schritte darstellen, um die Bedeutung Cripto-1-abhängiger Signalwege in der Vermittlung von Strahlenresistenz durch mHsp70 zu eruieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adkins, H. B., Bianco, C., Schiffer, S. G., Rayhorn, P., Zafari, M., Cheung, A. E., Orozco, O., Olson, D., De Luca, A., Chen, L. L., Miatkowski, K., Benjamin, C., Normanno, N., Williams, K. P., Jarpe, M., LePage, D., Salomon, D. & Sanicola, M. (2003). Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo. *J Clin Invest*, 112(4), 575-587.
- Akerfelt, M., Morimoto, R. I. & Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(8), 545-555.
- Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J. & Knaus, U. G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol*, 1(6), 533-540.
- Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B. & De Maio, A. (2004). Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J*, 18(14), 1636-1645.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C. & Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6(4), 435-442.
- Assinder, S. J., Dong, Q., Kovacevic, Z. & Richardson, D. R. (2009). The TGF-beta, PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J*, 417(2), 411-421.
- Baldwin, A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*, 107(3), 241-246.
- Barcellos-Hoff, M. H. & Cucinotta, F. A. (2014). New tricks for an old fox: impact of TGFbeta on the DNA damage response and genomic stability. *Sci Signal*, 7(341), re5.
- Barreto, A., Gonzalez, J. M., Kabingu, E., Asea, A. & Fiorentino, S. (2003). Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cell Immunol*, 222(2), 97-104.
- Baumeister, P., Dong, D., Fu, Y. & Lee, A. S. (2009). Transcriptional induction of GRP78/BiP by histone deacetylase inhibitors and resistance to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 8(5), 1086-1094.
- Bianco, C. & Salomon, D. S. (2010). Targeting the embryonic gene Cripto-1 in cancer and beyond. *Expert Opin Ther Pat*, 20(12), 1739-1749.
- Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Watanabe, K., Gonzales, M., Hamada, S., Raafat, A., Sahlah, L., Chang, C., Sotgia, F., Normanno, N., Lisanti, M. & Salomon, D. S. (2008). Regulation of Cripto-1 signaling and biological activity by caveolin-1 in mammary epithelial cells. *Am J Pathol*, 172(2), 345-357.
- Bianco, C., Strizzi, L., Rehman, A., Normanno, N., Wechselberger, C., Sun, Y., Khan, N., Hirota, M., Adkins, H., Williams, K., Margolis, R. U., Sanicola, M. & Salomon, D. S. (2003). A Nodal- and ALK4-independent signaling pathway activated by Cripto-1 through Glypican-1 and c-Src. *Cancer Res*, 63(6), 1192-1197.
- Bouquet, F., Pal, A., Pilonis, K. A., Demaria, S., Hann, B., Akhurst, R. J., Babb, J. S., Lonning, S. M., DeWyngaert, J. K., Formenti, S. C. & Barcellos-Hoff, M. H. (2011). TGFbeta1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo. *Clin Cancer Res*, 17(21), 6754-6765.
- Broquet, A. H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G. & Bachelet, M. (2003). Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant

- microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem*, 278(24), 21601-21606.
- Brown, D. A. & London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 275(23), 17221-17224.
- Brown, G., Rixon, H. W., Steel, J., McDonald, T. P., Pitt, A. R., Graham, S. & Sugrue, R. J. (2005). Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. *Virology*, 338(1), 69-80.
- Calini, V., Urani, C. & Camatini, M. (2003). Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro*, 17(5-6), 561-566.
- Chang, Y. J., Huang, Y. P., Li, Z. L. & Chen, C. H. (2012). GRP78 knockdown enhances apoptosis via the down-regulation of oxidative stress and Akt pathway after epirubicin treatment in colon cancer DLD-1 cells. *PLoS One*, 7(4), e35123.
- Ciccio, A. & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 40(2), 179-204.
- Ciocca, D. R., Arrigo, A. P. & Calderwood, S. K. (2013). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol*, 87(1), 19-48.
- Ciocca, D. R. & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*, 10(2), 86-103.
- Daugaard, M., Rohde, M. & Jaattela, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581(19), 3702-3710.
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11(1), 1-12.
- De Maio, A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, 16(3), 235-249.
- De Maio, A. (2014). Extracellular Hsp70: export and function. *Curr Protein Pept Sci*, 15(3), 225-231.
- Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, 29(2), 117-129.
- Dong, D., Ni, M., Li, J., Xiong, S., Ye, W., Virrey, J. J., Mao, C., Ye, R., Wang, M., Pen, L., Dubeau, L., Groshen, S., Hofman, F. M. & Lee, A. S. (2008). Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res*, 68(2), 498-505.
- Evdonin, A. L., Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Guzhova, I. V., Margulis, B. A. & Medvedeva, N. D. (2006). The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *Eur J Cell Biol*, 85(6), 443-455.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J. C. & Gould, S. J. (2007). Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol*, 5(6), e158.
- Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N. & Lindquist, S. (1992). The consequences of expressing hsp70 in Drosophila cells at normal temperatures. *Genes Dev*, 6(8), 1402-1413.
- Feng, X. P., Yi, H., Li, M. Y., Li, X. H., Yi, B., Zhang, P. F., Li, C., Peng, F., Tang, C. E., Li, J. L., Chen, Z. C. & Xiao, Z. Q. (2010). Identification of biomarkers for

- predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics. *Cancer Res*, 70(9), 3450-3462.
- Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M. R. & Rugarli, C. (1992). Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer*, 51(4), 613-619.
- Fiocchi, C. (2001). TGF-beta/Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *J Clin Invest*, 108(4), 523-526.
- Firczuk, M., Gabrysiak, M., Barankiewicz, J., Domagala, A., Nowis, D., Kujawa, M., Jankowska-Steifer, E., Wachowska, M., Glodkowska-Mrowka, E., Korsak, B., Winiarska, M. & Golab, J. (2013). GRP78-targeting subtilase cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy. *Cell Death Dis*, 4, e741.
- Foti, D. M., Welihinda, A., Kaufman, R. J. & Lee, A. S. (1999). Conservation and divergence of the yeast and mammalian unfolded protein response. Activation of specific mammalian endoplasmic reticulum stress element of the grp78/BiP promoter by yeast Hac1. *J Biol Chem*, 274(43), 30402-30409.
- Frey, B., Stache, C., Rubner, Y., Werthmoller, N., Schulz, K., Sieber, R., Semrau, S., Rodel, F., Fietkau, R. & Gaipl, U. S. (2012). Combined treatment of human colorectal tumor cell lines with chemotherapeutic agents and ionizing irradiation can in vitro induce tumor cell death forms with immunogenic potential. *J Immunotoxicol*, 9(3), 301-313.
- Fu, Y. & Lee, A. S. (2006). Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther*, 5(7), 741-744.
- Fukao, T. & Koyasu, S. (2003). PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol*, 24(7), 358-363.
- Fuxe, J., Vincent, T. & Garcia de Herreros, A. (2010). Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*, 9(12), 2363-2374.
- Gabai, V. L., Yaglom, J. A., Waldman, T. & Sherman, M. Y. (2009). Heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence pathways in cancer cells. *Mol Cell Biol*, 29(2), 559-569.
- Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M. A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J. A. & Multhoff, G. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res*, 65(12), 5238-5247.
- Gehrman, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, G. & Multhoff, G. (2008). Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One*, 3(4), e1925.
- Gehrman, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela, M., Zilch, T. & Multhoff, G. (2005). Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ*, 12(1), 38-51.
- Gehrman, M., Radons, J., Molls, M. & Multhoff, G. (2008). The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress Chaperones*, 13(1), 1-10.
- Gehrman, M., Specht, H. M., Bayer, C., Brandstetter, M., Chizzali, B., Duma, M., Breuninger, S., Hube, K., Lehnerer, S., van Phi, V., Sage, E., Schmid, T. E., Sedelmayr, M., Schilling, D., Sievert, W., Stangl, S. & Multhoff, G. (2014). Hsp70--a biomarker for tumor detection and monitoring of outcome of radiation

- therapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol*, 9, 131.
- Gehrmann, M., Stangl, S., Foulds, G. A., Oellinger, R., Breuninger, S., Rad, R., Pockley, A. G. & Multhoff, G. (2014). Tumor imaging and targeting potential of an Hsp70-derived 14-mer peptide. *PLoS One*, 9(8), e105344.
- Gonzalez-Gronow, M., Cuchacovich, M., Llanos, C., Urzua, C., Gawdi, G. & Pizzo, S. V. (2006). Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. *Cancer Res*, 66(23), 11424-11431.
- Gonzalez-Gronow, M., Selim, M. A., Papalas, J. & Pizzo, S. V. (2009). GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal*, 11(9), 2299-2306.
- Gray, M. J., Mhawech-Fauceglia, P., Yoo, E., Yang, W., Wu, E., Lee, A. S. & Lin, Y. G. (2013). AKT inhibition mitigates GRP78 (glucose-regulated protein) expression and contribution to chemoresistance in endometrial cancers. *Int J Cancer*, 133(1), 21-30.
- Gray, P. C., Harrison, C. A. & Vale, W. (2003). Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(9), 5193-5198.
- Gray, P. C. & Vale, W. (2012). Cripto/GRP78 modulation of the TGF-beta pathway in development and oncogenesis. *FEBS Lett*, 586(14), 1836-1845.
- Gross, C., Koelch, W., DeMaio, A., Arispe, N. & Multhoff, G. (2003). Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem*, 278(42), 41173-41181.
- Guzhova, I., Kislyakova, K., Moskaliyova, O., Fridlanskaya, I., Tytell, M., Cheetham, M. & Margulis, B. (2001). In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res*, 914(1-2), 66-73.
- Haen, S. P., Gouttefangeas, C., Schmidt, D., Boss, A., Clasen, S., von Herbay, A., Kosan, B., Aebert, H., Pereira, P. L. & Rammensee, H. G. (2011). Elevated serum levels of heat shock protein 70 can be detected after radiofrequency ablation. *Cell Stress Chaperones*, 16(5), 495-504.
- Hardee, M. E., Marciscano, A. E., Medina-Ramirez, C. M., Zagzag, D., Narayana, A., Lonning, S. M. & Barcellos-Hoff, M. H. (2012). Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer Res*, 72(16), 4119-4129.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571-579.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
- Hendershot, L. M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, 71(5), 289-297.
- Hightower, L. E. & Guidon, P. T., Jr. (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol*, 138(2), 257-266.
- Hong, D. S., Banerji, U., Tavana, B., George, G. C., Aaron, J. & Kurzrock, R. (2013). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer Treat Rev*, 39(4), 375-387.

- Horbelt, D., Denkis, A. & Knaus, P. (2012). A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(3), 469-474.
- Horvath, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A. & Vigh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta*, 1778(7-8), 1653-1664.
- Hu, X. F., Li, J., Yang, E., Vandervalk, S. & Xing, P. X. (2007). Anti-Cripto Mab inhibit tumour growth and overcome MDR in a human leukaemia MDR cell line by inhibition of Akt and activation of JNK/SAPK and bad death pathways. *Br J Cancer*, 96(6), 918-927.
- Jaattela, M. (1999a). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, 248(1), 30-43.
- Jaattela, M. (1999b). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med*, 31(4), 261-271.
- Jaattela, M. & Wissing, D. (1992). Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med*, 24(4), 249-258.
- Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T. & Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J*, 17(21), 6124-6134.
- Kamato, D., Burch, M. L., Piva, T. J., Rezaei, H. B., Rostam, M. A., Xu, S., Zheng, W., Little, P. J. & Osman, N. (2013). Transforming growth factor-beta signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cell Signal*, 25(10), 2017-2024.
- Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B. & Hightower, L. E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 14(1), 105-111.
- Kanamoto, T., Hellman, U., Heldin, C. H. & Souchelnytskyi, S. (2002). Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. *EMBO J*, 21(5), 1219-1230.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H. & Wrana, J. L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*, 6(6), 1365-1375.
- Kelber, J. A., Panopoulos, A. D., Shani, G., Booker, E. C., Belmonte, J. C., Vale, W. W. & Gray, P. C. (2009). Blockade of Cripto binding to cell surface GRP78 inhibits oncogenic Cripto signaling via MAPK/PI3K and Smad2/3 pathways. *Oncogene*, 28(24), 2324-2336.
- Kelber, J. A., Shani, G., Booker, E. C., Vale, W. W. & Gray, P. C. (2008). Cripto is a noncompetitive activin antagonist that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *J Biol Chem*, 283(8), 4490-4500.
- Kelley, W. L. (1999). Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr Biol*, 9(8), R305-308.
- Kern, J., Untergasser, G., Zenzmaier, C., Sarg, B., Gastl, G., Gunsilius, E. & Steurer, M. (2009). GRP-78 secreted by tumor cells blocks the antiangiogenic activity of bortezomib. *Blood*, 114(18), 3960-3967.
- Kiang, J. G., Gist, I. D. & Tsokos, G. C. (2000). Regulation of heat shock protein 72 kDa and 90 kDa in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol Cell Biochem*, 204(1-2), 169-178.
- Kirshner, J., Jobling, M. F., Pajares, M. J., Ravani, S. A., Glick, A. B., Lavin, M. J., Koslov, S., Shiloh, Y. & Barcellos-Hoff, M. H. (2006). Inhibition of

- transforming growth factor-beta1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress. *Cancer Res*, 66(22), 10861-10869.
- Klauzinska, M., Castro, N. P., Rangel, M. C., Spike, B. T., Gray, P. C., Bertolette, D., Cuttitta, F. & Salomon, D. (2014). The multifaceted role of the embryonic gene Cripto-1 in cancer, stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *Semin Cancer Biol*, 29, 51-58.
- Kleinjung, T., Arndt, O., Feldmann, H. J., Bockmuhl, U., Gehrmann, M., Zilch, T., Pfister, K., Schonberger, J., Marienhagen, J., Eilles, C., Rossbacher, L. & Multhoff, G. (2003). Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy-a target for natural killer (NK) cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57(3), 820-826.
- Lee, A. S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35(4), 373-381.
- Lee, A. S. (2014). Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*, 14(4), 263-276.
- Lee, H. Y., Jung, J. H., Cho, H. M., Kim, S. H., Lee, K. M., Kim, H. J., Lee, J. H. & Shim, B. Y. (2015). GRP78 Protein Expression as Prognostic Values in Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Laparoscopic Surgery for Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancer Res Treat*.
- Lee, K. H., Jeong, J. & Yoo, C. G. (2013). Positive feedback regulation of heat shock protein 70 (Hsp70) is mediated through Toll-like receptor 4-PI3K/Akt-glycogen synthase kinase-3beta pathway. *Exp Cell Res*, 319(1), 88-95.
- Li, B., Cheng, X. L., Yang, Y. P. & Li, Z. Q. (2013). GRP78 mediates radiation resistance of a stem cell-like subpopulation within the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncol Rep*, 30(5), 2119-2126.
- Li, J. & Lee, A. S. (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*, 6(1), 45-54.
- Li, L., Story, M. & Legerski, R. J. (2001). Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49(4), 1157-1162.
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22, 631-677.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M. & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8(8), 627-644.
- Liu, R., Li, X., Gao, W., Zhou, Y., Wey, S., Mitra, S. K., Krasnoperov, V., Dong, D., Liu, S., Li, D., Zhu, G., Louie, S., Conti, P. S., Li, Z., Lee, A. S. & Gill, P. S. (2013). Monoclonal antibody against cell surface GRP78 as a novel agent in suppressing PI3K/AKT signaling, tumor growth, and metastasis. *Clin Cancer Res*, 19(24), 6802-6811.
- Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M. T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcalá, S., Rodriguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J. C., Torres-Ruiz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrian, D. A., Heuchel, R., Lohr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A. & Heeschen, C. (2011). Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell*, 9(5), 433-446.
- Lu, C., Liu, L., Chen, Y., Ha, T., Kelley, J., Schweitzer, J., Kalbfleisch, J. H., Kao, R. L., Williams, D. L. & Li, C. (2011). TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling. *J Immunol*, 187(3), 1458-1466.

- Luo, B. & Lee, A. S. (2013). The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, 32(7), 805-818.
- Mambula, S. S. & Calderwood, S. K. (2006). Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol*, 177(11), 7849-7857.
- Martelli, A. M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P. L., Evangelisti, C. & Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 20(6), 911-928.
- Mason, P. B., Jr. & Lis, J. T. (1997). Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem*, 272(52), 33227-33233.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), 215-230.
- Mayer, M. P. & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62(6), 670-684.
- Milarski, K. L. & Morimoto, R. I. (1986). Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(24), 9517-9521.
- Misra, U. K., Deedwania, R. & Pizzo, S. V. (2006). Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem*, 281(19), 13694-13707.
- Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., Wang, F. & Pizzo, S. V. (2004). A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates alpha2M*-induced signalling. *Cell Signal*, 16(8), 929-938.
- Misra, U. K. & Pizzo, S. V. (2012). Receptor-recognized alpha(2)-macroglobulin binds to cell surface-associated GRP78 and activates mTORC1 and mTORC2 signaling in prostate cancer cells. *PLoS One*, 7(12), e51735.
- Morgan, W. D. (1989). Transcription factor Sp1 binds to and activates a human hsp70 gene promoter. *Mol Cell Biol*, 9(9), 4099-4104.
- Morgan, W. D., Williams, G. T., Morimoto, R. I., Greene, J., Kingston, R. E. & Tjian, R. (1987). Two transcriptional activators, CCAAT-box-binding transcription factor and heat shock transcription factor, interact with a human hsp70 gene promoter. *Mol Cell Biol*, 7(3), 1129-1138.
- Morikawa, M., Koinuma, D., Miyazono, K. & Heldin, C. H. (2013). Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene*, 32(13), 1609-1615.
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, 12(24), 3788-3796.
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W. & Issels, R. D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer*, 61(2), 272-279.
- Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C. C., Milner, C. M., Wenk, S., Eissner, G., Kampinga, H. H., Laumbacher, B. & Johnson, J. (1999). Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol*, 27(11), 1627-1636.
- Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M. & Hiddemann, W. (2001). A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones*, 6(4), 337-344.

- Multhoff, G., Pockley, A. G., Schmid, T. E. & Schilling, D. (2015). The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Lett.*
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181-1188.
- Nagaoka, T., Karasawa, H., Castro, N. P., Rangel, M. C., Salomon, D. S. & Bianco, C. (2012). An evolving web of signaling networks regulated by Cripto-1. *Growth Factors*, 30(1), 13-21.
- Nickel, W. & Seedorf, M. (2008). Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 287-308.
- Nicolas, F. J. & Hill, C. S. (2003). Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. *Oncogene*, 22(24), 3698-3711.
- Niforou, K., Cheimonidou, C. & Trougakos, I. P. (2014). Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol*, 2, 323-332.
- Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F. & Jaattela, M. (2000). Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 7871-7876.
- Nylandsted, J., Wick, W., Hirt, U. A., Brand, K., Rohde, M., Leist, M., Weller, M. & Jaattela, M. (2002). Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res*, 62(24), 7139-7142.
- Oglesbee, M. J., Herdman, A. V., Passmore, G. G. & Hoffman, W. H. (2005). Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. *Clin Biochem*, 38(10), 900-904.
- Paraiso, K. H., Haarberg, H. E., Wood, E., Rebecca, V. W., Chen, Y. A., Xiang, Y., Ribas, A., Lo, R. S., Weber, J. S., Sondak, V. K., John, J. K., Sarnaik, A. A., Koomen, J. M. & Smalley, K. S. (2012). The HSP90 inhibitor XL888 overcomes BRAF inhibitor resistance mediated through diverse mechanisms. *Clin Cancer Res*, 18(9), 2502-2514.
- Pardali, K. & Moustakas, A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1775(1), 21-62.
- Park, S., Kang, J. M., Kim, S. J., Kim, H., Hong, S., Lee, Y. J. & Kim, S. J. (2015). Smad7 enhances ATM activity by facilitating the interaction between ATM and Mre11-Rad50-Nbs1 complex in DNA double-strand break repair. *Cell Mol Life Sci*, 72(3), 583-596.
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*, 27, 437-496.
- Pfaffenbach, K. T., Pong, M., Morgan, T. E., Wang, H., Ott, K., Zhou, B., Longo, V. D. & Lee, A. S. (2012). GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling. *J Cell Physiol*, 227(12), 3803-3811.
- Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J. G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H. J., Milani, V., Issels, R. & Multhoff, G. (2007). Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer*, 110(4), 926-935.
- Philippova, M., Ivanov, D., Joshi, M. B., Kyriakakis, E., Rupp, K., Afonyushkin, T., Bochkov, V., Erne, P. & Resink, T. J. (2008). Identification of proteins associating with glycosylphosphatidylinositol- anchored T-cadherin on the surface of vascular endothelial cells: role for Grp78/BiP in T-cadherin-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 28(12), 4004-4017.

- Plociennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzecka, K. & Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*, 72(3), 557-581.
- Pockley, A. G., Muthana, M. & Calderwood, S. K. (2008). The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci*, 33(2), 71-79.
- Powers, M. V., Jones, K., Barillari, C., Westwood, I., van Montfort, R. L. & Workman, P. (2010). Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle*, 9(8), 1542-1550.
- Roue, G., Perez-Galan, P., Mozos, A., Lopez-Guerra, M., Xargay-Torrent, S., Rosich, L., Saborit-Villarroya, I., Normant, E., Campo, E. & Colomer, D. (2011). The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood*, 117(4), 1270-1279.
- Russo, S. M., Tepper, J. E., Baldwin, A. S., Jr., Liu, R., Adams, J., Elliott, P. & Cusack, J. C., Jr. (2001). Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(1), 183-193.
- Sadekova, S., Lehnert, S. & Chow, T. Y. (1997). Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol*, 72(6), 653-660.
- Saloman, D. S., Bianco, C., Ebert, A. D., Khan, N. I., De Santis, M., Normanno, N., Wechselberger, C., Seno, M., Williams, K., Sanicola, M., Foley, S., Gullick, W. J. & Persico, G. (2000). The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7(4), 199-226.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N. & Hoon, D. S. (2009). Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 2 Suppl 1, 205-214.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Sartiel, A., Gatti, R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M. F., Jaspers, N. G., Taylor, A. M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S. & Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268(5218), 1749-1753.
- Schilling, D., Gehrman, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A. G., Abend, M., Molls, M. & Multhoff, G. (2009). Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *FASEB J*, 23(8), 2467-2477.
- Schmid, T. E. & Multhoff, G. (2012). Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses. *Curr Med Chem*, 19(12), 1765-1770.
- Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G. & Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*, 81(1), 15-27.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675.
- Shani, G., Fischer, W. H., Justice, N. J., Kelber, J. A., Vale, W. & Gray, P. C. (2008). GRP78 and Cripto form a complex at the cell surface and collaborate to inhibit transforming growth factor beta signaling and enhance cell growth. *Mol Cell Biol*, 28(2), 666-677.

- Sherman, M. Y. & Gabai, V. L. (2014). Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene*.
- Shi, Y., Mosser, D. D. & Morimoto, R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*, 12(5), 654-666.
- Shiloh, Y. & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(4), 197-210.
- Shin, B. K., Wang, H., Yim, A. M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J. H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C. W., Misek, D. E. & Hanash, S. M. (2003). Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem*, 278(9), 7607-7616.
- Srivastava, P. K. (1997). Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods*, 12(2), 165-171.
- Stangl, S., Gehrman, M., Dressel, R., Alves, F., Dullin, C., Themelis, G., Ntziachristos, V., Staebelin, E., Walch, A., Winkelmann, I. & Multhoff, G. (2011). In vivo imaging of CT26 mouse tumours by using cmHsp70.1 monoclonal antibody. *J Cell Mol Med*, 15(4), 874-887.
- Stangl, S., Varga, J., Freysoldt, B., Trajkovic-Arsic, M., Siveke, J. T., Greten, F. R., Ntziachristos, V. & Multhoff, G. (2014). Selective in vivo imaging of syngeneic, spontaneous, and xenograft tumors using a novel tumor cell-specific hsp70 peptide-based probe. *Cancer Res*, 74(23), 6903-6912.
- Strizzi, L., Bianco, C., Normanno, N. & Salomon, D. (2005). Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. *Oncogene*, 24(37), 5731-5741.
- Strizzi, L., Margaryan, N. V., Gilgur, A., Hardy, K. M., Normanno, N., Salomon, D. S. & Hendrix, M. J. (2013). The significance of a Cripto-1 positive subpopulation of human melanoma cells exhibiting stem cell-like characteristics. *Cell Cycle*, 12(9), 1450-1456.
- Tabatabai, G., Frank, B., Mohle, R., Weller, M. & Wick, W. (2006). Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain*, 129(Pt 9), 2426-2435.
- Taira, T., Narita, T., Iguchi-Arigo, S. M. & Ariga, H. (1997). A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. *Nucleic Acids Res*, 25(10), 1975-1983.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I. & Anderson, R. L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*, 1(1), 23-28.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. & Davis, R. J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 288(5467), 870-874.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Tytell, M., Greenberg, S. G. & Lasek, R. J. (1986). Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res*, 363(1), 161-164.
- Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N. & De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol*, 180(6), 4299-4307.

- Wakefield, L. M. & Hill, C. S. (2013). Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(5), 328-341.
- Wang, M., Saha, J., Hada, M., Anderson, J. A., Pluth, J. M., O'Neill, P. & Cucinotta, F. A. (2013). Novel Smad proteins localize to IR-induced double-strand breaks: interplay between TGFbeta and ATM pathways. *Nucleic Acids Res*, 41(2), 933-942.
- Wang, M. H., Grossmann, M. E. & Young, C. Y. (2004). Forced expression of heat-shock protein 70 increases the secretion of Hsp70 and provides protection against tumour growth. *Br J Cancer*, 90(4), 926-931.
- Watanabe, K., Hamada, S., Bianco, C., Mancino, M., Nagaoka, T., Gonzales, M., Bailly, V., Strizzi, L. & Salomon, D. S. (2007). Requirement of glycosylphosphatidylinositol anchor of Cripto-1 for trans activity as a Nodal co-receptor. *J Biol Chem*, 282(49), 35772-35786.
- Wendel, H. G., De Stanchina, E., Fridman, J. S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J. & Lowe, S. W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*, 428(6980), 332-337.
- West, K. A., Castillo, S. S. & Dennis, P. A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*, 5(6), 234-248.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 87.
- Wu, B. J., Kingston, R. E. & Morimoto, R. I. (1986). Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(3), 629-633.
- Wu, F. H., Yuan, Y., Li, D., Liao, S. J., Yan, B., Wei, J. J., Zhou, Y. H., Zhu, J. H., Zhang, G. M. & Feng, Z. H. (2012). Extracellular HSPA1A promotes the growth of hepatocarcinoma by augmenting tumor cell proliferation and apoptosis-resistance. *Cancer Lett*, 317(2), 157-164.
- Wu, M. J., Jan, C. I., Tsay, Y. G., Yu, Y. H., Huang, C. Y., Lin, S. C., Liu, C. J., Chen, Y. S., Lo, J. F. & Yu, C. C. (2010). Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Mol Cancer*, 9, 283.
- Zhang, S., Ekman, M., Thakur, N., Bu, S., Davoodpour, P., Grimsby, S., Tagami, S., Heldin, C. H. & Landstrom, M. (2006). TGFbeta1-induced activation of ATM and p53 mediates apoptosis in a Smad7-dependent manner. *Cell Cycle*, 5(23), 2787-2795.
- Zhang, X., Xu, Z., Zhou, L., Chen, Y., He, M., Cheng, L., Hu, F. B., Tanguay, R. M. & Wu, T. (2010). Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome. *Cell Stress Chaperones*, 15(5), 675-686.
- Zhang, Y., Liu, R., Ni, M., Gill, P. & Lee, A. S. (2010). Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem*, 285(20), 15065-15075.
- Zhang, Y., Tseng, C. C., Tsai, Y. L., Fu, X., Schiff, R. & Lee, A. S. (2013). Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocation of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One*, 8(11), e80071.
- Zhou, B. B. & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439.
- Zimmermann, F. B., Geinitz, H., Schill, S., Thamm, R., Nieder, C., Schratzenstaller, U. & Molls, M. (2006). Stereotactic hypofractionated radiotherapy in stage I (T1-2 N0 M0) non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Acta Oncol*, 45(7), 796-801.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Allen voran Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Multhoff (Klinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie, Klinikum rechts der Isar) für die Überlassung des spannenden Themas und die konstruktive Unterstützung in sämtlichen Belangen.

Außerdem PD Dr. rer. nat. Mathias Gehrman für die exzellente Betreuung: Für die Unterstützung im Labor, den stets konstruktiven Input, seine Geduld sowie für seine Offenheit für sämtliche Rückfragen, die stets in Windeseile beantwortet wurden.

Ebenfalls geht mein Dank an alle Mitarbeiter der Klinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie, die mir während der Zeit im Labor zur Seite standen: PD Dr. rer. nat. Thomas Schmid, Wolfgang Sievert, Dr. Daniela Schilling, Dr. Christine Bayer, Dr. Stefanie Breuninger, Dr. Stefan Stangl, Jessy Pelzl und Andrea Mair. Ein ganz besonderer Dank soll dabei an Dr. med. Isabella Braun gehen, deren Gesellschaft ich während der gesamten Zeit im Labor genießen durfte und deren Vorwissen und Erfahrungen wesentlich zum Gelingen der Experimente beitrugen.

Und last but not least: Danke Hias für die Unterstützung über die gesamten Jahre, in denen auch Du so häufig zurückstecken musstest.