

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

**Untersuchung zur Rolle von Caveolin-1 für die zelluläre
Strahlenantwort humaner Pankreastumorzellen**

Silke Frick

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

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Priv.-Doz. Dr. N. Cordes 2. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 30.07.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2008 angenommen.

Kurz-Zusammenfassung

Caveolin-1 ist ein Zellmembranprotein und spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Interaktion und in der zellulären Strahlenresistenz. Dabei interagiert Caveolin-1 mit anderen Proteinen der Signaltransduktion. Um die zelluläre Strahlenantwort humaner Pankreaskarzinomzellen nach Caveolin-1 Knockdown zu untersuchen und den Mechanismus der Signaltransduktion in Abhängigkeit von Caveolin-1 besser zu verstehen, wurden humane Pankreaskarzinomzellen mit siRNA gegen Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK einfach und doppelt transfiziert. Nach Bestrahlung wurden Koloniebildungstests, Zellzyklusanalysen, Adhäsionsversuche und Wachstumskurvenanalysen durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche Strahlensensibilisierung der Pankreaskarzinomzellen PA-TU 8902 nach Reduktion von Caveolin-1 beobachtet werden. Ursächlich dafür zeigte sich eine komplexe Interaktion von Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK. Die Ergebnisse demonstrieren die essentielle Rolle von Caveolin-1 für die zelluläre Strahlenresistenz und offerieren Caveolin-1 als mögliches zukünftiges Zielmolekül zur Erweiterung der multimodalen Antitumorthherapie des Pankreaskarzinoms.

Short Abstract

Caveolin-1 is a cell membrane protein and plays an important role in cell signaling, cell-cell-interaction and in cellular radiation resistance. Thereby it interacts with other signaling proteins. Human pancreatic tumor cells were single and double transfected against Caveolin-1, β 1-integrin, ILK and FAK to evaluate the cellular radiation resistance of the cells after Caveolin-1 knockdown and to expose the mechanism of cell signaling in dependence of Caveolin-1. Irradiation was followed by carrying out colony formation assays, cell cycle analysis, adhesion assays and proliferation analysis. In this context human pancreatic tumor cells PA-TU 8902 showed an increased radiation sensitivity after Caveolin-1 silencing. A complex interaction of Caveolin-1, β 1-integrin, ILK and FAK was the reason for this outcome. These findings illustrate the decisive role Caveolin-1 plays in cellular radiation resistance and offer Caveolin-1 as a possible future target to improve the multimodal anti tumor therapy of pancreatic cancer.

A	Inhaltsverzeichnis	
B	Untersuchung zur Rolle von Caveolin-1 für die zelluläre Strahlenantwort humaner Pankreastumorzellen	1
I.	Einleitung	
	Das exokrine Karzinom des Pankreas: Caveolin-1 als zukünftiges Target in der multimodalen Therapie?	1
II.	Grundlagen	3
	2.1. Caveolin-1: Ein multifunktionales Zellmembranprotein	3
	2.2. Signaltransduktion von Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK	7
	2.3. Die RNA-Interferenz als wichtiger Regulationsmechanismus in Eukaryonten	10
	2.4. Strahlenbiologie	13
	2.4.1. Wechselwirkungen von Strahlung mit biologischen Systemen	13
	2.4.2. Die zelluläre Strahlenantwort	15
III.	Material	17
	3.1. Zelllinien	17
	3.2. Medium	18
	3.3. Reagenzien	18
	3.4. Transfektionsreagenzien	25
	3.5. Verwendete Antikörper	28
	3.5.1. Antikörper für den Westernblot	28
	3.5.2. Antikörper für die Durchflußzytometrie	29
	3.6. Geräte und Hilfsmittel	30
	3.6.1. Geräte	30
	3.6.2. Hilfsmittel für Versuche und Zellkultur	31

3.6.3.	Materialien für die SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	31
3.6.4.	Verwendete Software	32
IV.	Methoden	33
4.1.	Zellkultur	33
4.1.1.	Subkultivierung der Zellen	33
4.1.2.	Einfrieren von Zellen	33
4.1.3.	Auftauen von Zellen	34
4.2.	Zellzahlermittlung mit dem Zählgerät	34
4.3.	Transfektion mit Caveolin-1-, β 1-Integrin-, ILK- und FAK-siRNA	35
4.3.1.	Vorbereitungen	35
4.3.2.	siRNA-Transfektion	36
4.3.3.	Kontrolle der Proteinreduktion mittels Westernblotting	37
4.3.4.	Schwierigkeiten der siRNA-Transfektion	37
4.4.	Koloniebildungsassay	39
4.4.1.	Historischer und mathematischer Hintergrund der Zellüberlebenskurven	39
4.4.2.	Plattierung der 6-Well-Platten	43
4.4.3.	Versuchsablauf und Bestrahlung	44
4.4.4.	Abstoppen der Koloniebildungsassays	44
4.5.	Erstellung von Wachstumskurven	45
4.6.	SDS-Gelelektrophorese und Westernblotting	45
4.6.1.	Verfahren der Proteinextraktion	45
4.6.2.	Quantitative Proteinanalyse mittels BCA-Proteinbestimmung	46
4.6.3.	Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese	47
4.6.4.	Herstellung und Vorbereitung der Gele für die Elektrophorese	47
4.6.5.	Die SDS-Gelelektrophorese	48
4.6.6.	Das Blotting: Arbeitsablauf und Ergebniskontrolle	49

4.6.7.	Detektion der Proteine	49
4.6.8.	Auswertung der Ergebnisse	51
4.7.	Nachweis ausgewählter Proteine nach Transfektion mit und ohne Bestrahlung mit 2 Gy	51
4.8.	Durchflußzytometrie	52
4.8.1.	Grundzüge der Durchflußzytometrie	52
4.8.2.	Der Zellzyklus	53
4.8.3.	Zellzyklus- und DNA-Gehaltsbestimmung mit Hilfe der BrdU-DNA-Doppelfärbung	54
4.8.4.	Versuchsdurchführung der Zellzyklusanalyse unter Verwendung von BrdU	55
4.8.5.	Ergebnisauswertung	55
4.9.	Adhäsionsversuche	56
4.9.1.	Bedeutung	56
4.9.2.	Versuchsdurchführung	56
4.10.	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	58
V.	Ergebnisse	59
5.1.	Zellüberlebenskurven nach siRNA-Transfektion gegen Caveolin-1 und Bestrahlung verschiedener humaner Tumorzelllinien	59
5.2.	SiRNA-Transfektion gegen Caveolin-1, β 1-Integrin-, ILK- und FAK an der Tumorzelllinie PA-TU 8902	60
5.2.1.	Kontrollwesternblots	60
5.2.2.	Zellüberlebenskurven nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy	62
5.2.3.	Zellwachstum nach Transfektion mit und ohne Bestrahlung von 2 Gy	63
5.2.4.	Adhäsionsversuche auf Polystyren und auf Proteinen der extrazellulären Matrix	65
5.2.5.	Nachweis ausgewählter Proteine nach Transfektion	67

5.2.6.	Nachweis ausgewählter Proteine nach Transfektion gegen Caveolin-1 und β 1-Integrin 1 und 3 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy	68
5.2.7.	Zellzyklusanalyse	70
VI.	Diskussion	72
VII.	Zusammenfassung	81
VIII.	Literaturverzeichnis	83
C	Abkürzungsverzeichnis	100
D	Danksagung	104
E	Lebenslauf	105

B Untersuchung zur Rolle von Caveolin-1 für die zelluläre Strahlenantwort humaner Pankreastumorzellen

I. Einleitung

Das exokrine Karzinom des Pankreas: Caveolin-1 als zukünftiges Target in der multimodalen Tumorthherapie?

Caveolin-1 ist nicht nur auf molekularer Ebene der Grundbaustein der Zelle zur Ausbildung von sogenannten Caveolae, Einstülpungen der Plasmamembran, sondern nimmt neben dieser strukturbildenden Funktion eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Interaktion und vor allem auch in der Endo-, Exo- und Transzytose ein [Carver, Schnitzer, 2003; Carver et al, 2003]. Da Caveolin-1 in verschiedenen Tumorzellen in unterschiedlicher Konzentration vorliegt, könnte auch die Rolle, die Caveolin-1 für die jeweilige Tumorzelle spielt, eine ganz andere sein. Um als Zielmolekül in der Antitumorthherapie in Frage zu kommen, müsste ein Tumor Caveolin-1 exprimieren und Caveolin-1 müsste eine Schlüsselfunktion im Zellüberleben und in der Zellantwort auf Bestrahlung und Chemotherapie im Sinne einer Resistenzbildung einnehmen. Hiermit wäre Caveolin-1, als integrales Membranprotein ein guter Angriffspunkt für eine effiziente multimodale Tumorthherapie, die eine konventionelle Radiotherapie mit einer molekularen Therapie verbindet.

Das exokrine Karzinom des Pankreas ist ein hochmaligner epithelialer Tumor, bei dem die exokrinen Anteile des Organs entarten und atypische Drüsenformationen ausbilden können [Böcker, 2001, S.761ff]. Aufgrund der drüsigen Struktur könnte dieser Tumor besonders von Caveolin-1, als Regulator der Exozytose, in bezug auf Therapieresistenz und Tumorkontrolle im Vergleich zu anderen humanen Tumoren abhängen. Da das exokrine Karzinom des Pankreas einen der aggressivsten humanen Tumore darstellt, der mit heute zur Verfügung stehenden Therapieoptionen mit einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 5 % immer noch eine infauste Prognose besitzt [Wannenmacher, 2006, S.529ff], wäre eine Optimierung der Therapie höchst wünschenswert.

Ziel dieser in-vitro-Arbeit ist, Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie PA-TU 8902 nach Caveolin-1 Knockdown im Hinblick auf die Radiosensibilität zu untersuchen. Ermöglicht wurde diese Reduktion durch die Methode der siRNA-Transfektion. Je umfassender die Abhängigkeit der Pankreaskarzinomzellen von Caveolin-1 und im besonderen die veränderte zelluläre Strahlenantwort nach Caveolin-1-Reduktion aufgedeckt und

verstanden werden, desto eher stellt sich mit Caveolin-1 eventuell ein neues zukünftiges potentes Zielmolekül in der Antitumorthherapie des Pankreaskarzinoms dar.

II. Grundlagen

2.1. Caveolin-1: Ein multifunktionales Zellmembranprotein

Caveolin-1 ist ein Mitglied der Caveolin-Familie. Bekannt sind Caveolin-1, Caveolin-2 und Caveolin-3, wobei sowohl ihre Verteilung in verschiedenen Zelltypen, als auch ihre Funktionen unterschiedlich sind [Carver, Schnitzer, 2003; Carver et al, 2003]. Caveolin-3 ist spezifisch in Muskelzellen zu finden, während Caveolin-1 und Caveolin-2 in den meisten Zelltypen koexprimiert werden [Fujimoto, 2000; Liu et al, 2002]. Caveolin-1, ein 21-24 kDa großes Protein, ist ein integrales Transmembranprotein, das maßgeblich an der Ausbildung sogenannter Caveolae, 50-100 nm große flaschenförmige Plasmamembraneinstülpungen, beteiligt ist [Podar et al, 2003]. Unten stehende Abbildung zeigt links (Abb. 1A) ein vereinfachtes Schema einer Caveola, rechts (Abb. 1B, C) eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Caveolae in Lipozyten.

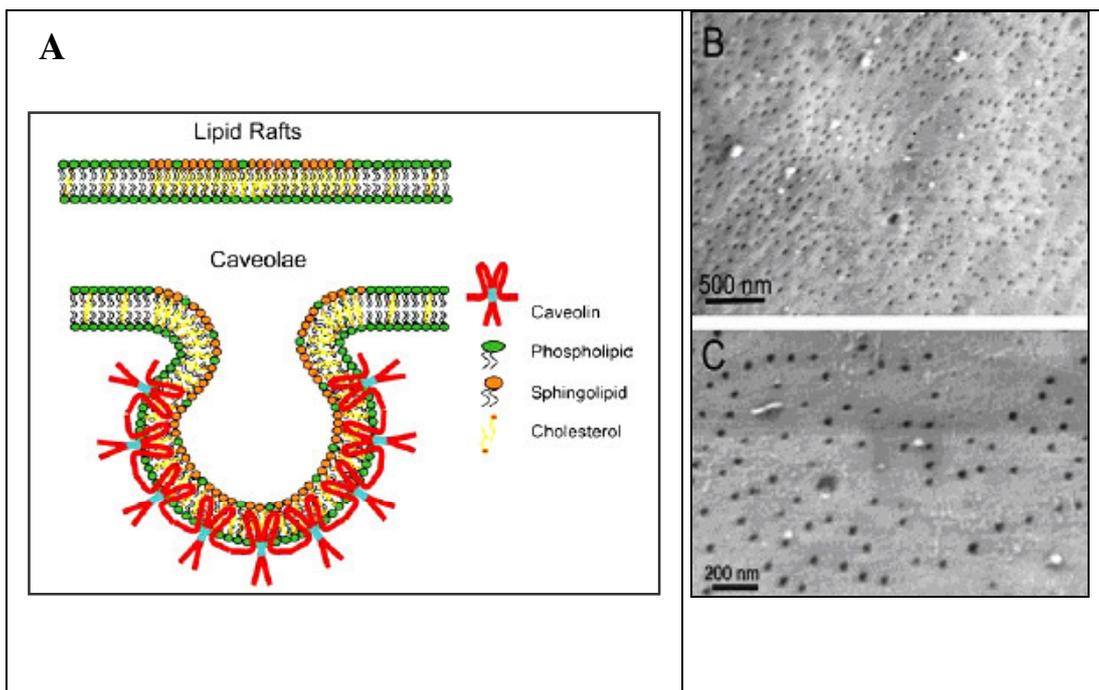


Abb. 1A.: Razani et al, 2002, S.45

Abb. 1B, C: Thorn et al, 2003, S. 3969

Caveolae können als eine Form spezialisierter *lipid rafts* angesehen werden. *Lipid rafts* sind Domänen in der Zellmembran, die sich durch eine veränderte Lipid- und Proteinzusammensetzung von der restlichen Membran unterscheiden und unter anderem für die Signaltransduktion der Zelle verantwortlich sind [Nichols,

2003; Nabi et al, 2003; Munro, 2003]. Caveolae sind zusammengesetzt aus Cholesterol, Shingolipiden und Phospholipiden und dem Strukturprotein Caveolin-1. Caveolin-1 besitzt einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus und eine intramembranäre Domäne mit einer schleifenartigen, sogenannte *hairpin loop* Struktur [Razani et al, 2002].

Neben diesen strukturbildenden Aufgaben des Caveolin-1 ist dieses unter anderem an der Endo-, Exo- und Transzytose und der Lipidhomöostase beteiligt und spielt eine große Rolle in der Tumorgenese und Tumorprogression im Sinne der Regulation des Zellüberlebens und des Metastasierungspotentials [Ho et al, 2002; Juhasz et al, 2003]. So zeigte eine erhöhte Caveolin-1-Expression eine Korrelation mit fortgeschritteneren und metastasierten Stadien beim Nierenzellkarzinom [Campbell et al, 2003]. Eine erhöhte Expression von Caveolin-1 wurde auch mit Tumorprogression und schlechterer Prognose beim Pankreasadenokarzinom in Zusammenhang gebracht [Suzuoki et al, 2002], wohingegen andere Studien Caveolin-1 eher im Sinne eines Tumorsuppressorproteins identifizierten, zum Beispiel exprimieren viele Bronchialkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen kein oder wenig Caveolin-1 [Podar et al, 2003].

Auf zytoplasmatischer Seite vernetzt Caveolin-1 zytoskelettassoziierte Proteine, Zelladhäsionsmoleküle und verschiedene Signalmoleküle miteinander und greift regulatorisch in damit verbundene Signalprozesse ein. Zudem bildet Caveolin-1 unter anderem Komplexe mit β 1-Integrin, IL 6-Rezeptor oder *Insulin-like growth factor* und es werden Interaktionen von Caveolin-1 mit G-Proteinen, nicht Rezeptor-gebundenen Tyrosinkinase, PDGF, eNOS und RAS beschrieben, die durch deren Anreicherung in den Caveolae ermöglicht werden [Carver, Schnitzer, 2003]. Diese Interaktionen werden durch die sogenannte *scaffolding domain* von Caveolin-1 vermittelt. An diese 20 Aminosäuren umfassende Sequenz des Caveolin-1 Proteins können Signalmoleküle und *second messenger* gebunden werden, was zu einer Inaktivierung der gebundenen Moleküle führt und damit die Signalkaskade moduliert beziehungsweise hemmt [Razani et al, 2002].

Die Modulation der Signaltransduktion wird in nachfolgender Abbildung schematisch dargestellt:

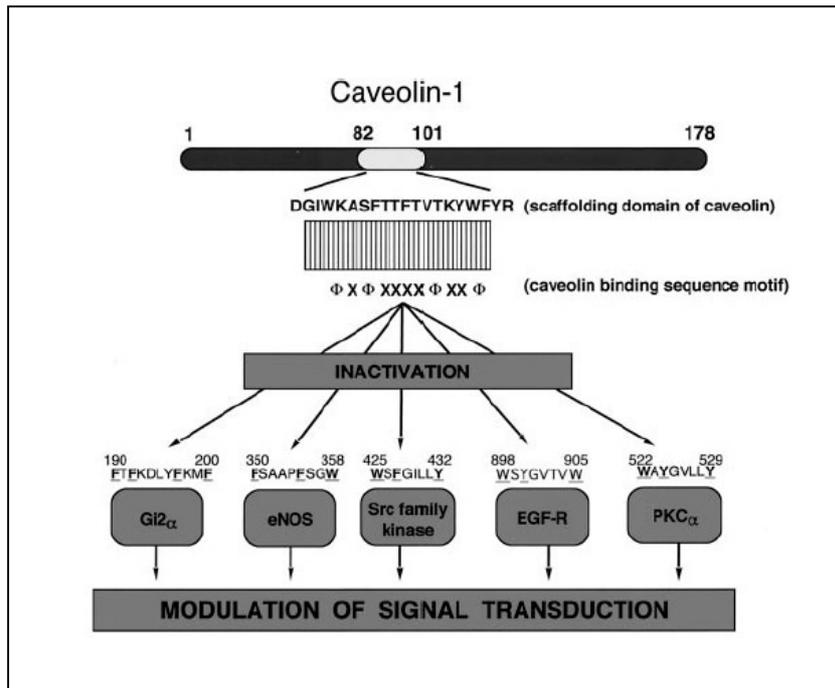


Abb. 2.: Razani et al, 2002, S. 446

Neben der Funktion als Membranprotein kommt Caveolin-1 auch als zyttoplasmatisches, mitochondriales oder gelöstes Protein zum Beispiel in Vesikeln vor [Liu et al, 2002; Mundy et al, 2002]. In fokalen Adhäsionsstellen (engl.: focal adhesions), dies sind distinkte Membranareale, die strukturell eine direkte Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und intrazellulärem Aktin-Zytoskelett herstellen, kommt es zu einer Zusammenballung und Komplexbildung von Caveolin-1, Integrinen und verschiedenen Proteinkinasen. Hierdurch ist Caveolin-1 nicht nur an biochemischen Signalwegen beteiligt und beeinflusst wichtige Zellfunktionen, sondern ist auch für die Vitronektin- und Fibronektinadhäsion der Zelle bedeutend. Die besondere Stellung des Caveolin-1 zu β 1-Integrin konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden [Upla et al, 2004].

Die integrinmodulierte Tyrosinphosphorylierung soll Caveolin-1-abhängig sein, wobei keine feste Bindung der zwei Moleküle bislang nachgewiesen werden konnte. Eine Verbindung beider wird über uPAR oder andere Membranlipide vermutet [Wie et al, 1999].

Eine Reduktion von Caveolin-1 in HeLa Zellen zeigte eine Assoziation mit einer erhöhten Tumorigenität [Suzuki et al, 1998].

Andererseits wurde die Caveolin-1-Expression mit erhöhtem Tumorzellüberleben, aggressiverem Tumorzellwachstum, größerem metastatischem Potential und Unterdrückung der Apoptose in Zusammenhang gebracht [Campbell et al, 2003; Ho et al, 2002]. Desweiteren zeigte sich eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie bei Zellen mit erhöhter Caveolin-1-Expression [Lavie et al, 1998]. Betrachtet man alle soliden, malignen Tumoren des Menschen, so wird Caveolin-1 in der Mehrzahl von ihnen exprimiert.

Die Rolle von Caveolin-1 in der Tumorgenese, Tumorprogression und als Tumormarker mit prognostischer Aussage ist Gegenstand diverser Publikationen und bis heute nicht zufriedenstellend geklärt, was gegenläufige Aussagen verschiedener Studien aufzeigen. Dies ist eventuell damit zu erklären, dass Caveolin-1 als multifunktionales Regulationsprotein im spezifischen Mikromilieu der Zelle oder des Tumors betrachtet werden muss. Hinzu kommt die kaum erfassbare Ganzheit der Signaltransduktion. Die *in vitro* Untersuchungen versuchen diese komplexen Fragestellungen zu klären.

Die Untersuchung zur Rolle von Caveolin-1 und dessen vermutete Interaktionen mit β 1-Integrin, ILK und FAK war unter anderem Gegenstand dieser Arbeit. Die Expression dieser Moleküle wurde entweder einzeln oder in Kombination durch siRNA-Transfektion in unterschiedlichen Tumorzellen reduziert.

2.2. Signaltransduktion von Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK

Vereinfachtes Schema ausgewählter Signaltransduktionswege. Die Rolle von Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und dem Src-Cas-Paxillin-Komplex und Interaktionen sind schematisch in Abbildung 3 (Abb. 3) dargestellt. Die Abkürzungen werden im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

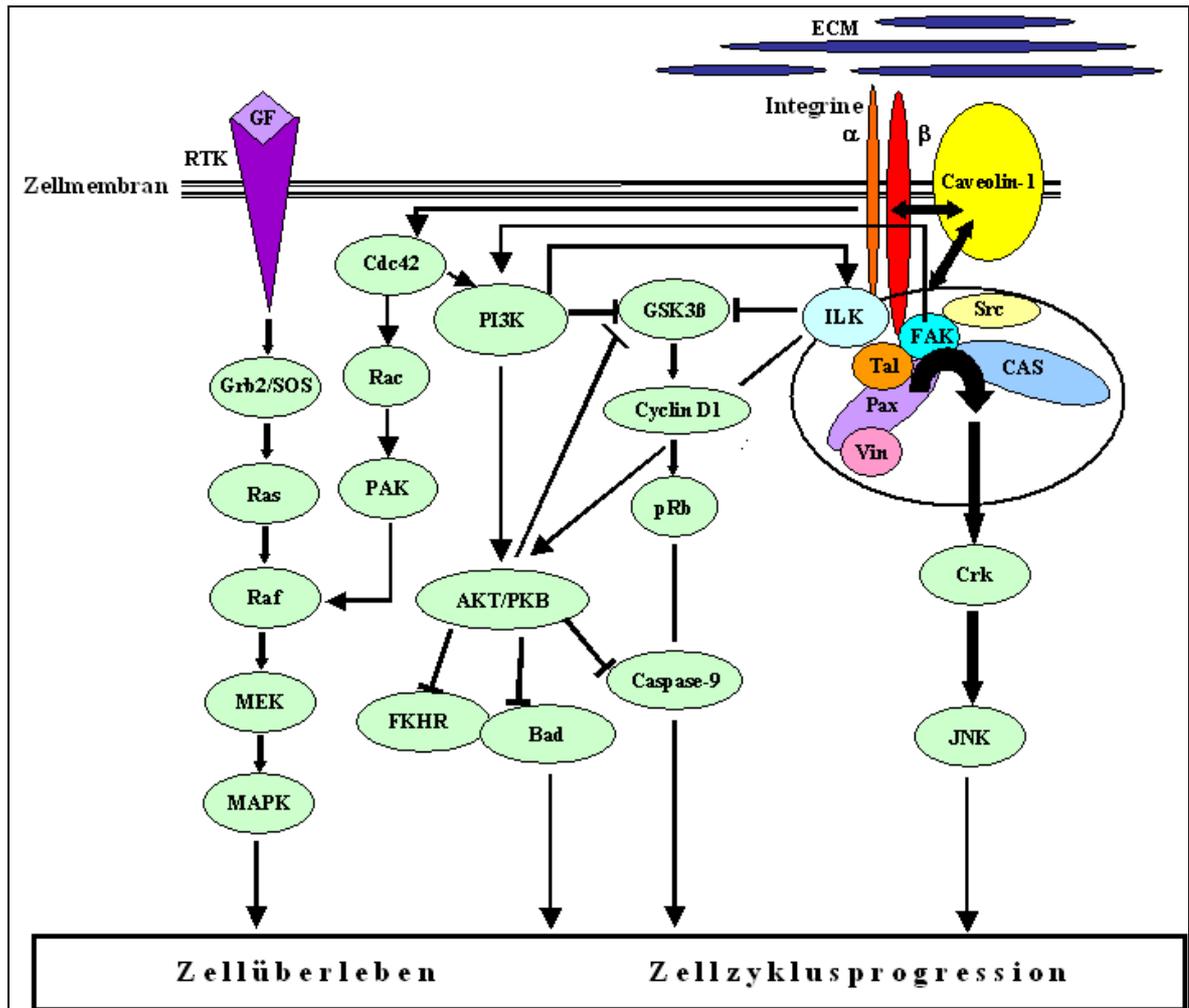


Abb. 3.: Modifiziert nach Cordes, N., Meineke, V., 2004, S. 328

Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Es sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die 24 bisher entdeckte Heterodimere formen. Dabei haben Integrine die Funktion, die Zelle mit der extrazellulären Matrix strukturell und signalübermittelnd zu verbinden und unter anderem Einfluss auf Migration, Zytoskelettorganisation und Zellüberleben zu nehmen [Cordes et al, 2004; Hynes, 1992].

Integrine besitzen keine eigene Kinaseaktivität, sondern sind von verschiedenen Adapterproteinen, zytoplasmatischen Proteinkinasen und der Interaktion mit Wachstumsfaktor-abhängigen RTKs abhängig.

Die Kolokalisation von Integrinen und RTKs in der Zellmembran führt zu einer Optimierung der Signaltransduktion, welche durch die Bindung von Liganden an Integrinrezeptoren oder GFs an RTKs ausgelöst wird.

Caveolin-1 bildet hierbei wahrscheinlich einerseits Komplexe mit Integrinen [Chapman et al, 1999] und RTKs, beziehungsweise nimmt auf diese in noch unbekannter Weise Einfluss, andererseits befinden sich durch die spezifischen Bedingungen in den Caveolae hohe Konzentrationen von *second messenger* und anderen Signaltransduktionsmolekülen in der Nähe der Transmembranproteine. Dies bewerkstelligt optimale Bedingungen für die Signaltransduktion. Wie oben bereits erwähnt, greift Caveolin-1 auch selbst in die Signalregulation ein, indem es verschiedene Partner der Signalkette kovalent mit der *scaffolding domain* bindet und damit das betreffende Protein temporär inaktiviert [Razani, B, 2002].

FAK ist eine Rezeptor-unabhängige Tyrosinkinase, die Paxillin und p130Cas als Substrate rekrutieren kann. Damit sind Paxillin und p130Cas die zwei wesentlichen Signalkonduktoren von FAK, die durch diese an Tyrosin phosphoryliert werden und in Folge davon zum Beispiel regulatorisch an der Ausbildung von Lamellopodien beteiligt sind. Dies wirkt sich dann auf Zellmotilität und Zytoskelettausbildung aus. Darüberhinaus interagiert FAK mit PI3K, Src, Grb7, PLC-gamma 1 und Nck-2 was ebenfalls in der Regulation der Zellmorphologie mündet. Zudem greift FAK auch in das Zellüberleben und das Zellwachstum mit ein. Die Fähigkeit von FAK ERK zu stimulieren, könnte wichtig für das Durchlaufen der G1-Zellzyklusphase der Zelle sein [Steven et al, 2003]. Alle Funktionen von FAK sind sicher noch nicht aufgeklärt. Zumindest ist sie nicht nur eine „fokale Adhäsionskinase“, sondern beeinflusst wichtige Abläufe in der Zelle, betreffend Morphologie, Adhäsion, Überleben und Proliferation.

ILK übermittelt Integrinsignale vor allem über GSK-3 β und AKT. Damit ist sie nicht nur an Adhäsionsprozessen beteiligt, sondern auch über die nachgeschaltete Signalfortleitung in der Zellzyklusprogression und im Zellüberleben involviert.

2.3. Die RNA-Interferenz als wichtiger Regulationsmechanismus in Eukaryonten

Die siRNA-Transfektion macht sich den Effekt der RNA-Interferenz (RNAi) zunutze, ein entwicklungsgeschichtlich sehr altes System zur Regulation der Genexpression, was die Vielzahl von Lebewesen belegt, bei welchen dieser Mechanismus gefunden wird. So trifft man das Phänomen der RNAi zum Beispiel bei einzelligen Pilzen, Pflanzen, Würmern und schließlich auch bei Säugetieren, einschließlich des Menschen [Alberts, 2004, S. 523ff].

Als Auslöser der RNAi dient freie doppelsträngige RNA, deren Ursprung beispielsweise doppelsträngige Virus-RNA, sich selbst vermehrende DNA-Sequenzen, regulatorische RNA-Sequenzen, auch microRNA-Vorläufer genannt, oder eben auch künstlich via Transportvehikel eingebrachte RNA sein kann. Diese doppelsträngige RNA wird von einem sogenannten *Dicer* der RNase III Familie in Stücke geschnitten, die eine Länge von 21-25 Nukleotiden aufweisen, am 3'-Ende um zwei Nukleotide überstehen und ein phosphoryliertes 5'-Ende besitzen. Solche kurzen RNA Stücke werden dann als siRNAs (*small interfering RNAs*) bezeichnet [Lau et al, 2003]. Die Phosphorylierung ist wichtig für die Aufnahme der siRNA in den *RNA-induzierten Silencing Complex* (RISC), in welchem die siRNA ATP-abhängig in zwei Stränge gespalten wird. Das befähigt sie, komplementäre messenger RNA (mRNA) Abschnitte zu finden und sich an diese zu binden [Dykxhoorn et al, 2003]. Ist diese Bindung durch eine hohe Basenpaarungssequenz gekennzeichnet, so wird die entsprechende mRNA zerschnitten. Bei Vorliegen von nur teilweise komplementären Nukleotidbereichen bleibt die mRNA am *RNA-induzierten Silencing Complex* gebunden. In beiden Fällen ist eine Translation in das entsprechende Protein nicht mehr möglich [Lau et al, 2003]. Zudem entstehen bei der Spaltung der betreffenden mRNA weitere doppelsträngige RNA-Bruchstücke, die, durch Enzyme der Zelle repliziert, viele komplementäre mRNAs in ihrer Funktion als siRNAs zerstören können und damit die Amplifikation der RNA-Interferenzaktivität stark erhöhen. Dadurch wird deutlich, dass dieser Prozess kein singuläres Ereignis darstellt, sondern sich so lange selbst unterhält, solange das Substrat in der Zelle gefunden werden kann. Es ist auch möglich, dass Tochterzellen die RNA-Interferenz fortführen, oder dass RNA-Interferenzaktivität durch die Übertragung von RNA-Fragmenten von Zelle zu Zelle weitergegeben wird [Alberts, 2004, S. 523ff].

Eine Übersicht über Auslöser, Ablauf und Folgen des Mechanismus der RNA-Interferenz liefert folgende Skizze:

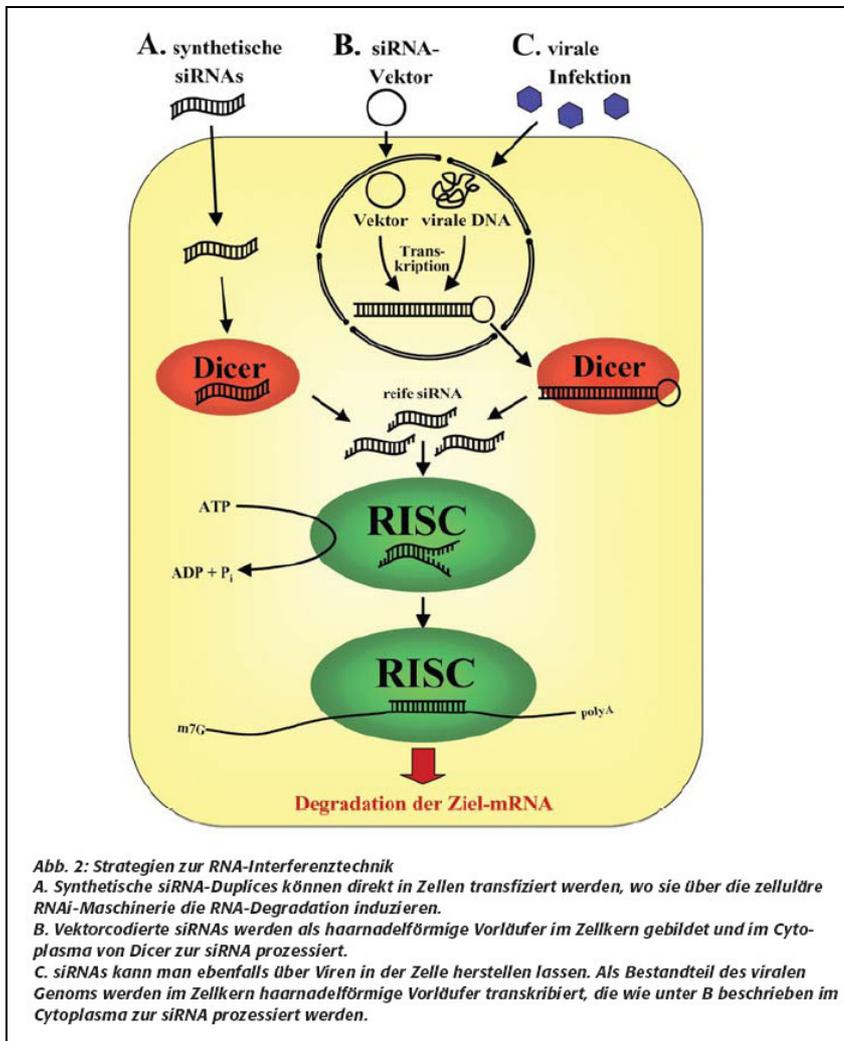


Abb. 5.: Eggert et al, 2003, S. 372

Für die Forschung bietet die RNA-Interferenz gleich mehrere Möglichkeiten. Zum einen ist es über den Einsatz von siRNAs gelungen, die Funktion von noch unbekanntem Gensequenzen herauszufinden, zum anderen können siRNAs gezielt zum Ausschalten bestimmter Gene, beziehungsweise der entsprechenden mRNA, herangezogen werden, um zum Beispiel den Effekt eines bestimmten Proteins unter spezifischen Umweltbedingungen besser analysieren zu können. Zukünftig ist dieses Verfahren der siRNA-Transfektion, das künstliche Einführen von siRNA in die Zelle, auch als Therapiemöglichkeit denkbar. Experimentelle Ansätze in vitro zur Behandlung von Hepatomen mit siRNA-VEGF zur Senkung der Tumormasse [Raskopf et al, 2007] oder auch zur siRNA-basierten Therapie des Pankreaskarzinoms [Ocker et al, 2005] existieren bereits.

Der immensen Bedeutung der RNA-Interferenz vor allem im Hinblick auf das zukünftige Potential der siRNA-Transfektion in der Medizin wurde 2006 Rechnung getragen, indem der Nobelpreis für Medizin den Entdeckern der RNA-Interferenz, Craig Mello und Andrew Fire, verliehen wurde [Fire, 2007; Zamore, 2006; Bernards, 2006].

2.4. Strahlenbiologie

2.4.1. Wechselwirkungen von Strahlung mit biologischen Systemen

Bei der Wechselwirkung von Strahlung mit biologischen Systemen unterscheidet man **Primärprozesse** im Sinne eines direkten physikalischen Effekts mit Energietransfer auf Materie und **Sekundärprozesse**, die im Sinne von chemischen und biochemischen Prozessen zu einer Veränderung der Biomoleküle führen [Reiser et al, S.10/S.25]. Bei den **Primärprozessen** führt diese Energieübertragung beim Zielatom, in Abhängigkeit der Energiemenge, die auf das Atom trifft, entweder zur Anregung oder zur Ionisation [Reiser et al, S.10]. Primärprozesse umfassen alle die Vorgänge, die sich unmittelbar durch Strahleneinwirkung auf atomarer Ebene abspielen. Dazu gehören [Reiser et al, S.11; Lohr et al, S. 307]:

- **Der Compton-Effekt:** Ein Photon trifft auf ein Atom, gibt einen Teil seiner Energie ab und wird gestreut, zusätzlich wird ein Elektron aus einer der Schalen des Atoms gelöst
- **Der Photoeffekt:** Ein Photon wird beim Auftreffen absorbiert, dafür wird ein Elektron aus der Schale des Atoms gelöst
- **Die Paarbildung:** Ein Photon mit einer Energie $>1,022$ MeV wird absorbiert, dabei entsteht im Feld des Atomkerns ein Elektron-Positron-Paar, das emittiert wird
- **Die klassische Streuung:** Ein Photon trifft auf den Atomkern und wird abgelenkt
- **Die Kernreaktion:** Ein Photon mit dafür notwendiger großer Energie wird absorbiert, als Folge können zum Beispiel ein Proton oder ein Neutron emittiert werden

Durch Photoeffekt, Compton-Effekt und Paarbildung entstehen sogenannte **Sekundärelektronen**, die ihrerseits weitere Effekte verursachen können.

Unter **Sekundärprozessen** versteht man die **Radiolyse** des Wassers und weitere biochemische Reaktionen, die zu einer Veränderung der Biomoleküle führt.

Insgesamt muss zwischen **direkter** und **indirekter Strahlenwirkung** unterschieden werden. Direkte Strahlenwirkung bedeutet unmittelbaren Schaden am Zielatom, während indirekte Strahlenwirkung zum Beispiel über Ausbildung von Wasserstoffradikalen abläuft, die sekundär biologische Moleküle schädigen [Reiser et al, S.26; Wannemacher et al, S.24].

Man unterscheidet verschiedene Phasen der Wirkung ionisierender Strahlung auf ein biologisches System [Reiser et al, S.28]:

1. **physikalische Phase:** Direkte Wechselwirkung von Strahlung mit Materie
2. **chemische Phase:** Angeregte oder ionisierte Moleküle reagieren mit weiteren Molekülen, es entstehen freie Radikale
3. **biochemische Phase:** Enzymatische Prozesse, Reparaturvorgänge
4. **biologische Phase:** Nicht reparierte Veränderungen führen zu Störungen des Zellstoffwechsels und zu Mutationen

Bei der biologischen Phase sind es vor allem die DNA-Schäden, die eine entscheidende Rolle spielen. Es kann zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, zu DNA-Quervernetzung oder zum Basenschaden kommen. Eine Dosis von 1-2 Gy bewirkt in einer oxygenierten Zelle circa 1.000 Basenschäden und Einzelstrangbrüche, zudem circa 40 Doppelstrangbrüche [Reiser et al, S.32]. Daran wird deutlich wie immens wichtig ein funktionierendes Reparatursystem der Zelle ist.

Zelluläre **Reparaturmechanismen** als Reaktion auf Strahlenschäden sind vielseitig. Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden enzymatisch durch Exzision des geschädigten Abschnittes behoben. Bei Doppelstrangbrüchen kommt es vor allem durch Rekombination und End-zu-End-Verbindungen zu einer Defektreparatur. Bei irreparablen Schäden stellt die Apoptose, programmierter Zelltod, eine Möglichkeit der Fehlereliminierung dar. Bei fehlerhafter oder nicht erfolgter Reparatur kann es im Verlauf zu **somatischen Mutationen** oder **Keimzellmutationen** kommen, die im Sinne von **Chromosomen-, Punkt- oder Genommutationen** zu Störungen des Stoffwechsels oder Entartung und Tod führen können.

2.4.2. Die zelluläre Strahlenantwort

DNA-Schäden sind, im Vergleich mit der Schädigung anderer Zellkomponenten, am häufigsten Ursache einer Zellinaktivierung nach Einwirkung ionisierender Strahlung. Die Zelle kann mit unterschiedlichen Reparaturmechanismen nahezu 100 % der verursachten DNA-Schäden binnen 12 Stunden reparieren. So werden zum Beispiel Doppelstrangbrüche zu etwa 96 % korrekt, zu 1 % nicht und zu etwa 3 % inkorrekt repariert. Bei inkorrekt reparierten Doppelstrangbrüchen resultieren Chromosomenaberrationen, zum Beispiel dizentrische Chromosomen, die unter anderem zum Beweis stattgefundener Einwirkung ionisierender Strahlung nachgewiesen werden können. Bei der falschen Aneinanderlagerung von zwei Chromosomen nach Doppelstrangbruch können auch kleine Reste ohne Zentromer, sogenannte azentrische Fragmente übrig bleiben, die in Form eines Mikrokerns in der Zelle verbleiben. Da sie nicht mehr während der Mitose dupliziert werden können und nur an eine Tochterzelle weitergegeben werden, allerdings ohne, dass diese die Erbinformation nutzen kann, sind die DNA-Fragmente im Mikrokern als Information für die Zelle verloren. Die Zelle teilt sich noch wenige Male bis sich der Verlust der fehlenden DNA bemerkbar macht und ein weiteres Fortbestehen der Zelle, oder weitere Mitosen nicht mehr möglich sind, die Zelle stirbt einen sogenannten mitogenen oder klonogenen Zelltod. Diese Form des Zelltodes ist die dominierende Form des Absterbens von Zellen nach Bestrahlung und macht bei soliden Tumoren etwa 79 % der Zellinaktivierung aus [Dahm-Daphi et al, 2007]. Um dem mitogenen Zelltod beim Nachweis von Zellüberleben nach Bestrahlung gerecht zu werden, verwendet man die Methode des Koloniebildungstests, der erst nach mehreren Mitosen ausgewertet wird, und damit die zeitliche Latenz zwischen DNA-Schaden und Zellsterben berücksichtigt. Die Apoptose, programmierter Zelltod, der durch p53 aktiviert wird und zu einer Kondensation und anschließender Fragmentation der Zelle führt, spielt in soliden Tumorzellen im Gegensatz zu zum Beispiel Lymphozyten eine untergeordnete Rolle. Neben der Apoptose existiert eine weitere seltenere Form der Zellinaktivierung, bei der die Zelle über das Schlüsselprotein p53 in einen permanenten G1-Arrest eintritt [Dahm-Daphi et al, 2007].

Nach Bestrahlung ändert sich nachgewiesenermaßen auch die Signaltransduktion einer Zelle. Zum Beispiel zeigen viele Tumorzellen eine erhöhte Expression von EGFR an der Zelloberfläche, wenn sie bestrahlt wurden [Milas et al, 2003].

Aber auch Akt ist zum Beispiel strahleninduzierbar und wird nach Einwirken ionisierender Strahlung vermehrt exprimiert. Akt als ein sehr wichtiges zentrales antiapoptotisches

Protein erfordert zur Aktivierung die Phosphorylierung durch den *second messenger* Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase. Der PI3K-Akt-Signalweg kann auf unterschiedlichen Wegen stimuliert werden, so zum Beispiel durch das RAS-Onkogenprodukt, Integrine, Wachstumsfaktoren und -rezeptoren [Wannenmacher et al, S.33/34].

Insgesamt zeigt sich ein sehr komplexes Bild der Signaltransduktion nach Bestrahlung. Wichtige Schlüsselmechanismen in Bezug auf DNA-Schadenerkennung mit folgendem Zellzyklusarrest und Apoptose werden unter anderem durch p53 und ATM gesteuert [Schmidt-Ullrich et al, 2000]. Weiterhin ist das Mikromilieu der Zelle und der Signaltransduktionsproteine von entscheidender Bedeutung. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Kontakt der Zellen zur extrazellulären Matrix ein entscheidender Faktor für die Strahlenresistenz der Zelle *in vitro* darstellt, da Integrine und Zelladhäsionsmoleküle über den Kontakt zur extrazellulären Matrix das zelluläre Überleben modulieren können [Cordes et al, 2003; Lisiak et al, 2004]. Dabei zeigte sich ein besseres Überleben der bestrahlten Tumorzellen, unter anderem PA-TU 8902 und SKMES-1, *in vitro* auf Fibronectin im Gegensatz zu Bedingungen auf Polystyren. Weiterhin konnte eine strahleninduzierte dosisabhängige Hochregulation der β 1-Integrinuntereinheit gezeigt werden. Der Kontakt zur ECM über vor allem β 1-Integrin begünstigt das Überleben der Zelle durch Kontrolle der Apoptose über Akt-Phosphorylierung und über Zellzyklusregulation durch Inhibierung der Cyclin D1 Proteolyse, beides antiapoptotische Signalkaskaden [Cordes et al, 2003]. Eine bestrahlungsinduzierte Zunahme der β 1-Integrin-Dichte an der Zelloberfläche führt wahrscheinlich auch zu einer Konzentrationszunahme der durch β 1-Integrin rekrutierten *downstream* Signalmoleküle und könnte somit ein Zellmilieu schaffen, das den Zelltod nach Bestrahlung verhindert. Diese *downstream* Signalmoleküle, oder Bestandteile eines β 1-Integrin-Signalkomplexes sind unter anderem ILK, FAK und vermutlich auch Caveolin-1 [Lisiak et al, 2004].

Kernpunkt dieser Arbeit ist der gezielte Knockdown von β 1-Integrin, ILK, FAK und Caveolin-1 und anschließende Untersuchung des Zellüberlebens, Proliferation und Signaltransduktion nach Bestrahlung, um weitere wichtige Informationen bezüglich der Komplexität der zellulären Strahlenantwort zu erlangen.

III. Material

3.1. Zelllinien

Bei den in allen Experimenten verwendeten Zelllinien handelt es sich ausschließlich um etablierte adhärenzwachsende humane Tumorzellen, die über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen wurden. Das Wachstum der verschiedenen Zelllinien ist überwiegend als epithelial und in Monolayern zu charakterisieren.

Die humane Karzinomzelllinie *PA-TU 8902* entstammt einem primär duktalem Pankreasadenokarzinom, Grad II, eines 44 Jahre alten Patienten. Metastasenbildende Aktivität wurde in Nacktmäusen beschrieben. Die Verdoppelungsrate beträgt im Schnitt 25-40 Stunden.

Die Zelllinie *CCL-221* entstammt einem kolorektalen Adenokarzinom. Eine Tumorinduktion kann in Nacktmäusen nachgewiesen werden. Die Verdoppelungszeit der CCL-221-Zellen beträgt etwa 30-40 Stunden.

MDA-MB-231-Zellen sind Mammaadenokarzinomzellen, die in Nacktmäusen tumorinduzierend sind und mäßig differenzierte Adenokarzinome Grad III ausbilden. Der Ursprung der Zellen ist ein Karzinom einer 51 Jahre alten Kaukasierin. Ihre Verdoppelungszeit misst ungefähr 35 Stunden.

SiHa-Zellen (HTB35) gehen zurück auf eine 55-jährige orientalische Patientin und wurden aus einem Plattenepithelkarzinom der Zervix isoliert. In Nacktmäusen bilden die SiHa-Zellen mäßig differenzierte Grad III Epidermoidkarzinome. Die Verdoppelungszeit kann mit etwa 30-40 Stunden angesetzt werden.

Die Zelllinie *FaDu* (HTB43) wurde 1968 durch eine Biopsie eines hypopharyngealen Pharynxkarzinoms eines 56 Jahre alten kaukasischen Patienten gewonnen. Sie weist ein tumorigenes Potential in Nacktmäusen auf, was sich in der Ausbildung von gut differenzierten Epidermoidkarzinomen Grad I zeigt, und benötigt zur Zellverdoppelung ca. 35 Stunden.

Die humane Lungenkarzinomzelllinie *SKMES-1*, etabliert 1970, stammend aus einem 65-jährigen Kaukasier mit Plattenepithelkarzinom, benötigt im Schnitt 35 Stunden zur Zellzahlverdoppelung in der Zellkultur. Eine tumorigene Aktivität ist nicht nachgewiesen.

Die Zelllinie *U-138 MG*, etabliert aus einem Glioblastom eines 47 Jahre alten kaukasischen Mannes, weist eine durchschnittliche Verdoppelungszeit von 70 Stunden auf.

3.2. Medium

Die Zelllinien PA-TU 8902, MDA-MB-231, U-138 MG und SKMES-1 wurden in *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM)¹ kultiviert. Dieses enthält als Zusätze Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin), Sodumpyruvat, Pyridoxin und 4.500 mg/l Glukose. Die Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FKS)² und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren³ komplettierte die Lösung für den Gebrauch. Das Kälberserum wurde vor dem Einsatz einmalig bei 56 °C, 40 min. lang hitzeinaktiviert. Die Lagerung aller Komponenten und des Gebrauchsmediums erfolgte bei 4 °C.

Die Zelllinien FaDu und SiHa wurden in *Minimal essential medium* (MEM)⁴ kultiviert, dass wie oben beschrieben ebenfalls mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren ergänzt wurde.

Die CCL-221-Zellen wurden in RPMI⁵-Medium, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, kultiviert.

3.3. Reagenzien

Einfriermedium:

Das Einfriermedium für die Zellen setzt sich wie folgt zusammen:

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) für die Zelllinien MDA-MB-231, PA-TU 8902, U-138 MG und SKMES-1, MEM für die Zelllinien FaDu und SiHa, RPMI für die Zelllinie CCL-221, jeweils versetzt mit:

- | | |
|---------------------------------------|------|
| - Fetales Kälberserum (FKS) | 20 % |
| - Nicht-essentielle Aminosäuren (NAA) | 1 % |
| - DMSO | 5 % |

Lagerung von DMSO bei Raumtemperatur

Trypsin:

Trypsin-EDTA (1X)

Langzeitlagerung bei -20 °C, nach dem Auftauen bei 4 °C

¹ Firma GIBCO, Eggenstein

² Firma GIBCO, Eggenstein

³ Firma GIBCO, Eggenstein

⁴ Firma GIBCO, Eggenstein

⁵ Firma GIBCO, Eggenstein

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS):

Stammlösung (10XPBS):

- NaCl ⁶	80 g
- KCl ⁷	2 g
- Na ₂ HPO ₄ ⁸	11,5 g
- KH ₂ PO ₄ ⁹	2 g

ad 1.000 ml Aqua dest.

Lagerung bei Raumtemperatur

Gebrauchslösung (1XPBS):

Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

pH 7,4

Lagerung bei 4 °C

Coomassie-Blau-Färbelösung:

1.000 ml gebrauchsfertige Färbelösung setzen sich wie folgt zusammen:

- Methanol (100 %)	200 ml
- Eisessig (100 %)	75 ml
- Aqua dest.	725 ml
- Coomassie G250 ¹⁰	0,5 g

Lagerung bei Raumtemperatur

Modifizierter RIPA-Lysepuffer:

Stammlösung:

- Tris-HCl (1 M, pH 7,4)	2,5 ml
- NP-40 ¹¹	500 µl
- Sodium deoxycholate (10 %)	125 µl
- NaCl (1 M) ¹²	7,5 ml
- EDTA (10 mM)	5 ml

ad 50 ml Aqua dest.

Lagerung der Stammlösung bei 4 °C

⁶ Firma Merck, Darmstadt⁷ Firma Merck, Darmstadt⁸ Firma Merck, Darmstadt⁹ Firma Merck, Darmstadt¹⁰ Firma Merck, Darmstadt¹¹ Firma Merck, Darmstadt¹² Firma Merck, Darmstadt

Gebrauchslösung:

- Complete¹³ (1 Tablette/2 ml Aqua dest.) 40 µl
- Natrium-Orthovanadat (Na₃VO₄) (200 mM) 1 µl
- Natriumfluorid (NaF) (500 mM) 2 µl

ad 1.000 µl Stammlösung

Das Natrium-Orthovanadat muss vor Verwendung aktiviert werden. Dazu wird die 200 mM Lösung auf pH 10 titriert, wobei die Lösung dann gelb erscheint. Durch Kochen des Na₃VO₄ wird die Lösung farblos. Das Prozedere wird so lange wiederholt bis das Reagenz bei Raumtemperatur stabil bei pH 10 und farblos bleibt.

Die Lagerung der drei Komponenten (gelöste Complete-Tablette, Na₃VO₄, NaF) erfolgt bei -20 °C, lichtgeschützt.

Die Gebrauchslösung wurde immer frisch in entsprechenden Mengen angesetzt und auf Eis zwischengelagert.

Trenngelpuffer:

- Tris-Base¹⁴ 18,17 g

ad 100 ml Aqua dest.

Einstellung des pH-Wertes mittels HCl auf pH 8,8

Lagerung bei Raumtemperatur

Sammelgelpuffer:

- Tris-Base 6,06 g

ad 100 ml Aqua dest.

Einstellung des pH-Wertes mittels HCl auf pH 6,8

Lagerung bei Raumtemperatur

Laufpuffer:

Stammlösung (5XLaufpuffer):

- Glycin 72,05 g
- Tris-Base 15,15 g
- SDS (Sodiumdodecylsulfat) 5,0 g

ad 1.000 ml Aqua dest.

pH 8,6

¹³ Firma Roche, Mannheim

¹⁴ Firma Sigma, Taufkirchen

Gebrauchslösung (1XLaufpuffer):

Stammlösung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt

Lagerung beider Lösungen bei 4 °C

Anodenpuffer:

- Borsäure¹⁵ 3,1 g
- SDS (10 %ige Lösung) 4 ml
- Methanol (100 %)¹⁶ 200 ml

ad 1.000 ml Aqua dest.

pH-Einstellung mittels NaOH auf pH 9,0

Lagerung bei 4 °C

Kathodenpuffer:

- Borsäure 3,1 g
- SDS (10 %ige Lösung) 4 ml
- Methanol (100 %) 50 ml

ad 1.000 ml Aqua dest.

pH-Einstellung mittels NaOH auf pH 9,0

Lagerung bei 4 °C

4XProbenpuffer:

- Glycerol 2 ml
- SDS (10 %ige Lösung) 2 ml
- Sammelgelpuffer 2,5 ml
- β -Mercaptoethanol¹⁷ 0,5 ml
- Bromphenolblau¹⁸ 1 mg

ad 10 ml Aqua dest.

Lagerung bei 4 °C

¹⁵ Firma Merck, Darmstadt

¹⁶ Firma Merck, Darmstadt

¹⁷ Firma Merck, Darmstadt

¹⁸ Firma Serva, Heidelberg

Mowiol-Eindeckmedium:

- Mowiol 4-88¹⁹ 2,4 g
- Glycerol²⁰ 6 g
- Aqua dest. 6 ml

Inkubation mehrere Stunden bei Raumtemperatur

- Tris-Base (0,2 M; pH 8,5) 12 ml

Erhitzen der Lösung 10 min. bei 50 °C

anschließend Zentrifugation bei 5.000 rpm, 15 min.

- 1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO)²¹ 0,45 g

komplettieren den Überstand zum fertigen Eindeckelmedium

Lagerung bei -20 °C

Blocking-Reagenz:

- Magermilchpulver²² 5 g

ad 100 ml 1XPBS

Lagerung nur kurzfristig bei 4 °C

Waschpuffer (PBST):

- Tween 20²³ 1 ml

ad 1.000 ml 1XPBS

Lagerung bei 4 °C

ECL-Detektionsreagenz²⁴:

- Lösung 1

- Lösung 2

ergeben zu gleichen Teilen das fertige Detektionsreagenz, welches bei Raumtemperatur eine Stunde stabil ist.

125 ml sind ausreichend für 1.000 cm² Membranoberfläche

Lagerung beider Komponenten bei 4 °C

¹⁹ Firma Merck, Darmstadt

²⁰ Firma Merck, Darmstadt

²¹ Firma Merck, Darmstadt

²² Firma Merck, Darmstadt

²³ Firma Merck, Darmstadt

²⁴ Firma Amersham Biosciences, Freiburg

Entwickler²⁵/Fixierer²⁶:

Beide Reagenzien werden 5:1 mit Aqua dest. zur gebrauchsfertigen Lösung verdünnt.

Lagerung bei Raumtemperatur, lichtgeschützt

Trenngel:

Acrylamid [%]	10	15
- Trenngelpuffer	2,4 ml	2,4 ml
- SDS ²⁷ (10 % in Aqua dest.)	100 µl	100 µl
- Aqua dest.	4,2 ml	2,5 ml
- Acrylamid ²⁸	3,3 ml	5 ml
- APS ²⁹ (10 %)	100 µl	100 µl
- TEMED ³⁰	10 µl	10 µl

Sammelgel:

Acrylamid [%]	4,5
- Sammelgelpuffer	0,9 ml
- SDS (10 % in Aqua dest.)	37,5 µl
- Aqua dest.	2,25 ml
- Acrylamid	562,5 µl
- APS (10 %)	100 µl
- TEMED	5 µl

Mengenangaben beziehen sich beim Trenn- und Sammelgel jeweils auf das Anfertigen von zwei Gelen mit den Endmaßen von etwa 10 x 10,5 cm im Hoefer SE 245 Dual Gel Caster³¹.

Glycine Stripping Buffer:

- Glycin ³²	15 g
- SDS	1 g
- Tween 20	10 ml

²⁵ Firma Merck, Darmstadt

²⁶ Firma Merck, Darmstadt

²⁷ Firma Merck, Darmstadt

²⁸ Firma Sigma, Taufkirchen

²⁹ Firma Pharmacia Biotech, Freiburg

³⁰ Firma Merck, Darmstadt

³¹ Firma Amersham Biosciences, Freiburg

³² Firma Sigma, Taufkirchen

ad 1.000 ml Aqua dest.

pH- Einstellung auf pH 2,2 mittels konz. HCl

Lagerung bei 4 °C

Zellfixierungsreagenz:

Zusammensetzung von 10 ml Fixierungsreagenz:

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| - Triton X ³³ (10 %ig) | 100µl |
| - Paraformaldehyd (PFA) (4 %ig) | 9.900 µl |

Reagenzien zur Durchflußzytometrie:

- HCl rauchend 37 %³⁴
- Ribonuclease A Type III-A, 101 Kunitz units/mg³⁵
- 5-Bromo-2-desoxyuridine (BrdU-Reagenz)³⁶
- Pepsin 0,7 FIP-U/mg³⁷
- Propidiumiodid 95-98 %³⁸

Proteinmarker für die Elektrophorese:

Für alle SDS-Gelelektrophoresen wurde der *Bench Mark Protein Ladder*³⁹ Proteinmarker verwendet, der eine Bandbreite von 15 spezifischen Proteinen mit Kilodaltonzahlen zwischen 10 kDa und 220 kDa umfasst, wovon jedes Protein in einer Konzentration von etwa 0,1 µg/µl vorliegt und unter Verwendung von *Coomassie Brilliant Blue R-250* sichtbar gemacht wird. Der Marker liefert klare Proteinbanden in Gelen mit 4-20 % Acrylamid. Lagerung bei -20 °C.

Proteinfärbelösung:

Zur Färbung der durch Elektrophorese aufgetrennten Proteinbanden auf den Nitrozellulosemembranen diente die Ponceau S Lösung⁴⁰. Lagerung bei Raumtemperatur.

³³ Firma Merck, Darmstadt

³⁴ Firma Merck, Darmstadt

³⁵ Firma Sigma, Taufkirchen

³⁶ Firma Serva, Heidelberg

³⁷ Firma Merck, Darmstadt

³⁸ Firma Sigma, Taufkirchen

³⁹ Firma Invitrogen, Karlsruhe

⁴⁰ Firma Serva, Heidelberg

Fibronectin⁴¹:

Das für alle Versuche verwendete Fibronectin liegt als Lyophilisat vor und enthält zusätzlich 1,126 mg Glycin und 0,058 mg Natriumchlorid pro mg Reinsubstanz. Das Pulver wurde unter sterilen Bedingungen in steril filtriertem, destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und aliquotiert. Die gelöste Form des Fibronectins ist empfindlich gegenüber starken mechanischen Manipulationen, welche ebenso vermieden wurden wie das wiederholte Auftauen und Einfrieren. Lagerung des Lyophilisats bei 4 °C, Lagerung der Aliquote bei -20 °C.

Kollagen⁴²:

Das Kollagen vom Typ I, welches in den Versuchen zur Beschichtung von Zellkulturplastik verwendet wurde, wurde unter sterilen Bedingungen in destilliertem Wasser gelöst und als Aliquote mit einer Konzentration von 1mg Kollagen pro ml Wasser bei -20 °C gelagert.

Laminin⁴³:

Das ebenfalls als Lyophilisat vorliegende Laminin wurde in destilliertem Wasser steril auf eine Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Aliquote lagerten bei -20 °C.

3.4. Transfektionsreagenzien**Transfektionsmedium:**

Die Transfektion fand in Optimem⁴⁴ Medium ohne weitere Zusätze statt.

Sense und Antisense:

Sense- und *Antisense*-Stränge lagen als Lyophilisat vor und mussten mit 1XPuffer (1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnter 5XPuffer⁴⁵) in Suspension überführt werden. Die Endkonzentration betrug 50 µM. Lagerung der Aliquote bei -20 °C.

⁴¹ Firma Roche, Penzberg

⁴² Firma Roche, Penzberg

⁴³ Firma Roche, Penzberg

⁴⁴ Firma GIBCO, Eggenstein

⁴⁵ Firma Dharmacon RNA Technologies, Bonn

Unspezifische Kontrollduplex:

Die *Non-specific Control-Duplex CoXII*⁴⁶, eine unspezifische siRNA-Kontrollduplex, wurde ebenfalls in RNase-freiem Wasser bis zu einer Konzentration von 20 µM gelöst. Lagerung der Aliquote bei -20 °C.

Die siRNA-Duplex:

Die für die Transfektionen verwendete spezifische siRNA-Duplex wurde erst durch den Vorgang des *Annealings* mit einer Endkonzentration von 20 nM hergestellt.

Für das *Annealing* waren folgende Komponenten notwendig:

- Sense	2 Teile
- Antisense	2 Teile
- 5XPuffer	1 Teil

Die *Antisense* Sequenz der siRNA Caveolin-1₂⁴⁷ beträgt:

UUC UGG UUC UGC AAU CAC A dTdT

Die *Antisense* Sequenz der siRNA β1-Integrin₂⁴⁸ beträgt:

CAA AUU UCC AGA UAU GCG C dTdT

Die *Antisense* Sequenz der siRNA ILK₂⁴⁹ beträgt:

AAG GUU CGA GAC UGG AGU ACA dTdT

Die *Antisense* Sequenz der siRNA FAK₂⁵⁰ beträgt:

AAC CUC GCA GUC AUU UAU CAU dTdT

Die *Antisense* Sequenz der siRNA *Non-specific Control CoXII* beträgt:

GUA UAU AAG CAA GCA UUA CUU dTdT

Die Lagerung von *Sense* und *Antisense* erfolgte bei -20 °C, der 5XPuffer wurde bei 4 °C gelagert.

Das Transfektionsäquivalent:

Die Konzentrationen beziehen sich auf die Transfektion in Plastikzellkulturschalen mit einem Durchmesser von 8,5 cm, einer Fläche von etwa 56,75 cm² und einem festgelegten Endvolumen in der Schale von 11,8 ml.

⁴⁶ Firma Dharmacon RNA Technologies, Bonn

⁴⁷ Firma Dharmacon RNA Technologies, Bonn

⁴⁸ Firma Dharmacon RNA Technologies, Bonn

⁴⁹ Firma Dharmacon RNA Technologies, Bonn

⁵⁰ Firma Dharmacon RNA Technologies, Bonn

Lösung A:

- siRNA-Duplex (20 μ M) 5,9 μ l
- Optimem 1.085,4 μ l

Lösung B:

- Oligofectamin⁵¹ 23,6 μ l
- Optimem 64,9 μ l

Das Transfektionsäquivalent ergibt sich aus der Zusammenfügung von Lösung A und Lösung B.

Lagerung des Oligofectamins bei 4 °C, stabil für 12 Monate; das Reagenz wurde gegen mechanische Irritationen geschützt.

⁵¹ Firma Invitrogen, Karlsruhe

3.5. Verwendete Antikörper

3.5.1. Antikörper für den Westernblot

Antikörper:	Ursprung:	MG [kDa]:	Verdünnung in:	Lagerung:
Primärantikörper:				
AKT ⁵²	Schaf	60	MiPu ⁵³ /1:500	-20 °C
AKT-Serin 473 ⁵⁴	Hase	60	MiPu/1:500	-20 °C
AKT-Threonin 308 ⁵⁵	Hase	60	TPBS ⁵⁶ /1:500	-20 °C
FAK ⁵⁷	Maus	125	MiPu/1:4.000	-20 °C
FAK 925 ⁵⁸	Ziege	125	MiPu/1:200	4 °C
FAK 397 ⁵⁹	Hase	125	MiPu/1:1.000	-20 °C
MAPK ⁶⁰	Hase	42, 44	MiPu/1:500	-20 °C
MAPK-P ⁶¹	Hase	42, 44	MiPu/1:500	-20 °C
Paxillin ⁶²	Maus	68	MiPu/1:500	4 °C
Paxillin 118 ⁶³	Hase	68	TPBS/1:1.000	-20 °C
Cas ⁶⁴	Maus	130	MiPu/1:1.000	-20 °C
Src ⁶⁵	Maus	60	MiPu/1:1.000	-20 °C
Src 416 ⁶⁶	Hase	60	TPBS/1:1.000	-20 °C
GSK 3 β ⁶⁷	Maus	46	MiPu/1:500	-20 °C
GSK 3 β -Serin 9 ⁶⁸	Hase	46, 51	MiPu/1:500	-20 °C
JNK ⁶⁹	Maus	46, 54	MiPu/1:500	4 °C

⁵² Firma Upstate, Vertrieb durch Firma Biomol, Hamburg

⁵³ MiPu: Abkürzung für eine Lösung von 5%Milchpulver in 1XPBS

⁵⁴ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁵⁵ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁵⁶ TPBS: Abkürzung für TweenPBS

⁵⁷ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁵⁸ Firma Santa Cruz Technology, Heidelberg

⁵⁹ Firma Upstate, Vertrieb durch Firma Biomol, Hamburg

⁶⁰ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁶¹ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁶² Firma Sigma, Taufkirchen

⁶³ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁶⁴ Firma Upstate, Vertrieb durch Firma Biomol, Hamburg

⁶⁵ Firma Upstate, Vertrieb durch Firma Biomol, Hamburg

⁶⁶ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁶⁷ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁶⁸ Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main

⁶⁹ Firma Sigma, Taufkirchen

JNK-P ⁷⁰	Ziege	46, 54	TPBS/1:500	4 °C
β1-Integrin ⁷¹	Maus	110-130	MiPu/1:1.500	-20 °C
ILK ⁷²	Maus	59	MiPu/1:1.500	-20 °C
Cav-1 ⁷³	Hase	24	MiPu/1:1.000	4 °C
β-Aktin ⁷⁴	Maus	50	MiPu/1:5.000	-20 °C

Sekundärantikörper:

Anti-mouse-IgG ⁷⁵	Ziege		MiPu/1:2.000	4 °C
Anti-rabbit-IgG ⁷⁶	Ziege		MiPu/1:2.000	4 °C
Anti-sheep-IgG ⁷⁷	Hase		MiPu/1:2.000	4 °C
Anti-goat-IgG ⁷⁸	Hase		MiPu/1:2.000	4 °C

Alle Sekundärantikörper sind *Horseradish*-Peroxidase gekoppelt.

3.5.2. Antikörper für die Durchflußzytometrie

- Anti-α-Bromodeoxyuridin (BrdU)-Antikörper⁷⁹
- Rabbit-anti-Mouse-α-BrdU-Antikörper, FITC-konjugiert⁸⁰

⁷⁰ Firma Santa Cruz Technology, Heidelberg

⁷¹ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁷² Firma Upstate, Vertrieb durch Firma Biomol, Hamburg

⁷³ Firma Santa Cruz Technology, Heidelberg

⁷⁴ Firma Sigma, Taufkirchen

⁷⁵ Firma Santa Cruz Technology, Heidelberg

⁷⁶ Firma Santa Cruz Technology, Heidelberg

⁷⁷ Firma Pierce, Rockford (Illinois, USA)

⁷⁸ Firma Santa Cruz Technology, Heidelberg

⁷⁹ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁸⁰ Firma Dako, Hamburg

3.6. Geräte und Hilfsmittel

3.6.1. Geräte

- Tischkühlzentrifugen Sigma 3K-2 und Sigma-202 MK⁸¹
- Blotter Multiphor II⁸²
- Kleinschüttler Bühler, Typ KL-2, 220V, 50Hz⁸³
- Kippschüttler Heidolph No. 54131, Type REAX3, 220V, 50W, 50Hz⁸⁴
- ELISA-Reader, Spectramax 190⁸⁵
- PCR-Heater⁸⁶
- Beheizbares Wasserbad⁸⁷
- Vortexer⁸⁸
- Mikroskop (Zellkultur)⁸⁹
- Mikroskop (KB auszählen)⁹⁰
- Mikroskop (Immunfluoreszenz)⁹¹
- Sterilbank⁹²
- Begasungsbrutschrank⁹³
- pH-Meter⁹⁴
- Zellzählgerät Beckman Coulter Z Series⁹⁵
- Röntgenröhre⁹⁶
- Dosimeter⁹⁷
- Ultraschall-Desintegrator Branson Sonifier W-250⁹⁸
- Durchflußzytometer, FACSCaliburTM 99

⁸¹ Firma Sigma, Taufkirchen

⁸² Firma Pharmacia Biotech, Freiburg

⁸³ Firma Edmund Bühler, Tübingen

⁸⁴ Firma Heidolph, Deutschland

⁸⁵ Firma Molecular Devices Corporation, Sunnyvale (California, USA)

⁸⁶ Firma Sigma, Taufkirchen

⁸⁷ Firma Edmund Bühler, Tübingen

⁸⁸ Firma Heidolph, Deutschland

⁸⁹ Firma Leica, Wetzlar

⁹⁰ Firma Leica, Wetzlar

⁹¹ Firma Leica, Wetzlar

⁹² Steril Guard III, Vertrieb über SMLT-Marktplatz für Laboreinrichtungen und Technik, Mannheim

⁹³ Firma Heraeus Instruments, Hanau

⁹⁴ Firma Schott Instruments, Mainz

⁹⁵ Firma Beckman Coulter GmbH - Diagnostics, Krefeld

⁹⁶ Firma Seifert, Ahrensberg

⁹⁷ Firma PTW, Freiburg

⁹⁸ Firma G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

⁹⁹ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

- Power Supply EPS 3500¹⁰⁰

3.6.2. Hilfsmittel für Versuche und Zellkultur

- Zell- und Gewebekulturschalen, Durchmesser 85 mm, 35 mm¹⁰¹
- Zellkulturflaschen, 25 cm², 75 cm², 175 cm²¹⁰²
- 96-Well-Platten¹⁰³
- 6-Well-Platten¹⁰⁴
- Falcontubes 15 ml, 50 ml¹⁰⁵
- Sterile Einwegpipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml¹⁰⁶
- Eppendorfcups, 1,5 ml¹⁰⁷
- PCR-Tubes, 0,5 ml¹⁰⁸
- Kryoröhrchen¹⁰⁹
- Einmalspritzen, steril, 1 ml¹¹⁰
- Isotone Lösung (Isoton III)¹¹¹

3.6.3. Materialien für SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

- Whatman Chromatography Paper, 270 mm x 100 m¹¹²
- Nitrozellulose Transfer Membran, 300 mm x 3 m, Porengröße 0,2 µm¹¹³
- Hoefer Mighty Small Duel Gel Caster SE 245, Gelgießvorrichtung¹¹⁴
- Hoefer SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit, Elektrophoreselaufkammer¹¹⁵
- Filmkassette, 24 x 30 cm¹¹⁶

¹⁰⁰ Firma Pharmacia Biotech, Freiburg

¹⁰¹ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰² Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰³ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰⁴ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰⁵ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰⁶ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰⁷ Firma Eppendorf AG, Hamburg

¹⁰⁸ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹⁰⁹ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

¹¹⁰ Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen

¹¹¹ Firma Merck, Darmstadt

¹¹² Firma Whatman International Ltd., Vertrieb: Altmann Analysetechnik Vertriebs-GmbH, Holzkirchen

¹¹³ Firma Schleicher & Schwell, Dassel

¹¹⁴ Firma Amersham Biosciences, Freiburg

¹¹⁵ Firma Amersham Biosciences, San Francisco (USA)

¹¹⁶ Firma Rego, Deutschland

3.6.4. Verwendete Software

- Image Quant[®]
- Sigma Plot 2000[®]
- Microsoft Power Point[®]
- Microsoft Office[®]
- Softmax Pro[®]

IV. Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1. Subkultivierung der Zellen

Um Gleichheit und damit Vergleichbarkeit der allgemeinen Bedingungen zu erreichen, war es nötig, mit allen Zellen nach demselben Schema zu verfahren.

Zellkulturflaschen mit einer Größe von 75 cm² und 175 cm² wurden verwendet, wobei ein definiertes Endvolumen von 12 ml, für die kleineren, beziehungsweise 28 ml, für die größeren Flaschen, gewählt wurde. Sowohl das Trypsin, als auch das Medium wurden vor jedem Gebrauch auf 37 °C erwärmt, um unnötige Irritationen der Zellen zu verhindern und den optimalen Temperaturarbeitsbereich des Trypsins auszunutzen. Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit 3 ml, beziehungsweise 4 ml Trypsin abgelöst, wobei das Enzym für ein bis zwei Minuten bei 37 °C auf die Kultur einwirkte, unterstützt durch leichte mechanische Aspiration. Anschließend wurde die enzymatische Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 4 ml, beziehungsweise 5 ml gebrauchsfertigem Medium inhibiert. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde entsprechend einem Verhältnis von 1:10 in neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Anschließend wurde auf eine gute Durchmischung der Suspension und Verteilung auf dem Flaschenboden geachtet, um ein gleichmäßiges, einschichtiges Wachstum zu gewährleisten. Ein Begasungsbrutschrank schaffte die optimalen Kulturbedingungen mit 37 °C, 10 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 %, beziehungsweise 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Falle der Zelllinie CCL-221.

4.1.2. Einfrieren von Zellen

Da bei allen Krebszellen in Kultur immer die potentielle Möglichkeit besteht, dass sich die Zellen durch spontane Mutation verändern, wurden die Zellen nur bis zu einer Passage von 20 zu Versuchszwecken herangezogen. Diese Vereinbarung machte es jedoch zwingend notwendig, durch Einfrieren von Zellen in niedrigen Passagen einen großen Pool an Reservezellen zu schaffen, auf den man bei Bedarf zurückgreifen konnte.

Die Zellen wurden nach dem Ablösen durch Trypsin mit dem Gebrauchsmedium resuspendiert, dann durch Zentrifugation, 3 Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minute,

vom Überstand getrennt und in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Konzentration von einer Millionen Zellen in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C 24 Stunden zwischengelagert, bevor sie bei -135 °C endgelagert wurden.

4.1.3. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde ein entsprechendes Kryoröhrchen unter leichtem Schwenken im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 175 cm^2 Zellkulturflasche, in der sich bereits 27 ml vorgewärmtes Gebrauchsmedium befanden, überführt. Nach 24 Stunden im Brutschrank wurde das alte Medium abgenommen und durch 28 ml neues Medium ersetzt. Wenn die Zellen zwei bis drei Passagen den normalen Vorgang des Subkultivierens durchlaufen hatten, ihre Sterilität gesichert war und sie ein für ihre Zellzugehörigkeit typisches Wachstum und Morphologie aufwiesen, wurden sie den Experimenten zugeführt.

4.2. Zellzahlermittlung mit dem Zählgerät

Für alle Versuche wurden die entsprechenden Zellzahlen mit dem Beckman Coulter Gerät ermittelt.

Die Zellzahlermittlung des Beckman Coulter basiert auf der Veränderung des elektrischen Widerstandes beim Durchtritt von Partikeln durch eine Öffnung zwischen zwei Elektroden. Dabei entspricht die Häufigkeit der Impulse der Zell- oder Partikelzahl, die Amplitude entspricht ihrer Größe. Der systemische, zufällige Fehler, der entsteht, wenn zwei Partikel gleichzeitig durch die Öffnung treten und somit versuchsanordnungsbedingt als ein großer Partikel gezählt werden, wird durch das Gerät berücksichtigt und in das Ergebnis mit einbezogen.

Um Zellen überhaupt in das Gerät einführen zu können, müssen sie sich in einem Medium befinden, welches die Möglichkeiten bietet, die Zellen genügend zu separieren, dabei aber nicht die Integrität oder Morphologie der Zellen verändert. Dafür wurde die isotone Lösung Isoton III verwendet. 15 ml isotone Lösung wurden mit $500\text{ }\mu\text{l}$ der zu zählenden Zellsuspension versetzt und in einer speziellen Küvette in das Gerät gestellt, welches nach dem Programmstart die Suspension selbstständig ansaugt. Fehlerquellen ergeben sich aus den Systemvoraussetzungen, insbesondere aus der nur begrenzten Öffnungsfläche des

Ansaugstutzens. Bei sehr hoher, oder sehr niedriger Partikelzahl, bei Agglutinaten, bei Partikeln größer 35 fl, oder kleiner 25 fl und wenn sich viele Zellfragmente in der Probe befinden kann es entweder zum Messabbruch kommen, oder die Messung muss als zu ungenau angesehen werden.

4.3. Transfektion mit Caveolin-1-, β 1-Integrin-, ILK- und FAK-siRNA

4.3.1. Vorbereitungen

Die Reduktion von Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK durch siRNA-Transfektion stellt die Grundlage für alle folgenden Experimente dar.

Der Ablauf der Transfektionsvorbereitungen, der Transfektion selbst, wie auch das weitere Verfahren nach Transfektion folgte einem strikten Zeitplan. Zum einen wegen der Schaffung gleicher Versuchsbedingungen, zum anderen wegen der großen Empfindlichkeit dieser Methode gegenüber Veränderungen des Versuchsablaufs. Maßgeblich ist die Tatsache, dass eine siRNA-Transfektion nur eine temporäre Proteinreduktion zur Folge hat, was bedeutet, dass das optimale Zeitfenster und die optimalen Bedingungen zunächst gefunden und im Verlauf genau beibehalten werden müssen. Des Weiteren ist es unumgänglich unspezifischen Kontrollen hinsichtlich Nebenwirkungen zu testen. Ein weiterer Punkt ist die Optimierung des Transfektionsablaufes, das Finden des Zeitpunktes der maximalen Proteinreduktion, das Austesten der richtigen Konzentration des Transfektionsreagenzes und die Auswahl einer Zelllinie, die in ihrem Verhalten und ihren Eigenschaften den Versuchsbedingungen genügt.

Zur Erreichung eines Versuchsoptimums im oben genannten Sinne wurden zunächst die Zelllinien PA-TU 8902, MDA-MB-231, SKMES-1, SiHa, FaDu und CCL-221 mit Anti-Caveolin-1-siRNA und Kontrollen transfiziert und anschließend in Koloniebildungsassays hinsichtlich der Platiereffizienz überprüft.

Es folgten Transfektionen gegen Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK, FAK und den Kombinationen Cav-1/ β 1, Cav-1/ILK und Cav-1/FAK an der ausgewählten Zelllinie PA-TU 8902 unter Verwendung der unspezifischen Kontrolle CoXII und in Kombination CoXII/XII in einer Konzentration der siRNA von 20 nM, beziehungsweise 20 nM/20 nM. Nach Transfektion erfolgten Koloniebildungsassays, Wachstumsuntersuchungen, Proteinuntersuchungen, Zellzyklusuntersuchungen und Immunfluoreszenztests.

4.3.2. siRNA-Transfektion

Achtundvierzig Stunden vor der siRNA-Transfektion wurden die Zellen in 75 cm² große Zellkulturflaschen ausgesät. Von Bedeutung war die Einhaltung immer gleicher Zellzahlen und das Erreichen einer Zellkonfluenz von etwa 70-80 % nach 24 Stunden.

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 8,5 cm und einer Fläche von ungefähr 56,75 cm² umgesetzt. Das Endvolumen an Medium betrug 11,8 ml pro Schale, wobei alle Zelllinien entsprechend mit ihren üblichen Zellkulturmedien versorgt wurden.

Vor der Transfektion wurden alle zu transfizierenden Zellen auf ihre Vitalität, Morphologie und Sterilität hin beurteilt.

Zu Beginn des Versuchsablaufes wurde das Medium aus den Schalen abgenommen und die Zellmonolayer mit 6 ml Optimem gespült. Dann wurden die Schalen, die im Anschluss transfiziert wurden, mit 4,7 ml Optimem versehen, die untransfizierten Kontrollen erhielten 5,9 ml Optimem. Die Transfektion wurde unter Serumdeprivation vollzogen.

Zur Herstellung der siRNA-Duplex mussten die Einzelkomponenten im entsprechenden Verhältnis, wie unter dem Punkt „Transfektionsreagenzien“ beschrieben, in ein 0,5 ml Cup pipettiert werden. Nach dem Pipettieren wurde das Gemisch gevortext und anschließend zentrifugiert. Zur Aufhebung ungewollter präexistenter Bindungen der zwei DNA-Stränge wurde das Transfektionsreagenz zunächst eine Minute auf 90 °C im PCR-Heater erhitzt. Anschließend erfolgte das *Annealing*, das richtige Aneinanderlagern der *Sense*- an die *Antisense*-Sequenz, 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad.

Da die Kontroll-siRNAs bereits als Doppelstrang vorlagen, entfiel bei diesen letztgenannter Schritt.

Die Lösungen A und B wurden entsprechend dem Schema unter „3.4. Transfektionsreagenzien“ hergestellt und inkubierten 10 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Lösung B zur Lösung A hinzugefügt wurde. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsreagenz gleichmäßig über die Zellen verteilt. Bei doppelt zu transfizierenden Zellen erfolgte die Zugabe der zwei verschiedenen Transfektionsreagenzien hintereinander.

Nach 8 Stunden Inkubationszeit, erfolgte die Zugabe von 5,9 ml Optimem versetzt mit 20 % fetalem Kälberserum, was einem Endgehalt von 10 % Serum im Medium entsprach.

Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder für entsprechende Versuche angesetzt, oder es erfolgte ein Umsetzen mit Mediumwechsel.

Morphologie, Vitalität, Absterberaten und Sterilität wurden zu jedem Zeitpunkt der Transfektion überprüft.

48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Präparation der Kontrollen.

4.3.3. Kontrolle der Proteinreduktion mittels Westernblotting

Der Erfolg jeder Transfektion wurde anhand eines Proteinnachweises durch Westernblotting bestätigt. Erst nach der Überprüfung der Transfektionseffizienz war es möglich, Ergebnisse von Folgeversuchen zu interpretieren und zu verwerten.

4.3.4. Schwierigkeiten der siRNA-Transfektion

Die Schwierigkeiten der siRNA-Transfektion ergeben sich aus der Tatsache, dass es sich nicht um eine permanente, sondern lediglich um eine temporäre Form der Transfektion handelt. Das bedingt, dass die Proteinreduktion von Versuch zu Versuch auch unter optimalen Bedingungen zwischen einem Restproteingehalt von etwa 0-12 % schwankt. Diese Bandbreite erklärt sich auch daraus, dass die Zellen einer permanenten Transfektion aus einem selektionierten Zellklon stammen, also alle die gleichen Eigenschaften aufweisen, wohingegen die Aufnahme der siRNA von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein kann, ebenso kann die Interaktion der siRNA mit RNA in der Zelle differieren. Es handelt sich also um einen Pool von Zellen unterschiedlichsten Transfektionsgrades. Dies ist auch bei der Auswertung der Versuche zu beachten.

Darüber hinaus ist es auch aus versuchs- und kostentechnischen Gründen nicht möglich, sehr große Mengen an transfizierten Zellen auf einmal zu gewinnen, wie es bei der permanenten Transfektion ohne Probleme möglich wäre, was die Versuchsplanungen aufwendig und kompliziert werden lässt.

Die Optimierung der Methode der Transfektion ist ebenfalls sehr zeitintensiv. Wenn das Optimum gefunden wurde, d.h. der optimale Zeitpunkt der Transfektion, bei richtiger Zelldichte, in geeigneter siRNA-Konzentration und das Punctum Maximum der Proteinreduktion, dann ist es von großer Bedeutung, von diesem Zeit- und Versuchsplan nicht abzuweichen, um den Erfolg der Transfektion nicht zu gefährden und die Vergleichbarkeit der Experimente immer zu gewährleisten.

Dagegen ist die prompte Durchführbarkeit der siRNA-Transfektion ein großer Vorteil gegenüber einer permanenten Transfektion durch Plasmidvektorinkorporation in die Zelle.

Der Zeitrahmen der Durchführung einer permanenten Transfektion ist ungleich länger, da sich an die Transfektion ein Ausleseverfahren der gewonnenen Zellklone anschließt, welches bei siRNA-Transfektion entfällt.

Insgesamt war die siRNA-Transfektion als schnellere und flexiblere Methode am geeignetsten, um die Auswirkungen der Proteinreduktion von Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK in Einzel- und Doppeltransfektionen zu untersuchen.

4.4. Koloniebildungsassay

4.4.1. Historischer und mathematischer Hintergrund der Zellüberlebenskurven

Die Erstbeschreibung der Methodik der Zellüberlebenskurven führt auf Puck und Marcus zurück und ist seitdem ein etabliertes und vielverwendetes Verfahren, um Zellüberleben nach Einwirkung verschiedener Noxen zu beurteilen und zu vergleichen [Puck, Marcus et al, 1956].

Eine Zellüberlebenskurve beschreibt den Zusammenhang zwischen Bestrahlungsdosis und dem Anteil der proliferierenden Zellen. Die Bedeutung von `Zellüberleben` ist hierbei klar definiert. Eine Zelle, die 5 bis 6 Mitosen durchlaufen hat, was einer Koloniegröße von etwa 50 ($2^5 = 32$; $2^6 = 64$; $(32+64) \times 0,5 = 48$, => ca. 50) Zellen und mehr entspricht, hat ihre reproduktive Integrität behalten und somit im definierten Sinne überlebt, man spricht hierbei auch vom sogenannten klonogenen Überleben [Hall, 2000, S.32/33].

Bei der Auszählung der 6-Well-Platten wurden demnach nur Kolonien von einer Mindestzellzahl von 50 Zellen pro Kolonie gezählt. Zur Auswertung der gezählten Kolonien muss die Plattiereffizienz (Engl.: plating efficiency) ermittelt werden, da man auch unter normalen Umständen keine 100 %ige Koloniebildungsrate erhält. Ursachen hierfür sind nicht zu verhindernde physikalische und chemische Einflüsse auf die Zellkultur, die als biologisches, lebendes Konstrukt komplexe Reaktionsschemata aufweist und kein statisches Wachstum liefern kann. Diese Plattiereffizienz wird anhand der unbestrahlten Kontrollen ermittelt. Wurden zum Beispiel 100 Zellen ausgesät und nach einer Woche finden sich 80 Kolonien mit mehr als 50 Zellen, so beträgt die Plattiereffizienz (PE) 80 % oder 0,8.

Zum Erhalt der Überlebensfraktion (SF) (Engl.: surviving fraction) wird die Anzahl der gezählten Kolonien (GK) durch die Anzahl der ausgesäten Kolonien (AK) und der Plattiereffizienz (PE) dividiert:

$$SF = GK / AK \times PE$$

Mit der Überlebensfraktion und der Dosis in Gray lassen sich dann die Überlebenskurven graphisch darstellen. Dazu wird üblicherweise eine lineare x-Achse mit der Bestrahlungsdosis und eine logarithmische y-Achse mit der Überlebensfraktion verwendet. Bei dieser Achseneinteilung weisen die Kurven in Abhängigkeit der Bestrahlung

charakteristische Verläufe auf. Strahlen mit geringem linearem Energietransfer, wie zum Beispiel Röntgenstrahlung oder γ -Strahlung, sind dadurch gekennzeichnet, dass die Kurve zu Anfang im Bereich geringer Dosen einen linearen Verlauf einnimmt, in diesem Bereich ist die Überlebensfraktion eine exponentielle Funktion in Abhängigkeit der Dosis. Gefolgt von einer Schulterbildung im Bereich mittlerer Bestrahlungsdosen geht die Kurve im Hochdosisbereich wieder in einen linearen Verlauf über. Zur mathematischen Beschreibung und biologischen Erklärung dieses Kurvenverlaufes haben sich im Wesentlichen zwei Ansätze durchgesetzt [Hall, 2000, S. 35f], die im Folgenden unter Zuhilfenahme je eines Graphen vereinfacht dargestellt werden sollen.

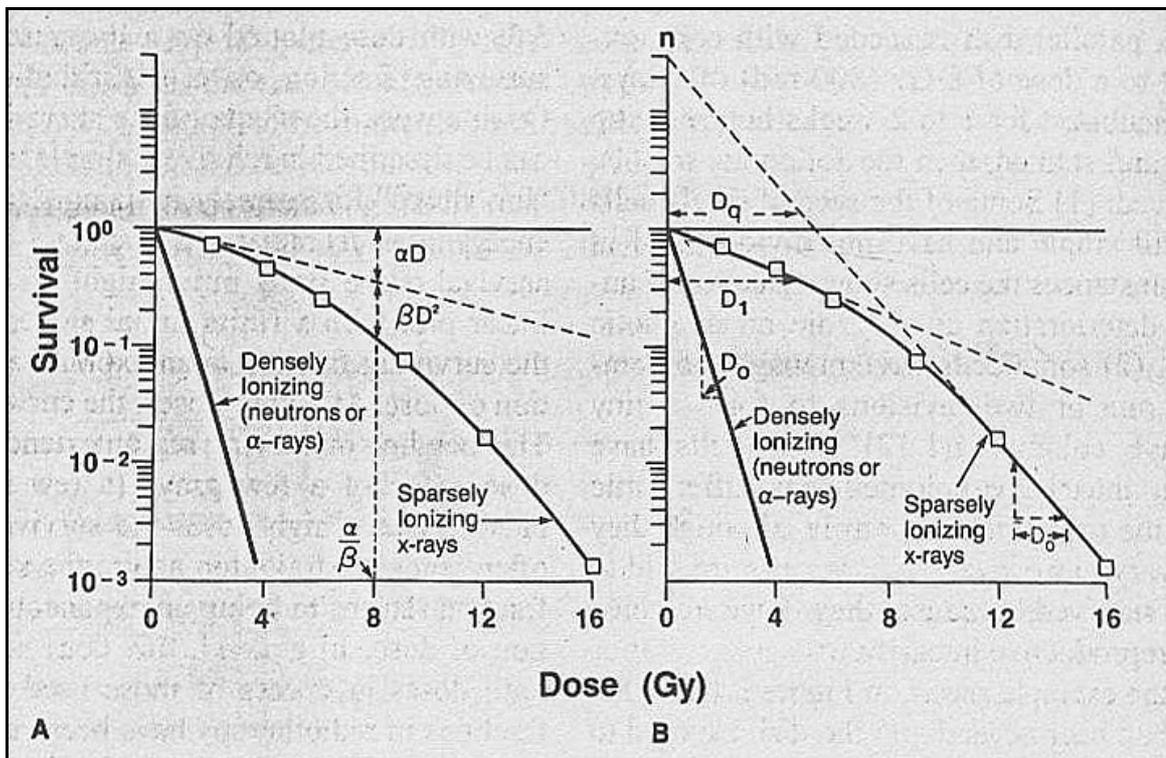


Abb. 6.: Hall, 2000, S.36

Abbildung A: Linearquadratisches Modell, mit Konstanten α und β

Abbildung B: multitarget model oder D_q/D_0 - Modell

Begriffserläuterung: Engl. **survival**: Überlebensfraktion, Engl. **dose**: Strahlendosis, Dosiseinheit Gray [Gy], Engl. **densely ionizing**: dicht ionisierende Strahlung, z.B. Neutronen (Engl.: **neutrons**) und α -Strahlung (Engl.: **α -rays**), Engl. **sparsely ionizing**: locker ionisierende Strahlung, z.B. Röntgenstrahlung, Photonenstrahlung (Engl.: **x-rays**)

Das sogenannte *multitarget model* oder D_q/D_0 -Modell erklärt den Kurvenverlauf folgendermaßen:

D_1 : D_1 beschreibt die erste Kurvenneigung (Engl.: initial slope), die durch *single-event-killing* (Engl.: Zelltod durch ein einzelnes schädigendes Ereignis) verursacht wird,

repräsentiert also hiermit den letalen Zellschaden. Dabei ist D_1 der reziproke Wert des *initial slope* und repräsentiert die Dosis, die nötig ist, um die Überlebensfraktion auf 37 % des Ausgangswertes zu reduzieren. Im linearen Bereich der Kurve, bei logarithmischer y-Achse, ist die Dosis, die nötig ist, um die Überlebensfraktion auf einen gegebenen Wert (z.B. 0,37 oder 37 %) zu verringern, vom Betrag her immer gleich.

D_0 : D_0 stellt die letzte Neigung der Kurve (Engl.: final slope) dar, repräsentativ für das sogenannte *multiple-event-killing* (Engl.; mehrere Ereignisse führen zum Zelltod) und ist entsprechend D_1 der reziproke Wert des *final slope*, stellvertretend für die Dosis, die nötig ist, um eine Reduktion der Überlebensfraktion auf 37 % des entsprechenden Ausgangswertes zu erzielen, z.B. von 0,1 auf 0,037, oder von 0,01 auf 0,0037 und so weiter. Damit repräsentiert D_0 den subletalen Zellschaden.

D_q, n : D_q beziehungsweise n beschreiben quantitativ die Weite der Kurvenschulter.

Bei einem großen n ist die Schulter entsprechend langgezogen und von flacherem Verlauf, ein kleines n bedeutet einen engeren Kurvenverlauf und eine geringe Ausprägung der Schulter.

D_q ist definiert als die Dosis, bei der die Tangente, angelegt an den Beginn der Kurvenschulter die parallelverschobene x-Achse schneidet. Fixpunkt ist dabei der Punkt, ab dem die Tangente und der linear verlaufenden Kurvenanteil nicht mehr parallel sind und stellt damit eine Art Schwellendosis dar, ab der sich ein Effekt durch die Bestrahlung einstellt. Da man jedoch natürlich immer einen Strahleneffekt im engeren Sinne aufweisen kann, wird diese Schwellendosis als „Quasi-Schwellendosis“ (Engl.: quasithreshold dose) bezeichnet.

Den Zusammenhang zwischen n , D_0 und D_q beschreibt folgende Formel:

$$\text{Log}_e n = D_q / D_0$$

Das **linear-quadratische Model** zur Erläuterung des Kurvenverlaufs ist neueren Ursprungs und heute Mittel der Wahl zur Beschreibung von Zellüberlebenskurven:

Zugrundeliegend ist die Annahme, dass es zwei Arten des Zelltodes gibt. Einer proportional zur Dosis, der andere proportional zum Quadrat der Dosis.

Die Formel der Zellüberlebenskurve ist dabei wie folgt:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Dabei ist S die Fraktion von Zellen, die eine Dosis D überleben; α und β sind Konstanten. Die Komponenten des Zelltodes proportional zur Dosis sind gleich derer proportional zum Quadrat der Dosis, wenn gilt:

$$\alpha D = \beta D^2 \quad \text{oder} \quad D = \alpha / \beta$$

Das Besondere am linear-quadratischen Modell ist, dass die Kurve immer eine gebogene Form aufweist, also keinen linearen Verlauf einnimmt. Der Verlauf in höheren Dosenbereichen ist lediglich im Limes gegen Unendlich linear; daher optisch dem Ende entgegen wieder eine Gerade und somit ist mathematisch die Überlebensfraktion, wenn die Dosis im Limes gegen Unendlich geht, wieder eine Exponentialfunktion der Dosis. Das linear-quadratische Modell stellt auch die Grundlage der Beurteilung der Zellüberlebenskurven in dieser Arbeit dar.

4.4.2. Plattierung der 6-Well-Platten

Die 6-Well-Platten wurden nach folgendem Schema mit Zellen bestückt: Zelllinien PA-TU 8902, CCL-221, SKMES-1, MDA-MB-231, SiHa und FaDu wurden untransfiziert als Kontrollen (Co) oder mit siRNA transfiziert (siRNA) entsprechend der Tabelle (Zahlenangaben entsprechen absolute Zellzahl/Well) ausgesät und anschließend nicht (0 Gy) oder mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt.

Zelllinie: **Bestrahlung [Gy]:**

	0		2		4		6	
	Co	siRNA	Co	siRNA	Co	siRNA	Co	siRNA
PA-TU 8902	300	500	300	500	500	750	1.000	2000
CCL-221	300	500	300	500	500	750	1.000	2000
SKMES-1	300	500	300	500	500	750	1.000	2000
MDA-MB-231	300	500	300	500	500	750	1.000	2000
SiHa	500	750	500	750	750	1.000	2000	3000
FaDu	500	750	500	750	750	1.000	2000	3000

Die Plattierung der 6-Well-Platten erfolgte 24 Stunden nach Transfektion.

Die Zellen wurden mit Trypsin vom Zellkulturschalenboden abgelöst, mit Gebrauchsmedium vermengt, in ein 50 ml-Falcontube überführt und mit dem Zellzählgerät Beckman Coulter Z Series gezählt. Durch leichtes Schwenken des Falcontubes konnte eine Adhäsion der Zellen im Falcontube in der Zwischenzeit vermieden werden.

Um ein präzises und schnelles Aussäen der Zellen in die 6-Well-Platten zu gewährleisten und sicherzugehen, in allen Wells den gleichen systematischen Fehler bezüglich der Zellzahl zu machen, wurde nach dem Zählen der Zellsuspension eine Verdünnung angesetzt mit einer Konzentration von 100 Zellen/10 µl Zellsuspension. Diese angesetzte Verdünnung wurde zwischenzeitlich und vor jedem Pipettierschritt geschwenkt, um Verklumpungen oder Adhäsionsvorgänge der Zellen zu unterbinden.

Beim Aussäen der Zellen wurden maximal zwei 6-Well-Platten auf einmal mit Zellen bestückt. Dabei wurde mit einer Eppendorff-Pipette die der richtigen Zellzahl entsprechende µl-Zahl aus der Zellsuspensionsverdünnung entnommen und von links nach rechts auf dem Boden des Wells ausgestrichen. Nach Beendigung des Ausstreichens der zwei Platten wurde mittels einer 25 ml-Pipette 2 ml Gebrauchsmedium vorsichtig zu jedem

Well dazugegeben. Anschließendes kreisförmiges Schwenken und kurzes Rütteln nach oben/unten und rechts/links ermöglichten eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in den Wells.

4.4.3. Versuchsablauf und Bestrahlung

Nach dem Aussäen der Zellen in den 6-Well-Platten wurden diese bis zum Zeitpunkt der Bestrahlung in den Brutschrank verbracht. Während des ganzen Versuchsverlauf wurden die Koloniebildungsassays so wenig wie möglich äußeren Stressoren ausgesetzt. Die Bestrahlung der 6-Well-Platten erfolgte mit einer Röntgenröhre der Firma Seifert mit einer angelegten Spannung von 240 kV und einer durchschnittlichen Bestrahlung von 1 Gy/min. Der Zeitpunkt der Bestrahlung war für alle Versuche 24 Stunden nach Plattierung, also 48 Stunden nach Transfektion. Alle Wells befanden sich immer innerhalb der 90%-Isodosenbegrenzung.

4.4.4. Abstoppen der Koloniebildungsassays

Acht Tage nach Plattierung, entsprechend sieben Tage nach Bestrahlung wurden die Koloniebildungsassays abgestoppt.

Zunächst wurde das Medium aus den Wells der 6-Well-Platten abpipettiert. Anschließend wurden die Wells mit 2 ml 1XPBS gespült. Dann wurde das 1XPBS verworfen und die Kolonien wurden mit 1 ml/Well 4 %-Formaldehyd fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten folgte die Inkubation mit 70 %-Ethanol, das ebenfalls 10 Minuten einwirkte. Nach einem weiteren Spülschritt wurden die Kolonien mit Comassie-Blau-Färbelösung angefärbt.

4.5. Erstellung von Wachstumskurven

Die PA-TU 8902-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in 25 cm²-Zellkulturflaschen nach folgendem Schema ausgesät:

Bestrahlung [Gy]	0		2	
	Co	siRNA	Co	siRNA
Absolute Zellzahlen	780	1300	780	1300

24 h nach dem Aussäen wurden die entsprechenden Flaschen mit 2 Gy bestrahlt und acht Tage nach Versuchsansatz, bzw. sieben Tage nach Bestrahlung wurden die Zellen am Zellcounter gezählt. Die Ergebnisse wurden mittels Excel und Sigma Plot 2000 graphisch dargestellt.

4.6. SDS-Gelelektrophorese und Westernblotting

4.6.1. Verfahren der Proteinextraktion

Um Proteine nachweisen zu können, war es notwendig, Lysate der betreffenden Zellen herzustellen. Der gesamte Ablauf der Proteinextraktion fand in auf 4 °C vorgekühlten Reagenzgefäßen und Zentrifugen statt, ebenso waren alle Reagenzien unter Ausnahme des 37 °C warmen Trypsins 4 °C kalt. Diese Abkühlung war notwendig, um ungewollte lytische Prozesse zu verhindern.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen vom Medium befreit, mit 1XPBS gespült und dann mittels Trypsin vom Untergrund abgelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von normalem Gebrauchsmedium antagonisiert und die Zellsuspension wurde in 15 ml-Falcontubes überführt. Bei 1.000 Umdrehungen pro Minute wurde die Zellsuspension 3 Minuten lang zentrifugiert, bevor der Überstand abpipettiert wurde. Die Zellen wurden in 1XPBS resuspendiert und nochmals bei 1.000 Umdrehungen pro Minute 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellmasse in 300 µl zuvor frisch angesetztem modifizierten RIPA-Lysepuffer. Das zelllytische Potential des RIPA-Puffers durch den Gehalt an Proteinasen und Phosphatasen wurde durch fünfmaliges Aspirieren mit einer 100 µl-Eppendorff-Pipette unterstützt. Die Lösung wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorffcup

überführt und inkubierte 5 Minuten bei 4 °C auf Eis. Anschließend wurde in die Probe ein Ultraschallkopf, Ultraschall-Desintegrator Branson Sonifer W-250, eingeführt und das Gemisch 10 Sekunden lang bei den Einstellungen *output control* 4 und *duty control* 60 % mit Ultraschall behandelt. Dabei wurde auf den exakt mittigen Sitz des Schallkopfes in der Probenflüssigkeit geachtet. Es schloss sich eine Inkubation von 5 Minuten bei 4 °C an. Die Proteinlösung wurde dann 20 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der daraus gewonnene Überstand entspricht dem gewünschten Zelllysate und wurde in einem 1,5 ml Eppendorffcup bei -135 °C bis zum Wiedergebrauch gelagert. Das verbleibende Pellet wurde mit 400 µl RIPA-Stammlösung gespült und in 30 µl 5XProbenpuffer durch mehrfaches Aufziehen mit einer 100 µl-Eppendorff-Pipette gelöst. Anschließend wurde das Gemisch 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und ebenfalls bei -135 °C gelagert. Das Mitaufbereiten der Pellets diente der Kontrolle, ob sich die betreffenden Proteine auch wirklich in dem vorher abgenommenen Zelllysate befanden und nicht im Pellet. Dadurch konnte eine Falschinterpretation einer Proteinreduktion, ermittelt anhand des Lysates, ausgeschlossen werden.

4.6.2. Quantitative Proteinanalyse mittels Bca-Proteinbestimmung

Für die Auftrennung der Proteine in einem Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese ist ausschlaggebend, dass sich in jedem Slot des Gels quantitativ die gleiche Menge an Protein befindet, da sonst der Lauf der Proteine im Gel ungleichmäßig wird, und damit auch die Auftrennung in ihrer Qualität leidet. Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde für alle Versuche die Bca-Proteinbestimmung herangezogen.

Die Bca-Proteinbestimmung basiert auf dem Anfärben von Proteinlösungen und der Messung der Farbdichte durch einen *ELISA-Reader*, der unterschiedliche Absorptionswerte ermitteln kann. Somit entspricht eine dunkle Anfärbung der Proteinlösung durch das Bca-Reagenz einer hohen Absorptionsraten im *ELISA-Reader* und damit einem hohem Proteingehalt. Um diesen Proteingehalt quantifizieren zu können, muss das Messergebnis der Proben mit einer Eichkurve verglichen werden, die in jeder Messung mit erstellt wurde. Diese Eichkurve erhielt man, in dem man bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 2 mg BSA/ml modifiziertem RIPA-Puffer-Stammlösung ansetzte und daraus eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,125 mg/ml herstellte.

Für die Messung wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Als Leerwert diente RIPA-Stammlösung, gegen den alle Absorptionswerte abgeglichen wurden. In die folgenden Wells wurden die Proben der Verdünnungsreihe verbracht. Dann folgten fortlaufend 10 µl der zu messenden Proben verdünnt in RIPA-Stammlösung. Die Verdünnung richtete sich nach dem geschätzten Proteingehalt der Probe, um Messergebnisse außerhalb des Bereiches der Eichkurve zu verhindern. Zur Erhöhung der Präzision erfolgte immer eine Doppelmessung mit Mittelwertberechnung. Zu den vorgelegten 10 µl Probe musste nun das Bca-Reagenz hinzugegeben werden, welches sich 50/1 aus einer fertigen Lösung A und einer Lösung B zusammensetzte. Nach dem 200 µl A/B-Reagenz in die Wells pipettiert wurden, inkubierte der Ansatz 20 Minuten bei Raumtemperatur, bevor er im ELISA-Reader mittels des Programmes Soft Max Pro[®] ausgewertet wurde.

4.6.3. Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese

Die Endkonzentration von Protein pro Gel-Slot betrug 20 µg, das Endvolumen pro Slot betrug 25 µl. Nach diesem Schema wurde die entsprechende Menge an Lysat mit der Menge an 5XProbenpuffer, die zum Ausgleich der Differenz bis zum Erreichen der 25µl nötig war, vermischt und 5 Minuten gekocht. Danach wurden die Proben auf Eis zwischengelagert und auf das Gel aufgetragen.

4.6.4. Herstellung und Vorbereitung der Gele für die Elektrophorese

Um zu gewährleisten, dass die Gele gut auspolymerisiert und von gleichbleibend guter Qualität waren, wurden diese mindestens 24 Stunden vor Gebrauch angefertigt. Es wurden Gele mit neun Slots mit einer Größe von 8,0 x 8,5 cm und Gele mit 20 Slots mit den Maßen 16,0 x 17,0 cm hergestellt. Dazu wurde zunächst das Trenngel gegossen und zum Erhalt einer glatten und geraden Trenngel-/Sammelgelgrenze 200 µl Isopropanol darüber gegeben. Nach einstündigem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und mit destilliertem Wasser nachgespült. Nach sorgfältigem Abtrocknen der Gießapparatur wurde das Sammelgel gegossen. Die Lagerung der fertigen Gele erfolgte in mit 1XLaufpuffer getränkten Tüchern bei 4 °C.

4.6.5. Die SDS-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese begründet sich auf der Eigenschaft der Wanderung von Molekülen mit einer Nettoladung in einem elektrischen Feld. Der Vorteil der Verwendung von Gelen für diese Auftrennung ist, dass das Gel Konvektionsströme durch Temperaturgradienten verhindert und zudem in der Porengröße durch veränderliche Anteile von Acrylamid und Methylenbisacrylamid variabel ist. Polyacrylamidgele sind zudem chemisch inert und lassen sich schnell durch Acrylamidpolymerisation herstellen. Für die vorliegenden Versuche wurden Gele mit 10 % und 15 % Acrylamidgehalt verwendet. Gele mit einer höheren Acrylamidkonzentration besitzen kleinere Poren als Gele mit geringem Acrylamidgehalt, kleinere Poren bedeuten bessere Auftrennung kleiner Proteine, während bei Gelen mit großen Poren Proteine mit geringem Molekulargewicht rasch durchlaufen, im Gegensatz dazu die größeren Proteine langsam durchlaufen und somit besser aufgetrennt werden.

Der zusätzliche Gehalt an Sodiumdodecylsulfat (SDS) bewirkt eine Zerstörung aller nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Der Mercaptoethanolanteil im 5XProbenpuffer reduziert zudem alle Disulfidbrücken. So kann sich immer ein SDS-Anion an zwei Aminosäurereste binden, wodurch ein stark negativ geladener Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht. Die durch das SDS erworbene Ladung ist viel größer als die ursprüngliche Ladung des Proteins, die dadurch zu vernachlässigen ist, und direkt proportional zum Molekulargewicht des Proteins, weshalb die Auftrennung nach Proteingröße ermöglicht wird [Stryer, S. 48/49].

Durch die Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau wurde die Lauffront im Gel als Linie sichtbar.

Die zuvor präparierten Proben wurden in die Slots des sich in einer vertikalen Anordnung befindlichen Gels, in der *Hoefler SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit*, pipettiert, wobei 10 µl vom *Bench Mark Protein Ladder* als definierter Proteinmarker im ersten Slot, der ersten Vertiefung im Gel, mitlief. Nach Anlegung einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 20 mA pro Gel, für Gele der Maße 8,0 x 8,5 cm, und 30 mA pro Gel, für Gele der Maße 16,0 x 17,0 cm, laufen die Proteine von oben, vom Sammelgel, der Kathode nach unten, durch das Trenngel zur Anode. Die Elektrophoresevorrichtung war dabei nach Gebrauchsanleitung mit 1XLaufpuffer befüllt worden. Als Stromquelle diente der *Power Supply EPS 3500*. Die Elektrophorese wurde mit dem Erreichen der Lauffront an der Gelunterkante abgebrochen.

4.6.6. Das Blotting: Arbeitsablauf und Ergebniskontrolle

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele mit einer Nitrozellulosemembran belegt und mit in Anoden- beziehungsweise Kathodenpuffer getränkte *Whatmanpaper* oben und unten bestückt in den *Blotter* zwischen zwei gegenpolig mit Spannung angelegter Graphitplatten verbracht. Zusätzlich wurde auf den Aufbau mechanischer Druck ausgeübt, um das Übertreten der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran durch die angelegte Spannung zu unterstützen. Nach 2 Stunden bei einer Spannung von maximal 15 V und einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gel wurde der Blot abgebrochen und die Membranen herausgenommen. Zur Kontrolle, ob das *Blotting* erfolgreich war, d.h. ob die Proteine gleichmäßig übergetreten waren und sich keine Artefakte, wie zum Beispiel durch Luftblasen verursacht, oder Defekte auf der Membran befanden, wurden die Membranen anschließend in Ponceau S Färbelösung gefärbt. Anhand der Beschaffenheit der dann sichtbar gewordenen Proteinbanden und der Markerbande ließ sich die Qualität des Blots und indirekt auch der Lauf der SDS-Gelelektrophorese beurteilen.

4.6.7. Detektion der Proteine

Zum Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran wurden Primärantikörper verwendet, die spezifisch an die gesuchten Proteine binden, siehe „3.5. Verwendete Antikörper“. Dafür war es nötig, alle unspezifischen Proteinbindungsstellen durch ein Reagenz zu blockieren, der Vorgang des sogenannten Blockens. Verwendet wurde hierfür eine Lösung aus 1XPBS mit 1 % Magermilchpulver. Die Inkubationszeit der Nitrozellulosemembran in diesem Blockingreagenz betrug 6 x 5 Minuten auf dem Rüttler. Nach einem Spülvorgang mit 3 x 5 Minuten mit 1XPBS wurde eine Stunde lang mit dem Primärantikörper inkubiert. Dafür wurden die Membranen entsprechend geschnitten und mit der Antikörperlösung in Plastik eingeschweißt auf den Kippschüttler verbracht, was eine gute Flüssigkeitsbewegung über der Membranoberfläche und somit eine gleichmäßige Verteilung der Antikörper sicherte.

Nach einem weiteren Spülvorgang mit 3 x 5 Minuten mit 1XPBS inkubierten die Membranen wie oben beschrieben mit dem Sekundärantikörper, der peroxidasekonjugiert war. Es folgten 6 x 5 Minuten Spülen mit 1XPBS auf dem Rüttler bevor das ECL-Reagenz für 1 Minute auf die Membran pipettiert wurde.

Das Prinzip des ECL-Westernblottings soll anhand der folgenden Graphiken erklärt werden:

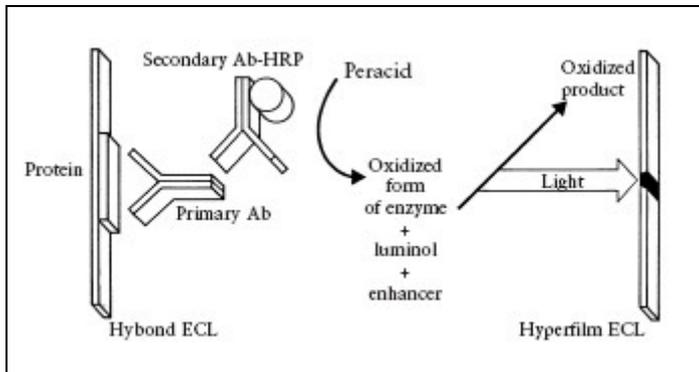


Abb. 7: „ECL Westernblotting detection reagents and analysis system“, Amersham Biosciences, 2002, S.5
 Engl. **protein:** zu detektierendes Protein, Engl. **primary Ab:** Primärantikörper, Engl. **secondary Ab-HRP:** Sekundärantikörper, Peroxidase-konjugiert, Abk. HRP: Engl. **horseradish peroxidase**, Engl. **hybond ECL:** ECL-Reagenz, Engl. **peracid:** Reaktionsteilnehmer, Säure, Engl. **oxidized form of enzyme:** oxidierte Form des Enzyms, Engl. **luminol:** Lumineszenz, Engl. **enhancer:** Reaktionsbeschleuniger, Engl. **oxidized product:** oxidiertes Produkt, Engl. **light:** Licht, Engl. **hyperfilm ECL:** spezielle Detektionsfilme

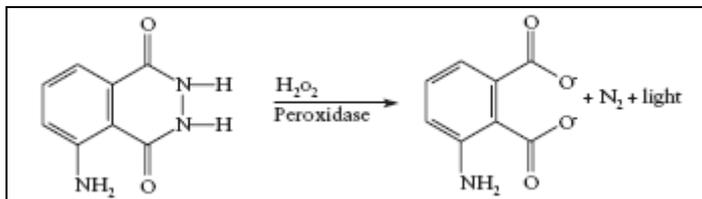


Abb. 8: „ECL Westernblotting detection reagents and analysis system“, Amersham Biosciences, 2002, S.6
 H_2O_2 : chemische Formel für Wasserstoffperoxid, Engl. **peroxidase:** Peroxidase, N_2 : chemische Formel für Stickstoff, Engl. **light:** Licht; schematische chemische Strukturformeln des Reaktionsreagenzes zur Veranschaulichung der strukturellen Veränderung während der Reaktion

Der Sekundärantikörper, der peroxidasekonjugiert ist (HRP, Engl.: horseradish peroxidase), bindet spezifisch an den primären Antikörper, der bereits mit dem gesuchten Protein gekoppelt ist, wie Graphik 1 veranschaulicht. Das ECL-Reagenz liefert in Form des Luminols das Substrat der Peroxidase und in Form des H_2O_2 (chem. Formel für Wasserstoffperoxid) einen Co-Faktor der Reaktion. In Graphik 2 ist die stattfindende chemische Reaktion unter Zuhilfenahme von Strukturformeln skizziert. Das Luminol, in der Abbildung als Strukturformel gezeigt, wird durch die Peroxidase und H_2O_2 gespalten, was zur Bildung von N_2 (chem. Formel für Stickstoff) und zur Lichtemission führt. Diese Lichtemission hat ihren *Peak* nach 5 bis 20 Minuten und nimmt dann langsam mit einer Halbwertszeit von etwa 60 Minuten ab. Die maximale Lichtemission findet im

Wellenlängenbereich von 428 nm statt und wird mittels ECL-Hyperfilmen, die sensibel auf Licht in diesem blauen Wellenlängenbereich reagieren, detektiert. Die so erhaltenen Filme wurden mittels Entwickler und Fixierer in einer Dunkelkammer entwickelt und nach Einscannen am Computer ausgewertet. Dazu wurden die Programme Image Quant[®], Microsoft Excel[®] und Sigma Plot 2000[®] herangezogen.

4.6.8. Auswertung der Ergebnisse

Bei Ermittlung der prozentualen Proteinreduktion nach siRNA-Transfektion wurden jeweils die sogenannten *fold inductions*, also die lokalen Dichtewerte der Banden herangezogen. Dann wurden die Werte der untransfizierten Kontrolle mit der durch Kontroll-siRNA-transfizierten Kontrolle und der mit siRNA-transfizierten Probe miteinander verglichen. Diese *fold inductions* wurden nach dem Scannen der Filme durch das Programm Image Quant[®] ermittelt. Vergleichende Rechnungen wurden in Microsoft Excel[®] ausgeführt. Graphische Darstellungen erfolgten teils in Microsoft Excel[®], teils mit Hilfe von Sigma Plot 2000[®]. Ausschlaggebend war hierbei eine möglichst geringe Differenz der *fold induction* zwischen untransfizierten und mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen, und eine große Differenz zwischen der mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen und den siRNA-transfizierten Zellen im Sinne einer Reduktion nach siRNA-Transfektion.

Bei bereits optisch eindeutigen und aussagekräftigen Stärkegradveränderungen der Banden, die sich in Wiederholungsversuchen ebenso replizieren ließen, wurde bei den Proteinbestimmungen auf eine rechnerische Auswertung der Banden verzichtet, da der Augenmerk hierbei nicht auf der Beweisführung der Proteinreduktion nach Transfektion lag, sondern die quantitative Veränderung der Proteine der Signaltransduktionsketten von Bedeutung war.

4.7. Nachweis ausgewählter Proteine nach Transfektion mit und ohne Bestrahlung mit 2 Gy

Um direkte Auswirkungen nach Bestrahlung auf die Signaltransduktion der transfizierten und untransfizierten PA-TU 8902 erfassen zu können, wurden ausgesuchte Proteine der Signaltransduktion nachgewiesen. Dazu wurden die PA-TU 8902-Zellen 24 Stunden nach Transfektion in Zellkulturschalen ausgesät und 48 Stunden nach Transfektion mit 2 Gy

bestrahlt, unbestrahlte Kontrollen dienen zum Vergleich. Es erfolgten Proteinextraktionen 48 Stunden nach Transfektion sowie zu den Zeitwerten eine und drei Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy. Es wurden folgende Proteine detektiert: AKT-Serin 473, AKT-Threonin 308, AKT, GSK 3 β -Serin 9, GSK 3 β , Src, Src 416, MAPK, MAPK-P, JNK, JNK-P, FAK 379, FAK 925, FAK, Cas, Paxillin, Paxillin 118 und β -Aktin.

Es folgte das Scannen der Filme und ein vergleichendes Gegenüberstellen der Detektionsergebnisse.

4.8. Durchflußzytometrie

4.8.1. Grundzüge der Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer vereinigt die Möglichkeiten eines Fluoreszenzmikroskops mit denen eines Zellzählgerätes. Die jeweilige Probe wird hierbei in das Gerät eingeführt und anhand verschiedener chemischer und physikalischer Größen beurteilt. Da verschiedene Merkmale durch Fluoreszenzfarbstoffe angefärbt werden können, sind diese durch Messung der Lichtemission bei 488 nm nach Anregung durch einen Argon-Ionen-Laser erfassbar. Die Lichtemission ist hierbei proportional zur vorliegenden Menge des betreffenden Merkmals, zum Beispiel einer Zelloberflächenstruktur. Der Laser wird aber nicht nur für die Emissionsanregung der Fluoreszenzen genutzt, sondern es wird zusätzlich die Streuung des Laserstrahls durch den bestrahlten Partikel erfasst. Eine Streuung von 0° bis 10° wird als *forward-scatter* (FSC) bezeichnet und steht für die Partikelgröße. Die Lichtablenkung im 90°-Winkel heißt *side-scatter* (SSC) und stellt ein Maß für extra- und intrazelluläre Strukturen dar, steht somit für die Partikelmorphologie. Die Anzahl der Partikel wird durch die Tatsache ermittelt, dass durch die Messkapillare nur jeweils ein Partikel gelangt und die Veränderung des elektrischen Widerstandes pro Ereignis demnach die absolute Partikelzahl feststellt. Alle Messsignale werden mit Hilfe eines *Photomultipliers* verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Anschließend erfolgt die Auswertung und graphische Darstellung am Computer.

4.8.2. Der Zellzyklus

Der Zellteilungszyklus lässt sich bei normalen diploiden Zellen in vier deutlich voneinander abgrenzbare Phasen unterteilen: G1-, S-, G2- und M-Phase. Die G0-Phase oder Ruhe-Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass sich die Zelle nicht teilt und reversibel nicht am Zellzyklus teilnimmt. Der normale DNA-Gehalt einer diploiden Zelle wird mit $2n$ bezeichnet, da die DNA in Form von paarigen Chromosomen vorliegt.

Die einzelnen Phasen des Zellzyklus lassen sich im Überblick kurz wie folgt darstellen.

G1-Phase

In der G1-Phase findet DNA- und Proteinreproduktion bei jedoch konstantem DNA-Gehalt von $2n$ statt, was die Zelle in ihrem DNA-Gehalt nicht unterscheidbar macht zur G0-Phase, in der die Zelle ebenfalls den einfachen Satz $2n$ besitzt.

S-Phase

Die S-Phase stellt die DNA-Replikationsphase dar. In dieser Phase wird die gesamte nukleäre DNA der Zelle verdoppelt, somit verändert sich der DNA-Gehalt der Zelle von $2n$ auf $4n$.

G2-Phase

In der G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die eigentliche Zellteilung vor. Dabei bleibt der DNA-Gehalt von $4n$ weiter bestehen.

M-Phase

Die M-Phase oder Mitose-Phase umfasst die eigentliche Zellteilung. In mehreren Teilschritten entstehen aus der ursprünglichen Mutterzelle mit $4n$ zwei identische Tochterzellen mit jeweils einem DNA-Gehalt von wieder $2n$.

Nach der M-Phase tritt die Zelle entweder in die Ruhe-Phase ein oder beginnt mit der Protein- und DNA-Synthese im Rahmen der G1-Phase.

4.8.3. Zellzyklus- und DNA-Gehaltsbestimmung mit Hilfe der BrdU-DNA-Doppel-färbung

Die Methode dient der Quantifizierung der DNA durch Fluoreszenzfarbstoffe wie dem Propidiumiodid, die in direkter Relation zur DNA-Menge in die DNA interkalieren. Dadurch lässt sich die absolute Menge der DNA ermitteln. Durch zusätzliche Markierung mit dem BrdU-Reagenz, 5-Bromo-2-desoxyuridine-Reagenz, lässt sich die DNA durch diese weitere Dimensionen anteilig auf die Zellzyklusphasen verteilen. Dabei interkaliert Propidiumiodid in doppelsträngige DNA und markiert somit alle Zustände bei der die DNA als Doppelstrang vorliegt, also vor allem die G1-Phase und die G0-Phase. Das BrdU-Reagenz wird dagegen anstelle von Thymidin bei der DNA-Synthese in die DNA eingebaut, wodurch der prozentuale Anteil der S-Phase-Zellen sowie die Dauer der S-Phase bestimmt werden kann.

Das Verhältnis aus ermittelter absoluter Zellzahl und absolutem DNA-Gehalt kann mit Hilfe eines Diagramms, hier in vereinfachter idealisierter Form, dargestellt werden:

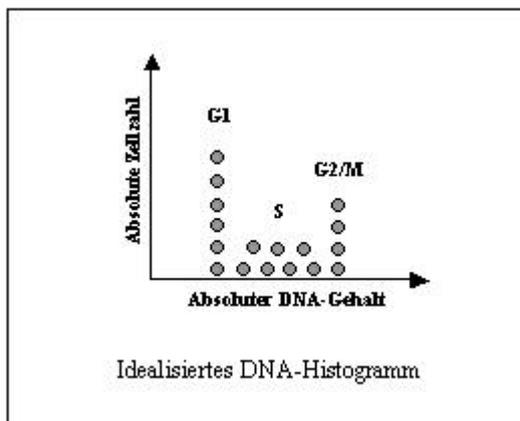


Abb. 9: modifiziert nach „SPECTRAMax® 190, Microplate Spectrophotometer, Operator`s Manual, Molecular Devices Corporation, California, 1998“, aufgetragen sind der absolute DNA-Gehalt gegen die absolute Zellzahl, G1, S, G2 und M stehen für die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus

Die Anfärbung mit dem BrdU-Reagenz, Propidiumiodid und den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine Differenzierung des DNA-Gehaltes in einer dritten Dimension und führt somit zur Aufteilung der DNA entsprechend der Zellzyklusphasen. Dieser Zusammenhang kann mit Hilfe eines Dot Plots dargestellt werden. Aus diesen Dot Plots wird dann die entgültige Verteilung ermittelt und mittels Histogrammen graphisch dargestellt.

4.8.4. Versuchsdurchführung der Zellzyklusanalyse unter Verwendung von BrdU

Zur Durchführung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 8,5 cm² umgesetzt, mit einer absoluten Zellzahl von 500.000 Zellen pro Schale. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion erfolgte eine zehnminütige Inkubation der Zellen mit 10 µM BrdU. Anschließend wurden die Zellsuspensionen gewonnen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1.200 Umdrehungen pro Minute, 4 °C, 6 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml 4 °C kaltem 1XPBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml unvergälltem 80 % Ethanol resuspendiert und die Zellen damit fixiert. In diesem Zustand konnte die Probe mehrere Tage bei 4 °C zwischengelagert werden, bevor sie dem weiteren Versuchsablauf zugeführt wurde.

Nach Abzentrifugieren wurde das Pellet in 2 ml RNase-Lösung gelöst, es erfolgte eine zehnminütige Inkubation der Lösung bei 37 °C im Wasserbad. Nach Zentrifugation und Resuspension des Pellets mit 2 ml 4 °C kalter Pepsin-Lösung wurde die Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C um 10 Minuten fortgesetzt, um die Proben dann für 5 Minuten in 4 °C kaltes Wasser zu stellen und 3 ml 4 °C kaltes 1XPBS hinzuzufügen. Die Pellets wurden nach erneuter Zentrifugation mit 2 ml 2 N HCl-Lösung versetzt und inkubierten 10 Minuten bei Raumtemperatur bevor 3 ml 1XPBS hinzupipettiert wurden. Es schlossen sich nun zwei Spülschritte mit jeweils Zentrifugation und Resuspension des Pellets in 4 ml 1XPBS zur Erreichung eines neutralen pH-Wertes an.

Zu den Proben wurden dann je 200 µl α-BrdU-Antikörper gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation erfolgte die Resuspension in 200 µl Rabbit-anti-Mouse-α-BrdU-Antikörper, der ebenfalls 30 Minuten inkubierte. Zentrifugation und Pelletresuspension in 500 µl PI-Färbelösung mit anschließender Inkubation unter Lichtausschluss komplettierten die Vorbereitung zur Probenmessung am Durchflußzytometer.

4.8.5. Ergebnisauswertung

Die Ergebnisauswertung erfolgte durch die spezielle FACSCaliburTM Computersoftware. Versuchs- und Gerätemessungenauigkeiten wurden durch präzises Arbeiten und dem Einsatz von Eich- und Kontrollflüssigkeiten minimiert. Alle voneinander unabhängigen

Versuche wurden am selben Tag gemessen, um ein Höchstmaß an Genauigkeit und Vergleichbarkeit zu erreichen.

4.9. Adhäsionsversuche

4.9.1. Bedeutung

Durch die Durchführung von Adhäsionsversuchen auf Substraten, die sich der in vivo Situation annähern, im Vergleich mit der Situation auf Polystyren können Erklärungsmodelle für besseres oder schlechteres Zellüberleben nach Bestrahlung gefunden werden, da die Adhäsion einen wichtigen Schlüsselpunkt für die Zytoskelettformation, Signaltransduktion und auch Zellüberlebensstrategien darstellt.

4.9.2. Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der PA-TU 8902-Zellen nach Transfektion wurde ein *Adhesion Assay* durchgeführt. Dazu wurden 96-Well-Platten mit Fibronectin, Kollagen Typ I oder Laminin beschichtet. Zum Vergleich dienten unbeschichtete Wells. Nach einstündiger Inkubation der Beschichtungsmedien bei Raumtemperatur wurden die Wells abpipettiert und mit je 100 µl BSA-Lösung versehen und für 1 Stunde in den Inkubator verbracht. Anschließend wurden die Wells mit serumfreiem Gebrauchsmittel vier Mal gewaschen, um dann mit 50.000 Zellen pro Well bestückt zu werden. Das Endvolumen pro Well betrug hierbei 200 µl. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde im Begasungsbrutschrank wurden die 96-Well-Platten mikroskopiert, um den Adhäsionsstatus festzustellen und somit spätere Beurteilungs- und Auswertungsfehler zu vermeiden. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten nun unter aseptischen Bedingungen. Mit der Wasserstrahlpumpe wurden nicht-adhärente Zellen vorsichtig entfernt. Die Wells wurden mit 1xPBS einmal gespült, bevor die Zellen mittels 100 µl/Well 70 %-Ethanol 10 Minuten lang einem Fixierschritt unterworfen wurden. Nach einem weiteren Spülschritt mit destilliertem Wasser erfolgte die Anfärbung der Zellen durch 100 µl/Well 1 % Methyleneblau mit einer Einwirkzeit von 1 Stunde. Durch nochmaliges Spülen mit destilliertem Wasser wurden überschüssige Farbreste entfernt. Die Zugabe von 100 µl 1N HCl in jedes Well mit fünfminütiger Inkubation und einminütiger mechanischer Irritation auf dem Rüttler führte zur Lyse der Zellen und dem Erhalt einer homogen blauen

Zellsuspension, deren Färbegrad direkt proportional zur vorherigen Zelldichte war. Mit der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 630 nm am Photometer wurde indirekt die Zellzahl der zuvor adhärenen Zellen bestimmt und graphisch vergleichend ausgewertet.

4.10. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Versuche wurden mindestens dreimal jeweils unabhängig voneinander wiederholt. Es wurden die Mittelwerte + / - Standardabweichung der jeweiligen Endergebnisse in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, die definitionsgemäß den Wert 1,0 hat, berechnet oder es wurde dieser Bezug prozentual beschrieben. In den Graphiken wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung entsprechend aufgetragen und in Form von Zellüberlebenskurven halblogarithmisch beziehungsweise in Balkenhistogrammen dargestellt. Zur statistischen Berechnung wurde der Student t-Test herangezogen. Dabei wurden die Ergebnisse dann als statistisch signifikant angesehen wurden, wenn P weniger als 0,05, und als statistisch hochsignifikant wenn P weniger als 0,01 betrug. Dabei ist P die Wahrscheinlichkeit des Fehlers 1. Art, also die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese zu verwerfen, obwohl diese richtig ist.

Als Grundlage zur Berechnung des **Mittelwertes** diente folgende Formel:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Abb. 10: Der Mittelwert, auch arithmetisches Mittel (\bar{X}) genannt, definiert sich als Summe aller Einzelwerte (X_i) geteilt durch die Anzahl der Einzelwerte (n).

Die **Standardabweichung** wurde folgendermaßen berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

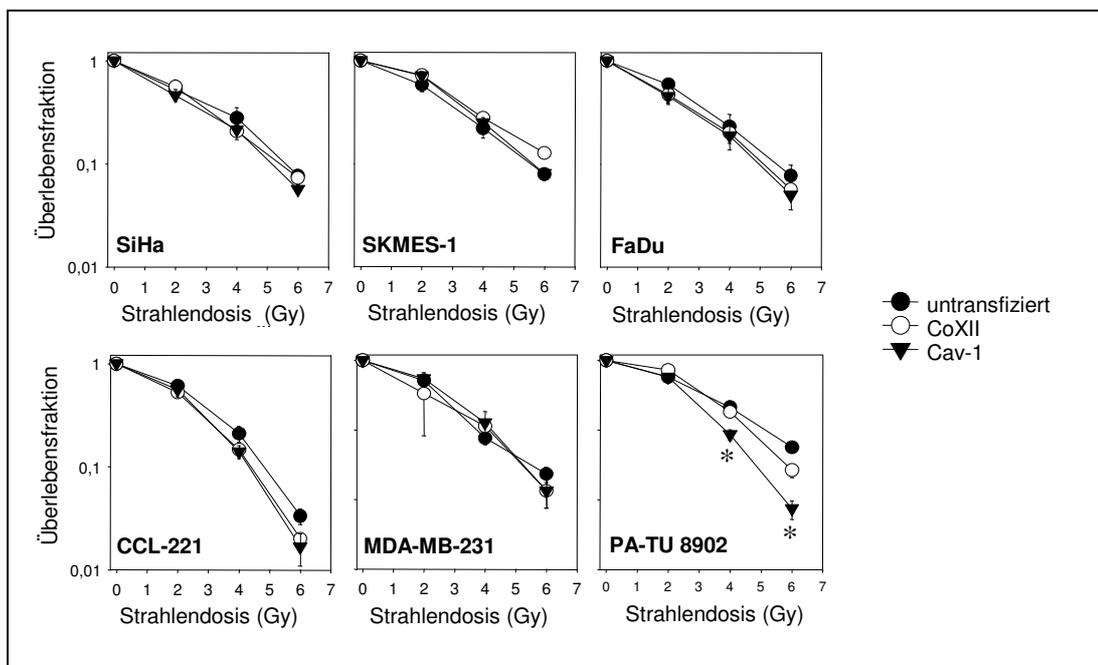
Abb. 11: Die Standardabweichung (σ) ist definiert als die positive Quadratwurzel aus der Summe aller Abweichungsquadrate ($X_i - \bar{X}$) geteilt durch die Anzahl aller Messwerte weniger 1 ($n-1$) [Harms, 1998, S.27/28].

V. Ergebnisse

5.1. Zellüberlebenskurven nach siRNA-Transfektion gegen Caveolin-1 und Bestrahlung verschiedener humaner Tumorzelllinien

Die humanen Tumorzelllinien U-138 MG, SiHa, SKMES-1, FaDu, CCL-221, MDA-MB-231 und PA-TU-8902 wurden mit siRNA gegen Caveolin-1 transfiziert, als Kontrollen dienten untransfizierte Zellen und mit Kontrollduplex CoXII transfizierte Zellen.

Das klonogene Überleben nach 0, 2, 4 und 6 Gy Bestrahlung wurde in Form der Zellüberlebenskurven in **Graphik 1** dargestellt, dabei wurde auf die Darstellung der Ergebnisse bezüglich der U-138 MG-Zellen verzichtet.



Graphik 1: Zellüberlebenskurven mit untransfizierten, mit Kontrollduplex CoXII transfizierten und mit Cav-1-siRNA transfizierten Zellen der unterschiedlichen Zelllinien (SiHa, SKMES-1, FaDu, CCL-221, MDA-MB-231 und PA-TU 8902). Aufgetragen ist die Überlebensfraktion logarithmisch in Abhängigkeit der Strahlendosis (ermittelt wurden die Überlebensfraktionen für 0, 2, 4 und 6 Gy) in linearer Einteilung. Mit „*“ markierte Daten zeigen einen signifikanten Unterschied, $P < 0,05$.

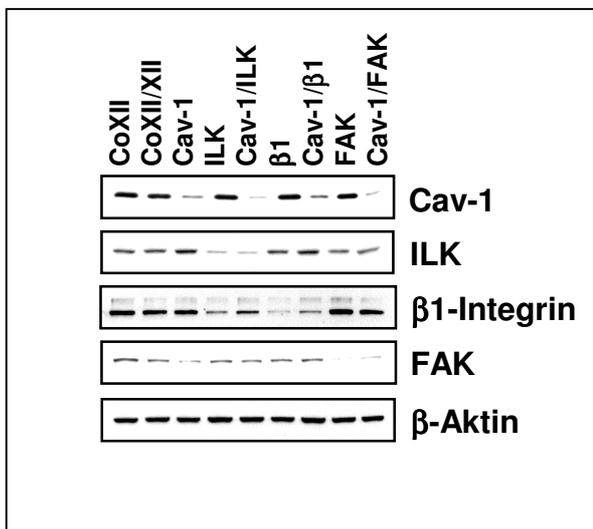
Bei den Zelllinien SiHa, SKMES-1, FaDu, CCL-221 und MDA-MB-231 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Zellüberleben zwischen den mit Caveolin-1-siRNA transfizierten Zellen, den mit CoXII-siRNA transfizierten Zellen und untransfizierten Zellen nach Bestrahlung von 2, 4 und 6 Gy.

Bei der humanen Tumorzelllinie PA-TU 8902 konnte sowohl bei 4, als auch bei 6 Gy ein signifikant ($P < 0,05$) schlechteres Überleben der Zellen nach Transfektion gegen Cav-1 im Vergleich mit untransfizierten und mit unspezifischer Kontrollduplex CoXII transfizierter Zellen festgestellt werden.

5.2. SiRNA-Transfektion gegen Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK und FAK an der Tumorzelllinie PA-TU 8902

5.2.1. Kontrollwesternblots

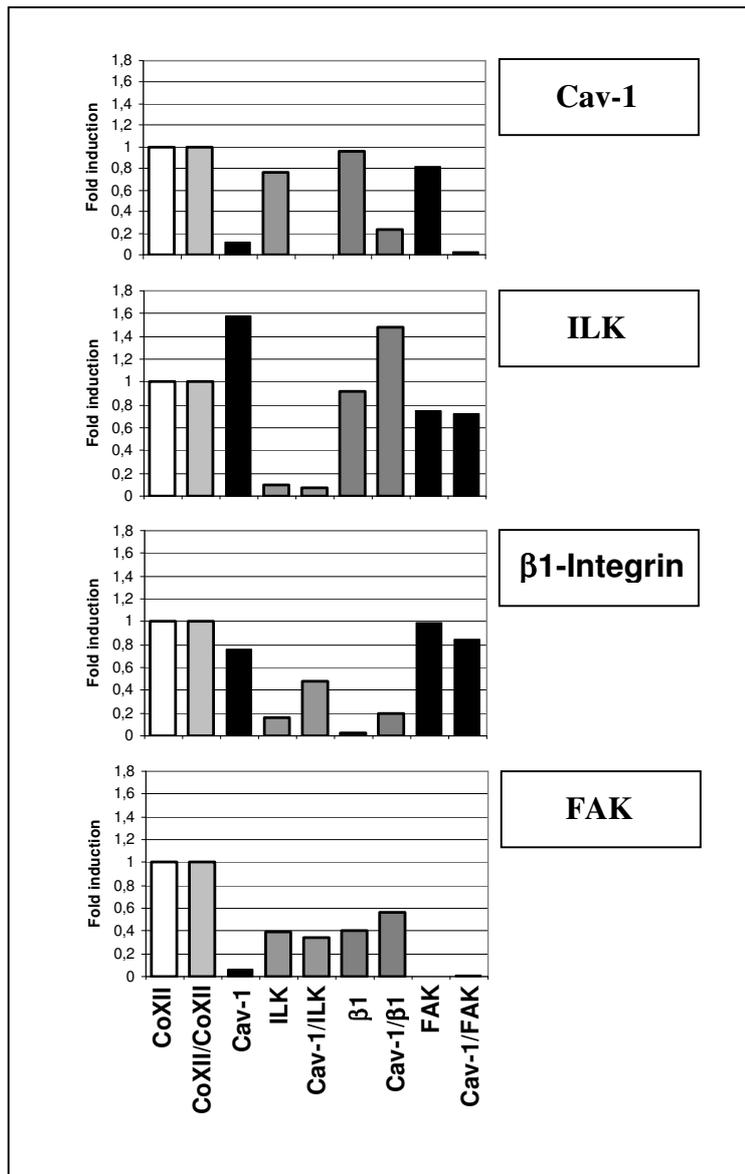
Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK konnten durch Transfektion jeweils um 80 % bis 95 % reduziert werden. Doppeltransfektionen erzielten Werte von 80 % bis 98 %, was durch densitometrische Auswertung der Banden ermittelt wurde. Die unspezifische Kontrollduplex CoXII bewirkte keine Reduktion der untersuchten Proteine, weder in der Einzel- noch in der Doppeltransfektion. Nachfolgende **Graphik 2** zeigt Proteinbanden eines ausgewählten Versuches, die selben Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt und hier nicht noch einmal zusätzlich aufgeführt.



Graphik 2: Banden nach Detektion der Proteine Cav-1, ILK, β 1-Integrin (β 1) und FAK zur Beurteilung der Transfektionseffizienz. Als Kontrolle zur Detektion gleicher Proteinmengen diente die β -Aktin-Bestimmung

Die Ergebnisse wurden anhand der densitometrischen Auswertung der einzelnen Banden objektiviert und zur Vereinfachung in Form von Histogrammen dargestellt. Dabei diente als Referenzpunkt immer die mit Kontrolle CoXII transfizierten Zellen, deren *Fold induction*, also deren Schwärzungsgrad der jeweiligen Banden, auf den Wert 1,0 festgelegt wurde.

Im folgenden sind die so ermittelten Histogramme dargestellt:



Graphik 3: Darstellung der *Fold induction* (Schwärzungsgrad der Banden) der einzelnen Transfektionen nach Normierung auf die jeweilige β -Aktin-Bande und in Bezug auf die Kontrollen CoXII und CoXII/CoXII, die nach Definition auf den Wert *Fold induction* 1,0 festgelegt wurden.

Nach effizienter Transfektion zeigte sich, neben spezifischer Proteinreduktion und sich neutral verhaltenden Kontrollen, eine deutliche Induktion der ILK-Expression nach Transfektion gegen Cav-1 und Cav-1/ $\beta 1$.

Gegen ILK einzeln oder in Kombination transfizierte PA-TU 8902 zeigten eine deutliche Reduktion von $\beta 1$ -Integrin. Bei Transfektion gegen ILK in Kombination mit Cav-1 auf 45 % des Ausgangswertes und bei Transfektion gegen ILK allein auf unter 20 % des Ausgangswertes.

Zusammenfassend führte demnach eine Reduktion von ILK auch zu einer Reduktion von β 1-Integrin und eine Reduktion von Cav-1/ β 1 zu einer Induktion von ILK.

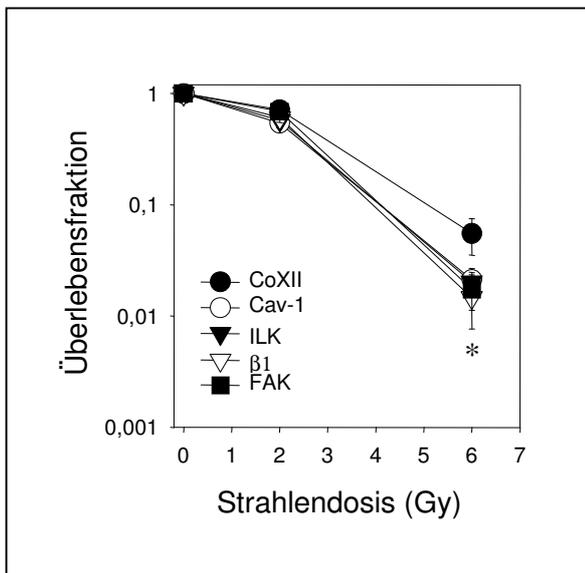
Übrige scheinbare Veränderungen in der Proteinreduktion zeigten sich als nicht deutlich und somit in unseren Augen als biologisch wirkungslos.

5.2.2. Zellüberlebenskurven nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy

Nach Transfektion gegen Cav-1, ILK, β 1-Integrin, FAK, Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK wurde das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy untersucht. Dabei betrug die Plattiereffizienz 88-100 %.

PA-TU 8902-Zellen zeigten nach Caveolin-1-Reduktion eine hochsignifikant ($P < 0,01$) höhere Strahlensensibilität nach Bestrahlung mit 6 Gy im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle CoXII. Auch nach Transfektion gegen ILK, β 1-Integrin und FAK zeigten PA-TU 8902 nach Bestrahlung von 6 Gy ein hochsignifikant ($P < 0,01$) schlechteres Überleben im Vergleich mit der Kontrolle CoXII.

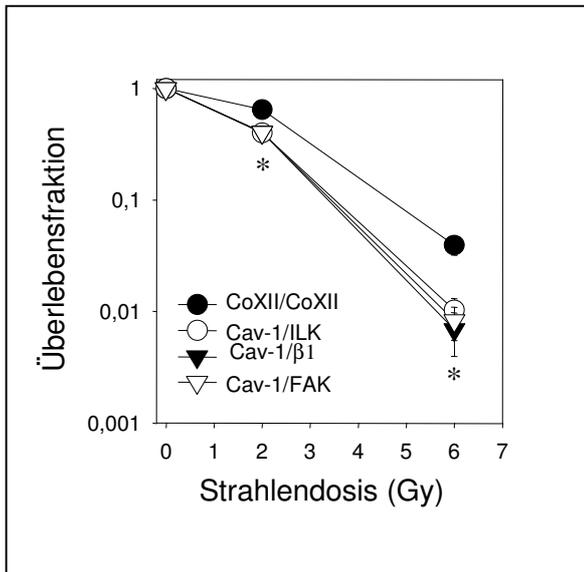
Untenstehende **Graphik 4** zeigt die Zellüberlebenskurven von PA-TU 8902 nach Transfektion gegen Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK und nach Bestrahlung mit 2 oder 6 Gy.



Graphik 4: Zellüberlebenskurven nach Transfektion von PA-TU 8902 gegen Cav-1, ILK, β 1-Integrin (β 1), FAK und unspezifische Kontrolle XII (CoXII). Signifikante Unterschiede im Zellüberleben nach Bestrahlung mit 6 Gy, * $P < 0,01$.

Doppeltransfektionen gegen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK führten zu einem signifikant ($P < 0,05$) schlechteren Überleben nach Bestrahlung von 2 und 6 Gy im Vergleich mit Kontrollen CoXII und CoXII/XII. Zudem zeigten Zellen, die gegen Cav-1 in Kombination mit ILK, β 1-Integrin oder FAK transfiziert wurden eine höhere

Strahlensensibilität und signifikant ($P < 0,05$) schlechteres Überleben nach 2 und 6 Gy Bestrahlung als Zellen, die jeweils nur gegen Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK einzeln transfiziert wurden. **Graphik 5** zeigt die Überlebenskurven der doppelt transfizierten PA-TU 8902-Zellen im Vergleich mit Kontrolle CoXII/XII transfizierter Zellen:



Graphik 5: Zellüberlebenskurven nach Doppeltransfektion von PA-TU 8902 gegen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1, Cav-1/FAK und unspezifische Kontrolle XII (CoXII/XII), * $P < 0,05$.

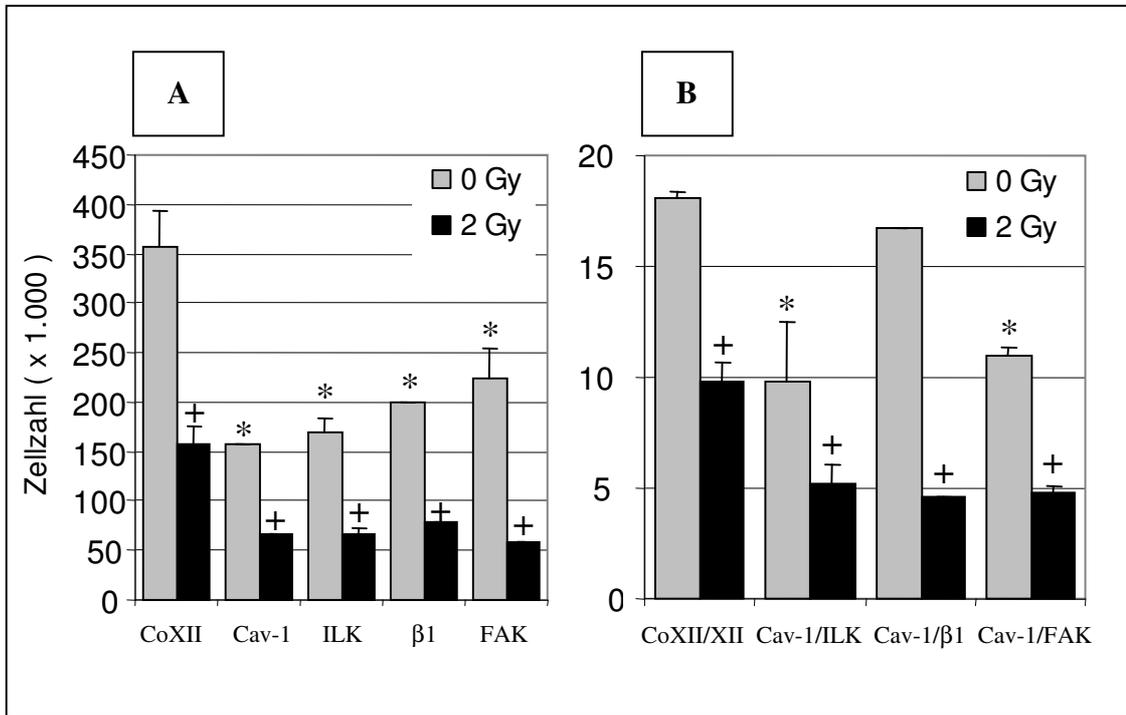
5.2.3. Zellwachstum nach Transfektion mit und ohne Bestrahlung von 2 Gy

Zur Untersuchung der Proliferation nach Transfektion wurden 24 Stunden nach Transfektion Zellen entsprechend ausgesät und nach weiteren 24 Stunden mit 2 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Entsprechend der Zeit der Zellüberlebenskurven wurde nach sieben Tagen die Zellzahl bestimmt.

Nach Reduktion von Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK zeigte sich hierbei eine hochsignifikante ($P < 0,01$) Verminderung der Zellzahl, damit also eine Einschränkung der Proliferation nach Transfektion im Vergleich mit Kontrolle CoXII transfizierten Zellen.

Eine Bestrahlung mit 2 Gy führte zu einer Suppression der Proliferation sowohl bei CoXII-transfizierten Zellen, als auch bei gegen Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK transfizierten Zellen. Die Zellzahl bei Kontrolle CoXII-transfizierten Zellen verringerte sich nach Bestrahlung mit 2 Gy um mehr als die Hälfte im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle. Der Unterschied in der Zellzahl zwischen mit 2 Gy bestrahlter CoXII und bestrahlten gegen Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK transfizierter Zellen zeigte sich jedoch als signifikant ($P < 0,05$) größer als der Unterschied zwischen transfizierten Zellen im Vergleich mit der Kontrolle ohne Bestrahlung, so dass eine Bestrahlung mit 2 Gy die Proliferation noch einmal um den Faktor zwei bis drei verringerte. Dies wird in **Graphik 6**

A in einer Darstellung als Histogramm verdeutlicht. In der Graphik 6 grau unterlegt sind die unbestrahlten transfizierten Zellen, schwarz unterlegte Balken gehören zu den mit 2 Gy bestrahlten Zellen. Auf der y-Achse wurde die absolute Zellzahl aufgetragen, auf der x-Achse sind die einzelnen Transfektionsbedingungen aufgeführt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.



Graphik 6: Zellzahlermittlung nach einfacher (A) oder doppelter Transfektion (B) mit entsprechenden Kontrollen und Bestrahlung mit 2 Gy (schwarz unterlegt) oder keiner Bestrahlung (grau unterlegt). Darstellung in Form von Histogrammen mit Standardabweichung als Fehlerbalken, auf der linearen y-Achse sind die absoluten Zellzahlen dargestellt, eine unterschiedliche Einteilung der y-Achse zwischen Abbildung A und B ist zu beachten. * Vergleich der unbestrahlten Zellen nach Transfektion, Signifikanzniveau jeweils $P < 0,01$; + Vergleich der bestrahlten Zellen nach Transfektion, Signifikanzniveau jeweils $P < 0,05$.

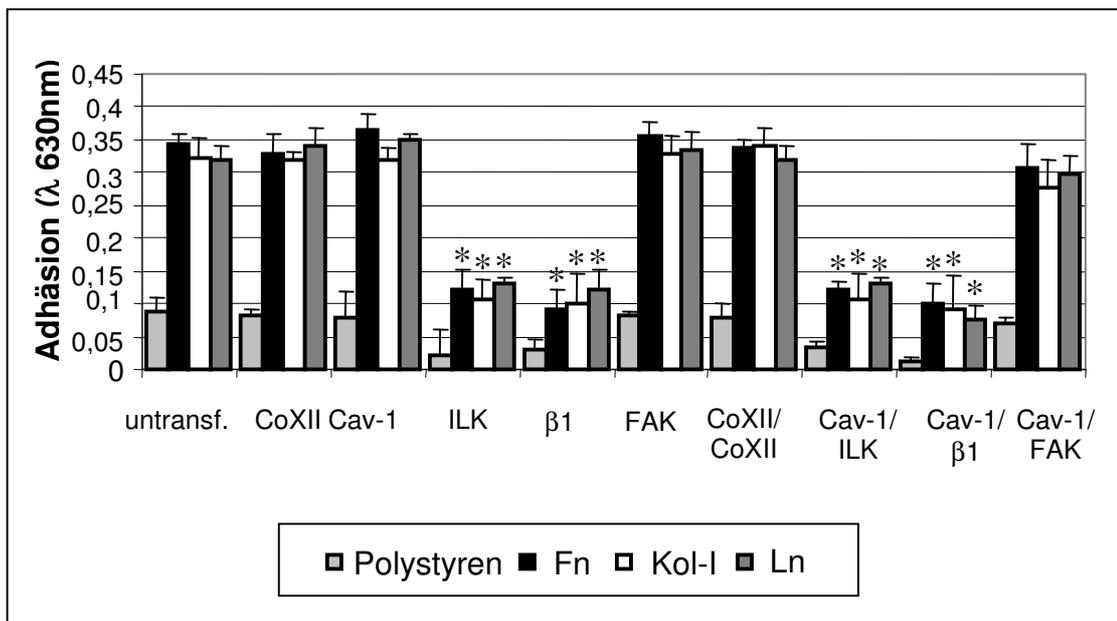
Doppelte Transfektion von PA-TU 8902 zeigte eine deutlich verringerte Zellzahl, betrachtet man CoXII unbestrahlt und CoXII/XII unbestrahlt, so zeigte sich eine Reduktion der Zellzahl aufgrund der Doppeltransfektion auf etwa 5 %, wie in **Graphik 6 B** dargestellt. Es konnte eine davon unabhängige hochsignifikante ($P < 0,01$) Verringerung der Proliferation der mit Cav-1/ILK und Cav-1/FAK transfizierten Zellen im Verhältnis zu CoXII/XII gezeigt werden. Eine Bestrahlung mit 2 Gy ergab eine vergleichbare für alle drei Doppeltransfektionen signifikante ($P < 0,05$) Suppression der Proliferation im Vergleich mit Kontrolle CoXII/XII.

PA-TU 8902-Zellen, die gegen Cav-1/ β 1 transfiziert wurden, zeigten keine Verringerung der Zellzahl in der unbestrahlten Versuchssituation.

Reduktion der Proteine Cav-1, ILK, β 1-Integrin und FAK führten zu einer signifikant erhöhten Radiosensitivität ($P < 0,05$), wobei eine Zunahme des Effekts, mit Ausnahme der Transfektion gegen Cav-1/ β 1, bei den Doppeltransfektionen zu verzeichnen war, und Inhibierung der Zellproliferation, sowohl in der bestrahlten, als auch in der unbestrahlten Versuchssituation.

5.2.4. Adhäsionsversuche auf Polystyren und auf Proteinen der extrazellulären Matrix

Humane PA-TU 8902 wurden nach Transfektion bezüglich ihres unterschiedlichen Adhäsionsverhaltens auf verschiedenen Oberflächen analysiert. Dabei wurde Zellkulturplastik mit Polystyrenoberfläche (Polystyren) direkt oder beschichtet mit Fibronektin (Fn), Kollagen Typ I (Kol-I) oder Laminin (Ln) verwendet. Nachfolgende **Graphik 7** veranschaulicht die ermittelten Ergebnisse:



Graphik 7: Darstellung der Lichtabsorption der verschiedenen Zelllysate der unterschiedlichen Transfektionsbedingungen (untransfizierte Zellen, mit CoXII, Cav-1, ILK, β 1, FAK, CoXII/CoXII, Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK transfizierte Zellen) als Korrelat der jeweiligen Menge adhärenter Zellen gemessen im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630$ nm. * Vergleich der Adhäsion einfach oder doppelt transfizierter Zellen mit den entsprechenden Kontrollen CoXII und CoXII/CoXII, $P < 0,05$.

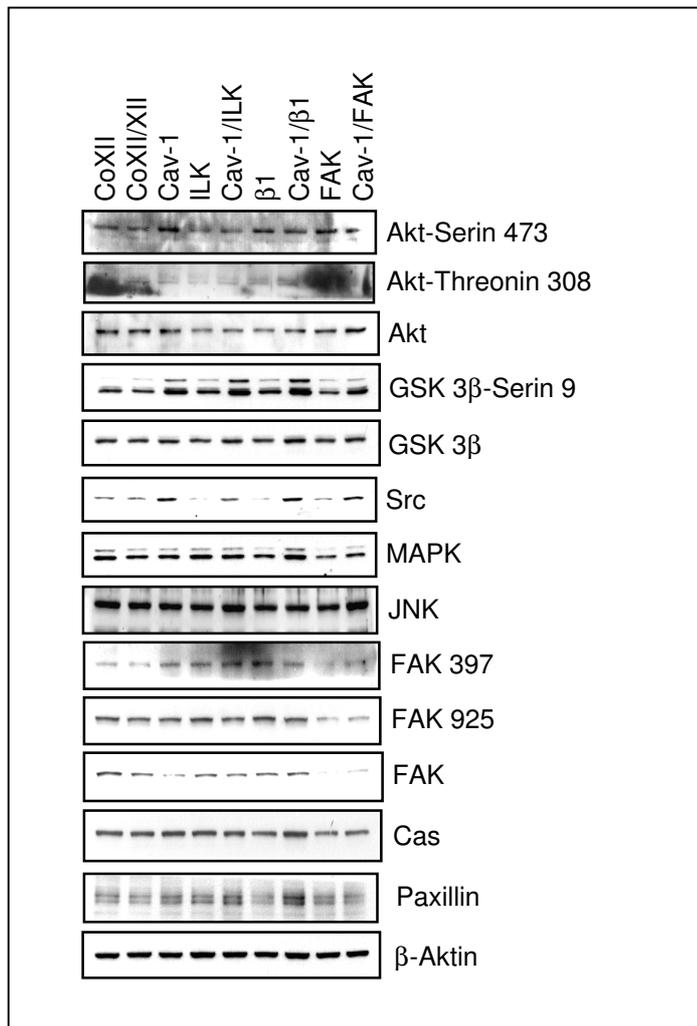
Insgesamt zeigte sich eine deutlich bessere Adhäsion der Zellen aller Versuchsbedingungen auf den Proteinen der extrazellulären Matrix, Fibronectin, Kollagen Typ I und Laminin, im Gegensatz zur Polystyrenoberfläche. Im Vergleich der Adhäsion der Zellen auf Fn, Kol-I und Ln untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Untransfizierte PA-TU 8902, mit CoXII transfizierte und mit CoXII/XII transfizierte PA-TU 8902 zeigten das gleiche Adhäsionsmuster auf den unterschiedlichen Oberflächen. Damit kongruent war auch das Adhäsionsverhalten der gegen Cav-1, FAK und Cav-1/FAK transfizierten Zellen. Ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) im Sinne eines deutlich schlechteren Adhäsionsverhaltens konnte in den ILK, $\beta 1$, Cav-1/ILK und Cav-1/ $\beta 1$ Knockdown Zellen detektiert werden, wobei diese vier Transfektionsbedingungen untereinander keine Unterschiede im Adhäsionsmuster aufwiesen.

Zusammenfassend führte die Transfektion gegen ILK und $\beta 1$ -Integrin zu einem signifikant schlechteren Adhäsionsverhalten der PA-TU 8902-Zellen sowohl auf Polystyren als auch auf den Proteinen der extrazellulären Matrix.

5.2.5. Nachweis ausgewählter Proteine nach Transfektion

Achtundvierzig Stunden nach siRNA-Transfektion der PA-TU 8902 Zellen gegen Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK, FAK und in den Kombinationen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK erfolgte der Nachweis ausgewählter Proteine. AKT-Serin 473, AKT-Threonin 308, AKT, GSK 3 β -Serin 9, GSK 3 β , Src, MAPK, JNK, FAK 379, FAK 925, FAK, Cas und Paxillin wurden detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Proteinbanden eines ausgewählten Experiments sind exemplarisch dargestellt:



Graphik 8: Banden nach Detektion der Proteine AKT-Serin 473, AKT-Threonin 308, AKT, GSK 3 β -Serin 9, GSK 3 β , Src, MAPK, JNK, FAK 379, FAK 925, FAK, Cas und Paxillin 48 Stunden nach siRNA-Transfektion der PA-TU 8902 Zellen gegen Cav-1, β 1-Integrin, ILK, FAK und in den Kombinationen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK. Als Kontrolle zur Detektion gleicher Proteinmengen diente die β -Aktin-Bestimmung.

Die Expression der Gesamtproteine **Akt**, **GSK 3 β** und **JNK** blieb durch erfolgte Transfektion der PA-TU 8902 gegen Cav-1, β 1-Integrin, ILK, FAK und in den Kombinationen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK unbeeinflusst. Wohingegen sich Unterschiede im Phosphorylierungsgrad dieser Proteine nach Transfektion zeigten. So wurde die Phosphorylierung von **Akt** an **Serin 473** nach Reduktion von Cav-1, β 1-Integrin, FAK und β 1-Integrin in Kombination mit Cav-1 deutlich induziert. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung von **Akt** an **Threonin 308**. Nach Transfektion gegen Cav-1, Cav-1/ILK und Cav-1/ β 1 fand sich eine eindeutige Zunahme der Phosphorylierung von **GSK 3 β** an **Serin 9**.

Auch im Hinblick auf **Cas** ergaben sich keine Unterschiede in der Expression des Gesamtproteins nach Transfektion, darüber hinaus wurde der Phosphorylierungszustand von Cas im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Expression von **Src** wurde durch die Transfektionsbedingungen Cav-1, Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK induziert. Eine Reduktion der Expression der **MAPK** konnte hingegen nach Transfektion gegen FAK und Cav-1/FAK beobachtet werden. Die Menge an **Paxillin** war nach Transfektion gegen Cav-1/ β 1 und Cav-1/ILK deutlich erhöht.

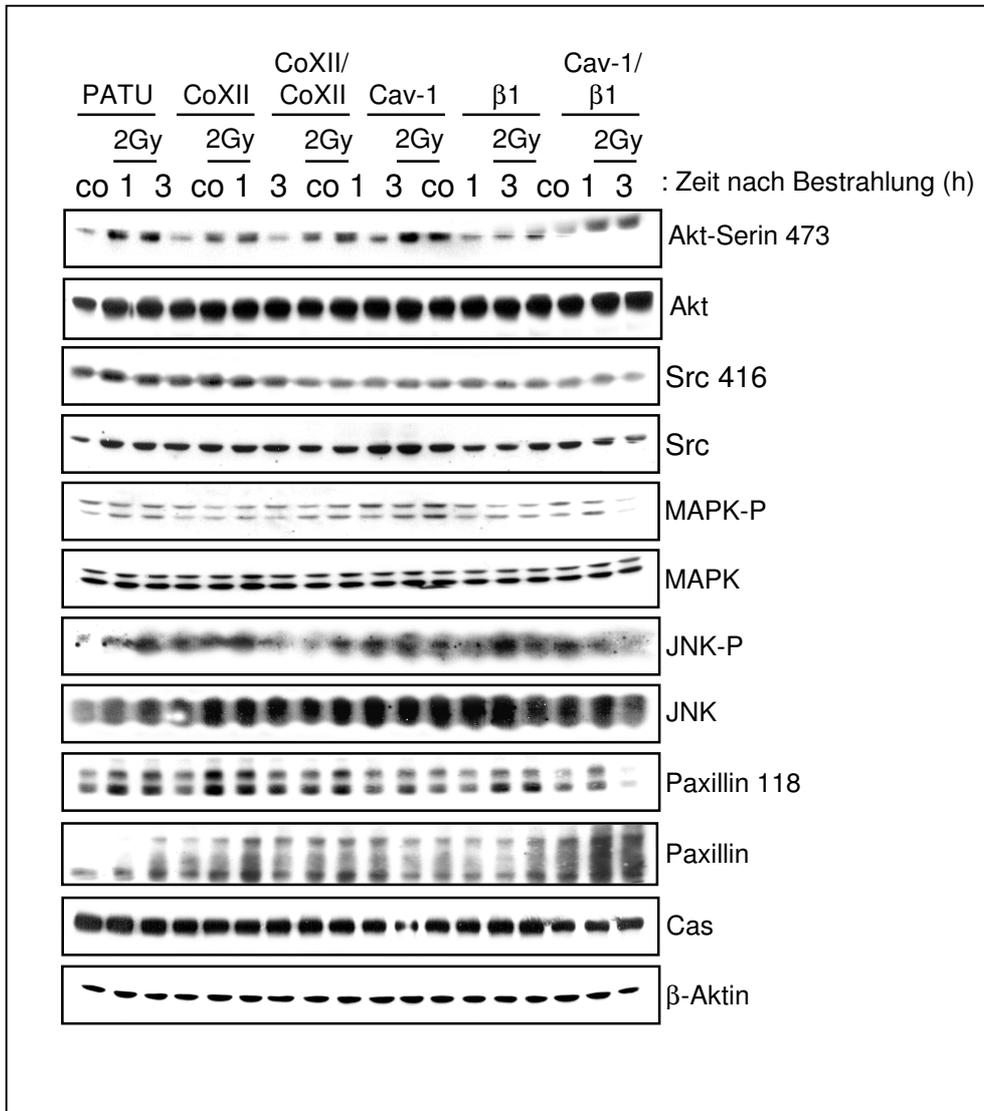
Betrachtet man die Expression und den Phosphorylierungsgrad der **FAK**, zeigte sich auch hier nach Transfektion gegen FAK oder gegen FAK in Kombination mit Caveolin-1 eine deutliche Reduktion der Expression von FAK entsprechend einer hohen Transfektionseffizienz, dementsprechend zeigte sich auch eine Reduktion des Anteils der phosphorylierten Formen der FAK, **FAK 379** und **FAK 925**. Darüberhinaus ergaben sich keine Änderungen nach Transfektion bezüglich FAK im Hinblick auf die anderen Transfektionsbedingungen.

Die Phosphorylierung von JNK, MAPK, Paxillin und Src wurde nach Transfektion gegen Cav-1, β 1 und in Kombination mit und ohne Bestrahlung von 2 Gy untersucht und soll im folgenden Kapitel besprochen werden.

5.2.6. Nachweis ausgewählter Proteine nach Transfektion gegen Caveolin-1 und β 1-Integrin 1 und 3 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy

Humane PA-TU 8902-Zellen wurden mit siRNA gegen Cav-1, β 1 und Cav-1/ β 1 transfiziert. Als Kontrollen dienten untransfizierte Zellen und mit CoXII beziehungsweise CoXII/XII transfizierte Zellen. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion erfolgte die Proteinextraktion für den Vergleichswert bei 0 Stunden und 0 Gy, mit „Co“ bezeichnet,

gleichzeitig erfolgte die Bestrahlung entsprechender Proben mit 2 Gy, Proteinextraktionen folgten nach 1 und 3 Stunden nach Bestrahlung.



Graphik 9: Banden nach Detektion der Proteine Akt-Serin 473, Akt, Src 416, Src, MAPK-P, MAPK, JNK-P, JNK, Paxillin 118, Paxillin und Cas nach siRNA-Transfektion der PA-TU 8902-Zellen gegen Cav-1, β 1-Integrin und in Kombination und nach Bestrahlung der transfizierten Zellen mit 2 Gy. Als Kontrollen dienten untransfizierte PA-TU 8902 mit Kontroll-Duplex XII einfach (CoXII) und doppelt (CoXII/XII) transfizierte Zellen. Untersucht wurden die Zellen ohne Bestrahlung („CO“) oder 1h oder 3h nach Bestrahlung mit 2 Gy. Als Kontrolle zur Detektion gleicher Proteinmengen diente die β -Aktin-Bestimmung.

Es bestätigte sich in diesem Versuch, dass die Expression von **Akt** durch Transfektion nicht beeinflusst wurde. Die Phosphorylierung der **Akt** an **Serin 473** wurde durch Transfektion gegen Cav-1, β 1 und Cav-1/ β 1 induziert. Darüberhinaus zeigte sich eine Zunahme der Phosphorylierung eine und drei Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy

unabhängig vom Ausgangszustand und Transfektionsbedingung. Bestrahlung induziert damit die Phosphorylierung von Akt an Serin 473.

Die Bestrahlung mit 2 Gy hatte eine und drei Stunden später keinen erkennbaren Einfluss auf den Expressionsgrad oder Phosphorylierungsstatus von **Src** und **Src 416**.

Im Hinblick auf **MAPK** zeigten sich keine Veränderungen nach Bestrahlung bezüglich der Expression des Gesamtproteins. Darüberhinaus zeigte sich eine Induktion der Phosphorylierung der MAPK nach Transfektion der PA-TU 8902 gegen Cav-1, Cav-1/ β 1 und β 1. Nach Bestrahlung mit 2 Gy nahm der Grad der Phosphorylierung bei mit Caveolin-1-siRNA transfizierten Zellen im Zeitverlauf zu. Wohingegen der Phosphorylierungsgrad bei gegen β 1-Integrin transfizierten PA-TU 8902 nach Bestrahlung in dem detektierten Zeitraum konstant blieb und die Phosphorylierung bei gegen Cav-1/ β 1 transfizierten Zellen drei Stunden nach Bestrahlung von dem anfangs nach Transfektion erhöhten Ausgangswert auf einen deutlich geringeren Wert abfiel.

Expression und Phosphorylierungsgrad der **JNK** zeigten keine Veränderung nach Transfektion, beziehungsweise nach Bestrahlung.

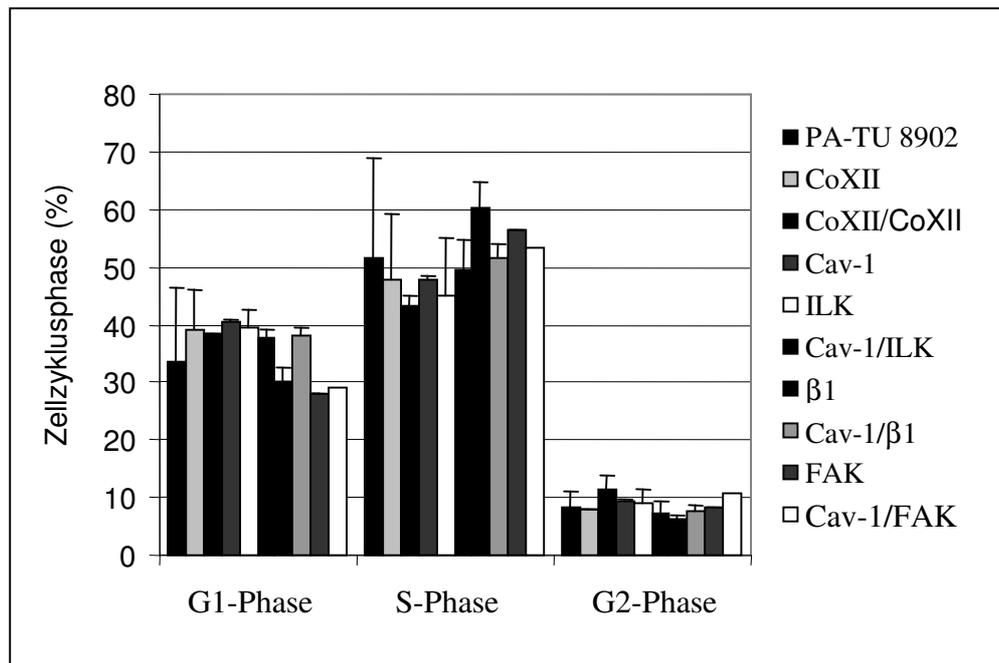
Nach Transfektion gegen Cav-1/ β 1 konnte auch in diesem Versuch eine Induktion der Expression von **Paxillin** gezeigt werden. Zudem zeigte sich eine Zunahme der Phosphorylierung von **Paxillin 118** eine Stunde nach Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy. Dieser Grad der Phosphorylierung wurde bis auf gegen Cav-1/ β 1 transfizierter Zellen auch zum Zeitpunkt drei Stunden nach Bestrahlung beibehalten. Transfektion gegen Caveolin-1 und β 1-Integrin in Kombination führte drei Stunden nach Bestrahlung nach anfänglicher Induktion der Phosphorylierung zu einem deutlichen Abfall derselben.

Die Expression der **Cas** blieb sowohl nach Transfektion, als auch nach Bestrahlung mit 2 Gy unbeeinflusst.

5.2.7. Zellzyklusanalyse

Um den Einfluss der Proteinreduktion auf den Zellzyklus zu ermitteln, erfolgte 48 Stunden nach Transfektion die Analyse der Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Dabei zeigte sich nach Transfektion gegen β 1-Integrin oder FAK eine deutliche Zunahme der PA-TU 8902, die sich in der S-Phase befinden im Vergleich zu mit CoXII transfizierten Zellen. Darüberhinaus konnten keine signifikanten Unterschiede erhoben werden. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Auswirkungen der

Transfektion gegen die unterschiedlichen Proteine nicht durch eine Umverteilung der Zellen im Zellzyklus erklärt werden können.



Graphik 10: Die Graphik beschreibt den prozentualen Anteil der PA-TU 8902-Zellen nach Transfektion gegen Cav-1, β 1-Integrin, ILK, FAK und in den Kombinationen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK. Als Kontrollen dienten untransfizierte, mit CoXII transfizierte und mit CoXII/XII transfizierte PA-TU 8902-Zellen. Dabei ist der Anteil der Zellen in Prozent linear auf der y-Achse aufgetragen, die jeweilige Phase des Zellzyklus (G1- S- und G2- Phase) in Form von Balkenhistogrammen auf der x-Achse. Mittelwert +/- Standardabweichung.

VI. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Caveolin-1 für die Strahlensensibilität von humanen Karzinomzelllinien untersucht. Dazu wurden humane Tumorzellen unterschiedlicher und durch ihre Tumorinzidenz relevanter Tumorentitäten verwendet, um der Thematik durch einen möglichst breitgefächerten Zugangsweg gerecht zu werden. Es wurden Zellen eines kolorektalen Karzinoms (CCL-221), Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231), Zervixkarzinomzellen (SiHa), Hypopharynxkarzinomzellen (FaDu), Bronchialkarzinomzellen (SKMES-1), Glioblastomzellen (U-138 MG) und humane Pankreaskarzinomzellen (PA-TU 8902) verwendet. Alle Zelllinien wurden nach siRNA-Transfektion gegen Caveolin-1 auf ihre Strahlensensibilität untersucht. Dabei zeigte sich alleine bei der Zelllinie PA-TU 8902 ein signifikant schlechteres Überleben nach Caveolin-1-Reduktion. Bei allen anderen oben genannten Zelllinien konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Dies führt zu der Annahme, dass Caveolin-1 in unterschiedlichen Tumorzellen unterschiedliche Funktionen ausübt, beziehungsweise eine unterschiedliche Bedeutung für die Strahlenresistenz der Zellen hat. Auch Sunaga et al (2004) konnte eine unterschiedliche Bedeutung von Caveolin-1 in verschiedenen Bronchialkarzinomtypen feststellen. Caveolin-1 zeigte bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen eine wichtige Rolle für das Zellüberleben und Zellwachstum, wohingegen bei Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine Caveolin-1-Induktion zu einer Suppression der Koloniebildung führte, also eine scheinbar gegenteilige Rolle spielte. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich keine Veränderung des Überlebens von SKMES-1-Bronchialkarzinomzellen nach Caveolin-1-Knockdown und Bestrahlung. Obwohl es sich bei SKMES-1 um Zellen eines nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms handelt, konnte hier kein Überlebensnachteil der Zellen nach Caveolin-1-siRNA-Transfektion festgestellt werden. Auch in Fibroblasten der Linie NIH 3T3 konnte eine Korrelation zwischen Caveolin-1-Expimierung und Wachstumsinhibierung festgestellt werden [Lee et al, 1998]. Für weiterführende Versuche zur Klärung der Rolle von Caveolin-1 im Hinblick auf die zelluläre Strahlenantwort wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zelllinie PA-TU 8902 in den Fokus gerückt, da das signifikant schlechtere Überleben dieser Zellen nach Caveolin-1-Reduktion vermuten ließ, dass Caveolin-1 in dieser Zelllinie eine ganz entscheidende Rolle in Bezug auf die Strahlenempfindlichkeit spielt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass eine Reduktion von Caveolin-1 durch Verwendung spezifischer Caveolin-1-siRNA in Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie PA-

TU 8902 zu einer erhöhten Radiosensibilität dieser Karzinomzellen führt. In weiterführenden, nicht Teil dieser Arbeit darstellenden Experimenten, konnte dieser Effekt auch für Pankreaskarzinomzellen der Zelllinien MiaPaCa2 und Panc1 gezeigt werden [Cordes et al, 2007]. Der Effekt der erhöhten Strahlensensibilität nach Reduktion von Caveolin-1 könnte darauf beruhen, dass Caveolin-1 als regulatorisches Protein in die Signaltransduktion eingreift und mit fokalen Adhäsionsproteinen interagiert. In diesem Sinne scheint Caveolin-1 eine wichtige Rolle für die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung zu spielen.

Durch die erfolgreich angewandte Methode der siRNA-Transfektion ist es in dieser Arbeit gelungen, sowohl die Expression von Caveolin-1, als auch von β 1-Integrin, ILK und FAK, einzeln und in Kombination in humanen Pankreaskarzinomzellen temporär zu reduzieren und damit eine Möglichkeit zu schaffen, die Rolle von Caveolin-1 alleine und im Zusammenspiel mit vermuteten Interaktionspartnern im Hinblick auf klonogenes Überleben nach Bestrahlung, Proliferation und zytoplasmatische Signaltransduktion zu untersuchen.

Die Wichtigkeit von Caveolin-1 in der Rolle als Signalmodulator und Verbindungsprotein zu weiteren fokalen Adhäsionsproteinen für die Zelladhäsions-modulierte Strahlenresistenz [Cordes, Meineke, 2003] von PA-TU 8902-Zellen konnte durch die signifikante Abnahme des klonogenen Überlebens nach siRNA-vermittelter Caveolin-1-Reduktion gezeigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Daten von Caveolin-1-defizienten Mäusen überein, die nach Bestrahlung mit 15 Gy ein schlechteres Überleben als Wildtyp-Mäuse zeigten [Li et al, 2005]. Dass die Funktion von Caveolin-1 wesentlich komplexer sein muss und sich nicht nur auf die Modulation der Radiosensibilität beschränkt, wird anhand von Caveolin-1 (-/-)-Mäusen deutlich, die eine signifikant kürzere Lebensspanne aufweisen als Caveolin-1 (+/-)-Mäuse, oder Caveolin-1 (+/+)-Mäuse [Park et al, 2003].

Bei der Betrachtung des klonogenen Überlebens nach 6 Gy in den Doppelknockdown Zellen konnte eine weitere Zunahme der Radiosensibilisierung im Vergleich mit einfachem Knockdown beobachtet werden, wobei dieser Effekt weder additiven noch synergistischen Charakter aufwies und lediglich minimal ausgeprägt war. Das führt zu der Annahme, dass Caveolin-1, ILK, β 1-Integrin und FAK zum Teil in gemeinsamen Signaltransduktionswegen liegen, beziehungsweise wechselseitig abhängige Komplexe bilden, deren Teilnehmern eine unterschiedlich gewichtete Funktion zukommt. β 1-Integrin scheint mit Caveolin-1 eine Einheit bilden zu können, die auch FAK unter bestimmten Voraussetzungen binden kann [Cherubini et al, 2005], ein Assoziationsverlust von

Caveolin-1 und β 1-Integrin scheint zu einem Verlust der ligandeninduzierten Phosphorylierung der FAK zu führen [Chapman et al, 1999]. Auch Caveolin-1 und ILK, die eine Caveolin-1-bindende Domäne aufweist, bilden regulatorische Komplexe [Meyer et al, 2004]. Caveolin-1 wurde darüber hinaus als wichtig für die Bildung von stabilen uPAR-Integrin-Komplexen und für die β 1-Integrin-abhängige Fibronectinadhäsion und Aktivierung der FAK beschrieben [Wie et al, 1999]. Bemerkenswert an der oben erwähnten Studie von Park et al (2003) ist, dass nur ein komplettes Fehlen von Caveolin-1 zu einer verkürzten Lebensspanne von Mäusen führte, nicht jedoch bei Caveolin-1 (+/-)-Mäusen, die sich wie die Caveolin-1 (+/+)-Mäuse verhielten. Dies unterstützt die Annahme, dass Wirkmechanismen von Caveolin-1 zum Teil durch andere Signaltransduktionskomponenten kompensiert werden können.

Betrachtet man nun den additiven Effekt der Doppeltransfektionen der PA-TU 8902 bei 2 Gy Bestrahlung, könnte die Zunahme der Radiosensitivität durch eine Änderung der Zellmembrankonfiguration und Caveolaeformation mit nachfolgend anderer Zusammensetzung von membranständigen Signaltransduktionsmolekülen und Unterbrechung der Signaltransduktionskette erklärt werden. Zum anderen könnte auch eine durch β 1-Integrin oder FAK getriggerte Reduktion der Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Interaktionen nach erfolgter Doppeltransfektion vermehrt zur Anoikis, Zelltod durch Verlust der Zell-Matrix-Interaktion, führen. Darüberhinaus wurde durch Ravid et al (2005) bereits beschrieben, dass Caveolin-1 Anoikis unter anderem durch Hochregulation des IGF-I-Rezeptors verhindern kann, so dass unter Umständen diese Möglichkeit der Regulation nach zusätzlicher Reduktion von ILK, β 1-Integrin und FAK komplett zum Erliegen kommt und so zu einer erhöhten Radiosensibilität führt.

Warum sich ein scheinbar additiver Effekt nach 2 Gy Bestrahlung nach Doppeltransfektion zeigt, der sich nach 6 Gy Bestrahlung nicht signifikant zeigen lässt, konnte auf der Basis der erhobenen Daten nicht zufriedenstellend geklärt werden und lässt ebenfalls ein komplexes Modell für die Interaktionen von Caveolin-1, ILK, β 1-Integrin und FAK vermuten, das weitere, auch komplexere Experimente, zur Klärung erfordert.

Dass Caveolin-1 eine ausschlaggebende Rolle in der Vermittlung der zellulären Strahlenempfindlichkeit spielt, konnte in weiterführenden Versuchen bestätigt werden. So zeigten Pankreaskarzinomzellen der Linien PA-TU 8902, MiaPaCa2 und Panc1 12 und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy eine deutliche Induktion der Caveolin-1-Expression und vermehrte Ausbildung von Caveolae [Cordes et al, 2007]. Dies konnte auch in bestrahlten Glioblastomzellen gezeigt werden, die nach Radiotherapie eine erhöhte

Caveolin-1-Expression und Erhöhung der Blutgefäßneubildung aufwiesen [Regina et al, 2004]. Zudem führte eine Caveolin-1-Überexpression in PA-TU 8902- und MiaPaCa2-Zellen zu einer signifikant höheren Strahlenresistenz der Zellen [Cordes et al, 2007]. Eine Cholesterolfremdung mittels β -Cyclodextrin, was zu einem Funktionsverlust und Zerstörung der vor allem durch Caveolin-1 gebildeten cholesterolreichen Caveolae führt [Thorn et al, 2003; Elliott et al, 2003], hatte ebenfalls eine Erhöhung der Radiosensitivität der PA-TU 8902, MiaPaCa2 und Panc1 zur Folge [Cordes et al, 2007]. Dabei konnte durch Analyse der mRNA-Expression auch gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig von dem ursprünglichen Expressionsgehalt von Caveolin-1 einer Zelllinie ist [Cordes et al, 2007]. In Anlehnung an eine niedrigere Strahlenempfindlichkeit Caveolin-1 exprimierender Zellen, ist zu erwähnen, dass Lavie et al (1998) den Zusammenhang zwischen erhöhter Caveolin-1-Expression und *multi-drug* Resistenz bei Tumorzellen zeigte. Mit erhöhter Caveolin-1-Expression konnte hier eine höhere Dichte an ausgebildeten Caveolae festgestellt werden.

Aber auch Reduktion von β 1-Integrin, ILK und FAK führten jeweils zu einer Verringerung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung. Dieser Effekt zeigte sich als signifikant nach 6 Gy Bestrahlung, bei 2 Gy konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Dieser demarkierte sich erst unter Doppeltransfektion mit zusätzlicher Ausschaltung des Caveolin-1. Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Einzeltransfektionen hinsichtlich des Überlebens nach Bestrahlung feststellbar. Auch diese Tatsache lässt vermuten, dass es sich um eine signalmodulierende wechselseitig interagierende komplexbildende Ansammlung von Proteinen an der Zellmembran handelt. Duxbury et al konnte durch siRNA-vermittelte Reduktion der FAK (2003) und Reduktion der ILK (2005) in Adenokarzinomzellen des Pankreas zeigen, dass sowohl eine Reduktion der FAK, als auch der ILK zu einer erhöhten Chemosensibilität gegenüber Gemcitabin führt. Darüberhinaus zeigte eine Studie an humanen Brustkrebszellen zum einen, dass eine Transfektion gegen ILK Anoikis-resistente Zellen Anoikis-sensibel werden ließ, zum anderen, im Umkehrschluss, führte eine Überexpression der ILK in Anoikis-sensiblen Tumorzellen zur Abnahme der Anoikis [Attwell et al, 2000]. Mit einer Zunahme der Anoikis bei gegen ILK transfizierten Zellen könnte das schlechtere Überleben dieser Zellen erklärt werden. Konträr dazu stehen Ergebnisse von Cordes et al (2004), wo eine Überexpression der ILK zu einer größeren Strahlenempfindlichkeit der Zellen und damit zu einem schlechteren Überleben führte. Letztendlich ist sowohl ein Knockdown, als auch eine Überexpression ein *in vitro* Hilfsmittel um die realen Mechanismen bei

Normalexpression des Proteins zu erforschen. Im Falle der ILK könnte sowohl der Knockdown als auch die Überexpression zu einer höheren Strahlenempfindlichkeit führen, jeweils getriggert über unterschiedliche Mechanismen.

Durch eine Aktivierung des Akt-Signalweges wurde in HL-60-Zellen nach FAK-Überexpression eine Verhinderung der Apoptose nach Bestrahlung verzeichnet [Kasahara et al, 2002], so dass FAK-Überexpression zur erhöhten Radioresistenz von HL-60 führte. Im Umkehrschluss führte in vorliegender Arbeit die Reduktion der FAK zu einer Erhöhung der Strahlensensibilität mit nachfolgend schlechterem klonogenen Überleben der PA-TU 8902. Dieses Phänomen zeigte sich trotz strahleninduzierter Phosphorylierung der AKT an Serin 473.

Neben dem Zellüberleben hat eine Bestrahlung auch erheblichen Einfluss auf die Zellproliferation [Iliakis, G., 1997]. Caveolin-1 (-/-)-Mausmodelle zeigten, dass Caveolin-1-Expression die Mitogenese unterdrückt und zu einer Verminderung der Aktivierung der MAPK führt [Williams et al, 2004]. Versuche mit primären embryonalen Mausfibroblasten von Caveolin-1-transgenen Mäusen zeigten, dass Caveolin-1 zu einem vermehrten Austritt der Zellen aus der S-Phase des Zellzyklus führte [Galbiati et al, 2001]. Thyberg (2003) beschrieb Caveolin-1 und Caveolae als Regulatoren der Signaltransduktion in Bezug auf die Mitogenese in glatten Muskelzellen. In dieser Arbeit konnte eine Unterdrückung der Zellproliferation nach Transfektion der PA-TU 8902 gegen Caveolin-1, ILK, β 1-Integrin und FAK gezeigt werden, was sich mit den Ergebnissen bezüglich des Zellüberlebens deckt.

Nach Transfektion ließ sich eine Umverteilung der Zellen in die S- und G1-Phase des Zellzyklus zu Lasten der G2-Phase feststellen. Da sowohl die S- als auch die G1-Phase als eher radioresistente Phasen des Zellzyklus gelten [Wannenmacher, S.21], kann diese Umverteilung nicht das verminderte klonogene Überleben oder die verringerte Zellproliferation nach Transfektion erklären und zeigt, dass eine Zellzyklusumverteilung in diesem Sinne keinen maßgeblichen Einfluss auf die Effekte nach Transfektion hat. Das Caveolin-1 in die Regulation des Zellzyklus involviert ist, wie es von Yoo et al (2003) beschrieben wurde, konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden.

Neben Untersuchungen bezüglich Veränderungen des Zellzyklus wurden auch Analysen angestellt, um das Adhäsionsverhalten der Zellen nach Proteinreduktion auf unterschiedlichen Oberflächen bewerten zu können. Dabei zeigte sich ein signifikant schlechteres Adhäsionsverhalten der PA-TU 8902-Zellen nach Reduktion von β 1-Integrin

und ILK, sowohl auf Polystyren als auch auf den Proteinen der extrazellulären Matrix. Eine Reduktion von Caveolin-1 oder FAK hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion, auch eine zusätzliche Transfektion gegen Caveolin-1 zusammen mit entweder β 1-Integrin oder ILK zeigte keinen zusätzlichen Effekt, so dass die beobachtete Abnahme der Adhäsion alleine auf Reduktion von ILK oder von β 1-Integrin beruht. Dass eine Reduktion von ILK zu einer Abnahme der Adhäsionsfähigkeit von Zellen führt, wird auch durch andere Studien belegt. So zeigte Mizuno et al (2007) eine Zunahme der Adhäsion, Invasion und des metastatischen Potentials bei Zellen eines hepatozellulären Karzinoms in Abhängigkeit der Expression von α 3/ β 1-Integrin, wobei Laminin-5 als Substratgrundlage diente. Aber auch auf Fibronectin konnte die entscheidende Rolle von ILK für die Adhäsion von Zellen gezeigt werden, indem ILK (fl/fl)-Zellen in den ersten 24 Stunden nach Bestrahlung mit bis zu 4 Gy ein signifikant besseres Überleben aufwiesen als ILK (-/-)-Zellen [Eke et al, 2006; Eke et al, 2007; Hehlhans et al, 2007]. Zatter (2007) postulierte, dass die Integrin-vermittelte Zelladhäsion die Apoptose reguliert und damit über Zelltod oder Zellüberleben entscheidet, darüber hinaus konnte eine essentielle Rolle der β 1A-Integrin vermittelten Adhäsion zu Fibronectin und Kollagen Typ III für das Zellüberleben nach strahleninduziertem zytotoxischen Stress gezeigt werden [Cordes et al, 2006]. Zusammengefasst würden diese Daten ein schlechteres klonogenes Überleben der PA-TU 8902 nach Reduktion von ILK als auch von β 1-Integrin erklären. Keine Erklärung liefert jedoch die Untersuchung der Adhäsion bezüglich der Bedeutung der Reduktion von Caveolin-1 und FAK. Sowohl gegen Caveolin-1, als auch gegen FAK transfizierte Zellen zeigten das gleiche schlechte klonogene Überleben wie Zellen nach Reduktion von β 1-Integrin und ILK, im Gegensatz zu den beiden letztgenannten lässt sich kein Unterschied in der Adhäsion finden. Eine Erklärung für das unbeeinflusste Adhäsionsverhalten bei gegen Caveolin-1 oder FAK transfizierte Zellen könnte die Annahme sein, dass Caveolin-1 als Teil eines Signalkomplexes in diesem Bereich eine untergeordnete und modulierende Rolle neben β 1-Integrin und der damit verbundenen Kinase ILK spielt, und dass FAK bereits zu weit unten in der Signalkaskade lokalisiert ist, um auf die Adhäsion direkt Einfluss nehmen zu können.

Untersuchungen zur Veränderung der Signaltransduktion wurden in dieser Arbeit vor allem im Hinblick auf die Phosphoinositol-3-Kinase- und Ras/Raf/MAPK-Signalkaskade nach Transfektion gegen Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK, FAK und in den Kombinationen Cav-1/ILK, Cav-1/ β 1 und Cav-1/FAK unternommen. Eine Reduktion von Caveolin-1 durch Verwendung von spezifischer siRNA in Endothelzellen zeigte eine Veränderung in

der Akt- und MAPK-Signalkaskade unabhängig von der Rolle des Caveolin-1, bestimmte Signalmoleküle zu *lipid rafts* zu leiten [Gonzales et al, 2004]. Eine Ausschaltung der *scaffolding* Domäne des Caveolin-1 führte zu einem Abfall des Gehalts an phosphoryliertem Akt und des Überlebens von Prostatakarzinomzellen [Li et al, 2003]. Shack (2003) beschrieb eine durch Caveolin-1 induzierte Aktivierung des Phosphoinositol-3-Kinase/Akt-Signalweges. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 für die Integrin-gesteuerte Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinase/Akt essentiell ist [Sedding et al, 2005].

Untersuchungen zur Caveolin-1-abhängige Aktivierung von MAPK ergaben kontroverse Resultate. Cohen et al (2003) konnte keinen Unterschied bei der Aktivierung der MAPK zwischen Caveolin-1-Wildtyp und Caveolin-1 (-/-)-Fibroblasten feststellen. Galbiati et al (1998) schrieb Caveolin-1 eine inhibitorische Rolle in Bezug auf die Aktivierung der MAPK in Caveolin-1 (-/-)-embryonalen Mäusefibroblasten zu. Gosens, R. et al (2006) beschrieb ebenfalls eine inhibitorische Funktion des Caveolin-1 hinsichtlich der Aktivierung der MAPK über die Koordination von PDGF-Rezeptor-Signalkaskaden in glatten Muskelzellen der Lunge. Dagegen stehen die Ergebnisse von Siddiqui (2007), die nach Caveolin-1-siRNA-Transfektion von Lungenendothelzellen der Ratte eine Abnahme der MAPK-Aktivierung feststellten.

In dieser Arbeit führte die Reduktion von Caveolin-1 zu einer Induktion der Phosphorylierung von Akt, GSK-3 β und MAPK, während Phosphorylierungsgrade von Src, JNK und Paxillin unbeeinflusst blieben. Reduktion von β 1-Integrin führte zu einem deutlichen Anstieg der Src 416-Phosphorylierung, in weiterführenden Versuchen konnte dies auch in den Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und Panc1, sowohl für die Reduktion von β 1-Integrin, als auch für die Reduktion von FAK gezeigt werden [Cordes et al, 2007]. Reduktion von β 1-Integrin führte neben der Änderung des Src 416-Phosphorylierungsgrades auch zu Veränderungen bezüglich der Phosphorylierung von GSK-3 β und MAPK und der Expression von Paxillin. Nach Doppeltransfektion gegen β 1-Integrin und Caveolin-1 zeigte sich eine noch stärkere Zunahme des Phosphorylierungsgrades von GSK 3 β an Serin 9 als unter alleinigem Knockdown von β 1-Integrin. Zudem zeigte sich eine Induktion von Paxillin nach Cav-1/ β 1-siRNA-Transfektion.

Nach Reduktion von ILK konnte keine Abnahme in der Phosphorylierung von GSK 3 β an Serin 9 beobachtet werden wie es von Duxbury (2005) nach ILK-siRNA-Transfektion von Pankreasadenokarzinomzellen beobachtet wurde. Vielmehr schien der Grad der

Phosphorylierung unbeeinflusst im Vergleich mit den Kontrollen zu bleiben. Allerdings führte eine gleichzeitige Reduktion von Caveolin-1 und ILK zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von GSK 3 β an Serin 9, über das Maß hinaus, das durch alleinige Transfektion gegen Caveolin-1 bereits gezeigt wurde. Zusätzlich zeigte sich auch ein deutlicher Anstieg der Paxillin-Expression nach ILK-Knockdown, der ebenfalls durch gleichzeitige Reduktion von Caveolin-1 noch stärker ausgeprägt war.

Eine Reduktion der FAK hatte Auswirkungen auf die Expression von Src, was sich in einer Induktion zeigte. In einer Veröffentlichung von van Slambrouck et al (2007) wurde die Funktion eines FAK/Src-Signalkomplexes beschrieben, der von α 1-Integrinen rekrutiert werden kann und dann einen wichtigen Promotor der Tumorprogression bei Kolonkarzinomzellen darstellt. In diesem Sinne könnte die Induktion von Src nach Reduktion der FAK als kompensatorischer Effekt in der Erhaltung eines funktionierenden FAK/Src-Komplexes angesehen werden.

Eine Unterdrückung von Akt, wie es von Duxbury (2003) nach Reduktion von FAK beschrieben wurde, konnte nicht, weder in der Gesamtexpression noch im Phosphorylierungsgrad, gesehen werden.

Nach Untersuchung der Veränderung wichtiger Proteine der Signaltransduktion nach Transfektion wurden auch Proteine vor allem des MAPK- und Akt-Signalwegs nach Bestrahlung untersucht. Wesentliche Unterschiede zwischen den transfizierten PA-TU 8902, untransfizierten und mit Kontrollen transfizierten PA-TU 8902 konnten nicht verzeichnet werden, vor allem keine Unterschiede, die das schlechtere Überleben nach Reduktion der Proteine Caveolin-1, β 1-Integrin, ILK oder FAK in bestrahlten Zellen erklären könnten. Offensichtlich war eine generelle Induktion der Phosphorylierung von Paxillin und Akt nach Bestrahlung mit 2 Gy, die jedoch bei allen Versuchsbedingungen gleichermaßen nachweisbar war. Darüberhinaus zeigte sich im Vergleich mit den untransfizierten Zellen und Kontrollen eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von Paxillin und MAPK drei Stunden nach Bestrahlung nach Transfektion gegen Cav-1/ β 1. Eventuell würden sich Unterschiede in der Signaltransduktion demarkieren, wenn man das Beobachtungszeitintervall länger als drei Stunden wählen würde, oder die Signaltransduktionsproteine nach Bestrahlung mit 6 Gy untersuchen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Caveolin-1 nicht nur regulatorische Funktionen bei der Signaltransduktion über β 1-Integrin, ILK und FAK ausübt, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Modifikation des Zellüberlebens und Proliferation nach Bestrahlung besitzt. Darüberhinaus liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse, um die zelluläre Antwort auf

ionisierende Strahlung besser verstehen zu können und festzustellen, welche bereits bekannten Proteine wirklich Einfluss auf die Strahlenantwort haben.

Eine Reduktion von Caveolin-1 erhöht die Strahlensensibilität von Pankreaskarzinomzellen *in vitro*, wie es im Rahmen dieser Arbeit an PA-TU 8902-Zellen und im Rahmen weiterführender Experimente an MiaPaCa2- und Panc1-Zellen [Cordes et al, 2007] gezeigt werden konnte.

VII. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung des Caveolin-1 durch Palade (1953) und Yamada (1955) ist eine rasante Zunahme des Erkenntnisgewinns bezüglich dieses Proteins zu verzeichnen. Gerade in letzter Zeit wurden viele Studien zur Ermittlung der Bedeutung des Caveolin-1 für die Entwicklung und Progression maligner Tumore, aber auch im Hinblick auf die Wirkung therapeutischer Maßnahmen, zum Beispiel Chemotherapie oder Bestrahlung, durchgeführt. Dabei zeigte sich schnell, dass Caveolin-1 eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf zytotoxischen Stress spielt, diese Rolle jedoch unterschiedlich in verschiedenen Tumorzelllinien sein kann [Sunaga et al, 2004]. Intensive Diskussionen gab es auch im Hinblick auf die Rolle von Caveolin-1 als Tumorpromotor oder Tumorsuppressor [Shatz, Liscovitch, 2004], wobei sich mehr und mehr herauskristallisiert, dass Caveolin-1 sowohl das eine als auch das andere sein könnte, je nach Tumorzelllinie und je nach Stadium der Tumorentwicklung. Eine direkte Interaktion von Caveolin-1 mit sogenannten Tumorsuppressorgenen wurde bereits nachgewiesen. Pang et al (2004) zeigte eine Korrelation der Expression von Caveolin-1 mit der Expression von P-gp, einem Produkt des Tumorsuppressorgens MDR1 in normalen und leukämischen Knochenmarkzellen. Auch Williams et al (2004) konnte eine Interaktion von Caveolin-1 mit einem Tumorsuppressor, INK4 Genlokus, feststellen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass Caveolin-1 eine bedeutende Rolle für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit spielt und Auswirkungen auf Zellüberleben, Zellproliferation und Signaltransduktion hat. Dabei spielt vielmehr die Interaktion mit anderen Zellmembranproteinen, wie β 1-Integrin, ILK und FAK, Signaltransduktionsmolekülen und die Mikromilieuzusammensetzung eine Rolle als die direkte Interaktion mit nur einem Tumorsuppressorgen. Caveolin-1 scheint eine zentrale und komplexe Stellung für die Signaltransduktion der Zelle einzunehmen, die außerdem durch intra- und extrazelluläre Faktoren, sowie durch Interaktion mit der extrazellulären Matrix und Zell-Zell-Kontakten modifiziert wird. Die Bezeichnung von Caveolin-1 als regulatorisches Protein von Tumorinduktion, Tumorprogression und metastatischem Potential [Williams, Lisanti, 2005] beschreibt die derzeitig durch Studien ermittelte Rolle des Caveolin-1 wahrscheinlich am besten.

In humanen Pankreaskarzinomzellen hat Caveolin-1 eine wichtige Rolle für die Strahlenempfindlichkeit der Zellen. Nach Reduktion von Caveolin-1 sind Pankreaskarzinomzellen in vitro deutlich strahlensensibler, wie es im Rahmen dieser

Arbeit an PA-TU 8902-Zellen und im Rahmen weiterführender Experimente an MiaPaCa2- und Panc1-Zellen gezeigt werden konnte [Cordes et al, 2007]. Eine Reduktion oder Inhibierung von Caveolin-1 könnte die Effizienz einer herkömmlichen Radio-(Chemo-)therapie steigern und damit zu besseren therapeutischen Erfolgen in der Antitumorthherapie des Pankreaskarzinoms führen. Ob sich diese Daten in vivo bestätigen lassen und inwiefern eine suffiziente zielgerichtete, molekulare Therapie gegen Caveolin-1 entwickelt werden kann, muss in weiterführenden, über Zellkulturversuche hinausreichenden in vivo Experimenten eruiert werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.

Molekularbiologie der Zelle

Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004, 4. Auflage

Atwell, S., Roskelley, C., Dedhar, S.

The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis

Oncogene, 19, (2000), 3811-3815

Belanger, M. M., Gaudreau, M., Roussel, E., Couet, J.

Role of caveolin-1 in etoposide resistance development in A549 lung cancer cells

Cancer Biol Ther, 3, (2004), 954-959

Bernard, R.

Exploring the uses of RNAi-gene knockdown and the Nobel Prize

N Engl J Med, 355, (2006), 2391-2393

Bernhard, E. J., Maity, A., Muschel, R. J., McKenna, W. G.

Effects of ionizing radiation on cell cycle progression

Radiat Environ Biophys, 34, (1995), 79-83

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U.

Pathologie

Verlag Urban & Fischer, München, 2001, 2. Auflage

Boeck, S., Moosmann, N., Stemmler, H.-J., Heinemann, V.

Molekular-basierte Therapiekonzepte beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom

Dtsch med Wochenschr, 132, (2007), 818-822

Brakebusch, C., Fässler, R.

The integrin-action connection, an eternal love affair

EMBO J, 22, (2003), 2324-2333

Buttery, R. C., Rintoul, R. C., Sethi, T.

Small cell lung cancer: the importance of the extracellular matrix

Int J Biochem Cell Biol, 36, (2004), 1154-1160

Cai, Q. C., Jiang, Q. W., Zhao, G. M., Guo, Q., Cao, G. W., Chen, T.

Putative Caveolin-binding sites in SARS-CoV proteins

Acta Pharmacol Sin, 24, (2003), 1051-1059

Campbell, L., Gumbleton, M., Griffiths, D. F.

Caveolin-1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with clinically confined renal cell carcinoma

Br J Cancer, 89, (2003), 1909-1913

Carver, L. A., Schnitzer, J. E.

Caveolae: mining little caves for new cancer targets

Nat Rev Cancer, 3, (2003), 571-582

- Carver, L. A., Schnitzer, J. E., Anderson, R. G. W., Mohla, S.**
Role of caveolae and lipid rafts in cancer: Workshop summary and future needs
Cancer Res, 63, (2003), 6571-6574
- Chan, T., Su, T., Yeh, K., Chang, J., Lin, T., Chen, J., Yuang, S. F., Chang, J.**
Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in cervical cancers
Int J of Oncol, 23, (2003), 599-604
- Chapman, H. A., Wei, Y., Simon, D. I., Waltz, D. A.**
Role of Urokinase Receptor and Caveolin in regulation of Integrin signaling
Thromb Haemat, 82, (1999), 291-297
- Cherubini, A., Hofmann, G., Pillozzi, S., Guasti, L., Crociani, O., Cilia, E., Stefano, P. D., Degani, S., Balzi, M., Olivotto, M., Wanke, E., Becchetti, A., Defilippi, P., Wymore, R., Arcangeli, A.**
Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to $\alpha 1$ integrins and modulate adhesion-dependent signaling
Mol Biol Cell, 16, (2005), 2972-2983
- Cohen, A. W., Combs, T. P., Scherer, P. E., Lisanti, M. P.**
Role of Caveolin and Caveolae in insuline signaling and diabetes
Am J Physiol Endocrinol Metab, 285, (2003), E1151-1160
- Cohen, A. W., Park, D. S., Woodman, S. E., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J., Pereira de Souza, A., Kitsis, R. N., Russell, R. G., Weiss, L. M., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Shtutin, V., Tanowitz, H. B., Lisanti, M. P.**
Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts
Am J Physiol Cell Physiol, 284, (2003), C457-474
- Comoglio, P. M., Boccaccio, C., Trusolino, L.**
Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules
Cur Opin Cell Biol, 15, (2003), 565-571
- Conner, S. D., Schmid, S. L.**
Regulated portals of entry into the cell
Nat, 422, (2003), 37-44
- Cordes, N.**
Overexpression of hyperactive Integrin-linked Kinase (ILK) leads to increased cellular radiosensitivity
Cancer Res, 64, (2004), 5683-5692
- Cordes, N., Beinke, C.**
Fibronectin alters cell survival and intracellular signaling of confluent A549 cultures after irradiation
Cancer Biol Ther, 3, (2004), 47-53

Cordes, N., Beinke, C., Plasswilm, L., van Beuningen, D.

Irradiation and various cytotoxic drugs enhance tyrosine phosphorylation and β 1-Integrin clustering in human A549 lung cancer cells in a substratum-dependent manner in vitro
Strahlenther Onkol, 180, (2003), 157-164

Cordes, N., Frick, S., Brunner, T. B., Pilarsky, C., Grützmann, R., Sipos, B., Klöppel, G., McKenna, W. G., Bernhard, E. J.

Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1.
Oncogene, 26, (2007), 6851-6862

Cordes, N., Meineke, V.

Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR)
Strahlenther Onkol, 179, (2003), 337-344

Cordes, N., Meineke, V.

Integrin signaling and the cellular response to ionizing radiation
J Mol Histol, 35, (2004), 327-337

Cordes, N., Seidler, J., Durzok, R., Geinitz, H., Brakebusch, C.

Beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury
Oncogene, 25, (2006), 1378-1390

Cordes, N., van Beuningen, D.

Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving Integrin-linked Kinase (ILK) and Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) in vitro
Br J Cancer, 88, (2003), 1470-1479

Dahm-Daphi, J., Wiesmüller, L., Dikomey, E.

Meeting Report DNA Repair 2006: Ninth Biennial Meeting of the German Society for Research on DNA Repair
DNA Repair (Amst.), 6, (2007), 140-144

Dalton, S. L., Scharf, E., Briesewitz, R., Marcantonio, E. E., Assoain, R. K.

Cell adhesion to extracellular matrix regulates the life cycle of Integrins
Mol Biol Cell, 6, (1995), 1781-1791

Domschke, W., Berger, M., Hohenberger, W., Meinertz, T., Possinger, K., Reinhardt, D., Niebling, W., Vogelmeier, C., Sauerbruch, T., Kramer, H. J., Müller, S. C., Petri, E.

Therapie-Handbuch, Loseblattwerk zur Fortsetzung
Verlag Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München, 2007, 5. Auflage, online Version (<http://www1.us.elsevierhealth.com/THB/index.php>, Kapitel G15), Stand: 19.03.2008

Dorsett, Y., Tuschl, T.

SiRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics
Nat, 3, (2004), 318-329

- Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Waseem, T., Ashley, S. W., Whang, E. E.**
RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance
Clin Cancer Res, 11, (2005), 3433-3439
- Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Zinner, M. J., Ashley, S. W., Whang, E. E.**
RNA interference targeting focal adhesion kinase enhances pancreatic adenocarcinoma gemcitabine chemoresistivity
Biochem Biophys Res Commun, 311, (2003), 786-792
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., Sharp, P. A.**
Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression
Mol Cell Biol, 4, (2003), 457-467
- Eggert, C., Utz, F.**
Rna-Interferenz - ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion
Biospektrum, 4, (2003), 372-374
- Eke, I., Sandfort, V., Mischkus, A., Baumann, M., Cordes, N.**
Antiproliferative effects of EGFR tyrosine kinase inhibition and radiation-induced genotoxic injury are attenuated by adhesion to fibronectin
Radiother Oncol, 80, (2006), 178-184
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.**
Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells
Nat, 411, (2001), 494-498
- Elliott, M. H., Fliesler, S. J., Ghalayini, A. J.**
Cholesterol-dependent association of Caveolin-1 with the transducin α subunit in bovine photoreceptor Rod outer segments: Disruption by Cyclodextrin and Guanosin 5'-O-(3-Thiophosphate)
Biochem, 42, (2003), 7892-7903
- Estrugo, D., Fischer, A., Hess, F., Scherthan, H., Belka, C., Cordes, N.**
Ligand bound beta 1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells
PLoS ONE, 2, (2007), e269
- Fire, A. Z.**
Gene silencing by double-stranded RNA
Cell Death Differ, 14, (2007), 1998-2012
- Fiucci, G., Ravid, D., Reich, R., Liscovitch, M.**
Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells
Oncogene, 21, (2002), 2365-2375
- Frank, P. G., Lee, H., Park, D. S., Tandon, N. N., Scherer, P. E., Lisanti, M. P.**
Genetic ablation of Caveolin-1 confers protection against atherosclerosis
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24, (2004), 98-105

Frank, P. G., Woodman, S. E., Park, D. S., Lisanti, M. P.

Caveolin, Caveolae and endothelial cell function
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 23, (2003), 1161-1168

Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R., Une, T.

Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure
J Cell Sci, 113, (2000), 3509-3517

Fuks, Z., Vlodavsky, I., Andreeff, M., McLoughlin, M., Haimovitz-Friedman, A.

Effects of extracellular matrix on the response of endothelial cells to radiation in vitro
Eur J Cancer, 28A, (1992), 725-731

Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J. A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R. G., Lisanti, M. P.

Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade
EMBO J, 17, (1998), 6633-6648

Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P. G., Zhu, L., Pestell, R. G., Lisanti, M. P.

Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism
Mol Biol Cell, 12, (2001), 2229-2244

Gargalovic, P., Dory, L.

Caveolins and macrophage lipid metabolism
J Lipid Res, 44, (2003), 11-21

Garrison, J. B., Kyprianou, N.

Novel targeting of apoptosis pathways for prostate cancer therapy
Curr Cancer Drug Targets, 4, (2004), 85-95

Gaudreault, S. B., Chabot, C., Gratton, J. P., Poirier, J.

The Caveolin scaffolding domain modifies AMPA receptor binding properties by inhibiting PLA2 activity
J Biol Chem, 279, (2004), 356-362

Ge, S., Pachter, J. S.

Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes
J Biol Chem, 279, (2004), 6688-6695

Giancotti, F. G., Ruoslahti, E.

Integrin signaling
Science, 285, (1999), 1028-1032

Gonzales, E., Nagiel, A., Lin, A. J., Golan, D. E., Michel, T.

Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells
J Biol Chem, 279, (2004), 40659-40669

Gosens, R., Stelmack, G. L., Dueck, G., McNeill, K. D., Yamasaki, A., Gerthoffer, W. T., Unruh, H., Gounni, A. S., Zaagsma, J., Halayko, A. J.

Role of Caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 291, (2006), 523-534

Hailstones, D., Sleer, L. S., Parton, R. G., Stanley, K. K.

Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells

J Lipid Res, 39, (1998), 369-379

Hall, E. J.

Radiobiology for the Radiobiologist

Verlag Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, 5. Auflage

Han, S. E., Park, K. H., Lee, G., Huh, Y. J., Min, B. M.

Mutation and aberrant expression of Caveolin-1 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines

Int J Oncol, 24, (2004), 435-440

Hanahan, D., Weinberg, R. A.

The hallmarks of cancer

Cell, 100, (2000), 57-70

Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shia, N., Brabek, J.

Fokal Adhesion Kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility

Front Biosci, 8, (2003), 982-996

Harms, V.

Biomathematik, Statistik und Dokumentation

Harms Verlag, Kiel-Mönkeberg, 1998, 7. Auflage

Hayashi, K., Matsuda, S., Machida, K., Yamamoto, T., Fukuda, Y., Nimura, Y., Hayakawa, T., Hamaguchi, M.

Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers

Cancer Res, 61, (2001), 2361-2364

Hehlhans, S., Eke, I., Cordes, N.

An essential role of integrin-linked kinase in the cellular radiosensitivity of normal fibroblasts during the process of cell adhesion and spreading

Int J Radiat Biol, 83, (2007), 769-779

Hehlhans, S., Haase, M., Cordes, N.

Signalling via integrins : implications for cell survival and anticancer strategies

Biochim Biophys Acta, 1775, (2007), 163-180

Hemler, M. E.

Integrin associated proteins

Curr Opin Cell Biol, 10, (1998), 578-585

Hepler, J.R.

RGS Protein and G Protein interactions: A little help from their friends
Mol Pharmacol, 64, (2003), 547-549

Hess, F., Estrugo, D., Fischer, A., Belka, C., Cordes, N.

Integrin-linked kinase interacts with caspase-9 and -8 in an adhesion-dependent manner for promoting radiation-induced apoptosis in human leukemia cells
Oncogene, 26, (2007), 1372-1384

Ho, C. C., Huang, H. P., Huang H. Y., Chen, Y. H., Yang, P. C., Hsu, S. M.

Up-regulated Caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation
Am J Pathol, 161, (2002), 1647-1656

Huo, H., Guo, X., Hong, S., Jiang, M., Liu, X., Liao, K.

Lipid rafts/Caveolae are essential for Insuline-like Growth Factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction
J Biol Chem, 278, (2003), 11561-11569

Hynes, R. O.

Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion
Cell, 69, (1992), 11-25

Hynes, R. O.

Integrins: Bidirectional, allosteric signal machines
Cell, 110, (2002), 673-687

Iliakis, G.

Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells
Semin Oncol, 24, (1997), 602-615

Incardona, J. P., Eaton, S.

Cholesterol in signal transduction
Curr Opin Cell Biol, 12, (2000), 193-203

Juhasz, M., Chen, J., Tulassay, Z., Malfertheiner, P., Ebert, M. P.

Expression of Caveolin-1 in gastrointestinal and extraintestinal cancers
J Cancer Res Clin Oncol, 129, (2003), 493-497

Kasahara, T., Koguchi, E., Funakoshi, M., Aizu-Yokota, E., Sonoda, Y.

Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation
Antioxid Redox Signal, 4, (2002), 491-499

Kasper, M., Reimann, T., Hempel, U., Wenzel, K.-W., Bierhaus, A., Schuh, D., Dimmer, V., Haroske, G., Müller, M.

Loss of Caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis
Histochem Cell Biol, 109, (1998), 41-48

Kastl, S., Brunner, T., Herrmann, O.

Neoadjuvant radiochemotherapy in advanced primarily non-resectable carcinomas of the pancreas

Eur J Surg Onc, 26, (2000), 578-582

Keely, P., Parise, L., Juliano, R.

Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion

Cell Biol, 8, (1998), 101-106

Koleske, A. J., Baltimore, D., Lisanti, M. P.

Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells

Proc Natl Acad Sci USA, 92, (1995), 1381-1385

Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prockop, C., Juliano, R. L.

Signal transduction by integrins: Increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of $\beta 1$ integrins

Cell Biol, 88, (1991), 8392-8396

Lau, N. C., Bartel, D. P.

Zensur in der Zelle

Spektrum der Wissenschaft, 10, (2003), 52-59

Lavie, Y., Fiucci, G., Liscovitch, M.

Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells.

J Biol Chem, 273, (1998), 32380-32383

Lee, H., Park, D. S., Wang, X. B., Scherer, P. E., Schwartz, P. E., Lisanti, M. P.

Src-induced phosphorylation of Caveolin-2 on tyrosine 19. Phospho-Caveolin-2 (Tyr(P)19) is localized near focal adhesions, remains associated with lipid rafts/Caveolae, but no longer forms a high molecular mass hetero-oligomer with Caveolin-1

J Biol Chem, 277, (2002), 34556-34567

Lee, S. W., Reimer, C. L., Oh, P., Campbell, D. B., Schnitzer, J. E.

Tumor cell growth inhibition by caveolin reexpression in human breast cancer cells

Oncogene, 16, (1998), 1391-1397

Li, J., Hassan, G. S., Williams, T. M., Minetti, C., Pestell, R. G., Tanowitz, H. B., Frank, P. G., Sotgia, F., Lisanti, M. P.

Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation

Cell Cycle, 4, (2005), 1817-1825

Li, L., Ren, C. H., Tahir, S. A., Ren, C., Thompson, T. C.

Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A

Mol Cell Biol, 23, (2003), 9389-9404

Lindl, T.

Zell- und Gewebekultur

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999, 4. Auflage

Liscovitch, M., Burgermeister, E., Ely, Y., Harel-Orbital, T., Lavie, K., Ravid, D., Sun, H., Tang, X.

Multidrug resistance in cancer: Role of caveolin, caveolae and lipid rafts

Department of Biological Regulation

(<http://www.weizmann.ac.il/home/Ihliscov>), Stand: 19.03.2008

Liscovitch, M., Eli, Y., Faiman, G., Harel-Orbital, T., Lavie, Y., Tang, X., Troost, J.

Rafts and caveolae: platforms for launching signaling cascades and plasma membrane terminals for drug transport

Department of Biological Regulation

(<http://www.weizmann.ac.il/home/Ihliscov>), Stand: 19.03.2008

Lisiak, E., Cordes, N.

Integrins and the cellular radiation response

Cancer Ther, 2, (2004), 1-8

Liu, J., Shapiro, J. I.

Endocytosis and signal transduction: Basic science update

Biol Res Nurs, 5, (2003), 117-128

Liu, P., Rudicks, M., Anderson, R. G. W.

Multiple functions of caveolin-1

J Biol Chem, 277, (2002), 41295-41298

Liu, P., Ying, Y., Anderson, R. G. W.

Platlet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated Caveolae

Cell Biol, 94, (1997), 13666-13670

Liu, S., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H.

Integrin cytoplasmic domain-binding proteins

J Cell Sci, 113, (2000), 3563-3571

Lohr, F., Wenz, F.

Strahlentherapie kompakt

Verlag Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München, 2007, 2. Auflage

Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., Hunter, T.

Downregulation of Caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion

Cancer Cell, 4, (2003), 499-515

Massimino, M. L., Griffoni, C., Spisni, E., Toni, M., Tomasi, V.

Involvement of Caveolae and caveolae-like domains in signalling, cell survival and angiogenesis

Cell Signal, 14, (2002), 93-98

Meyer, A., van Golen, C. M., Boyanapalli, M., Kim, B., Soules, M. E., Feldmann, E. L.

Integrin-linked kinase complexes with Caveolin-1 in human neuroblastoma cells

Biochem, 44, (2005), 932-938

Milas, L., Mason, K. A., Ang, K. K.

Epidermal growth factor receptor and its inhibition in radiotherapy: in vivo findings
Int J Radiat Biol., 79, (2003), 539-545

Minshall, R. D., Sessa, W. C., Stan, R. V., Anderson, R. G., Malik, A. B.

Caveolin regulation of endothelial function
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 285, (2003), L1179-1183

Miranti, C., Brugge, J. S.

Sensing the environment: A historical perspective on Integrin signal transduction
Nat Cell Biol, 4, (2002), E83-E90

Mizuno, H., Ogura, M., Saito, Y., Sekine, W., Sano, R., Gotou, T., Oku, T., Itoh, S., Katabami, K., Tsuji, T.

Changes in adhesive and migratory characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) cells induced by expression of alpha3beta1 integrin
Biochem Biophys Acta, 1780, (2008), 564-570

Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y., Anderson, R. G. W., Bloom, G. S.

Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton
J Cell Sci, 115, (2002), 4327-4339

Munro, S.

Lipid rafts: Elusive or Illusive?
Cell, 115, (2003), 377-388

Nabi, I. R., Le, P. U.

Caveolae/raft-dependent endocytosis
J Cell Biol, 161, (2003), 673-677

Nichols, B.

Caveosomes and endocytosis of lipid rafts
J Cell Sci, 116, (2003), 4707-4714

Ocker, M., Neureiter, D., Ganslmayer, M., Hahn, E. G., Herold, C.

SiRNA-basierte Therapie des Pankreaskarzinoms
Z Gastroenterol, 43, (2005), 921782

Palade, C. E.

J Applied Phys, 24, (1953), 1424

Pang, A., Wing, Y., Kwong, Y. L.

Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow
Leukem Res, 28, (2004), 973-977

Park, D. S., Cohen, A. W., Frank, P. G., Razani, B., Lee, H., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J., De Souza, A. P., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., Lisanti, M. P.

Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span
Biochem, 42, (2003), 15124-15131

Plattner, H., Hentschel, J.

Zellbiologie

Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, 2. Auflage

Plopper, G. E., McNamee, H. P., Dike, L. E., Bojanowski, K., Ingber, D. E.

Convergence of Integrin and Growth Factor Receptor signaling pathways within the Focal Adhesion Complex

Mol Biol Cell, 6, (1995), 1349-1365

Podar, K., Shringarpure, R., Tai, Y., Simoncini, M., Sattler, M., Ishitsuka, K., Richardson, P. G., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K. C.

Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by Bortezomib

Cancer Res, 64, (2004), 7500-7506

Podar, K., Tai, Y., Cole, C. E., Hideshima, T., Sattler, M., Hamblin, A., Mitsiades, N., Schlossman, R L., Davies, F. E., Morgan, G. J., Munshi, N. C., Chauhan, D., Anderson, K. C.

Essential role of Caveolae in Interleukin-6- and Insulin-like Growth Factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells

J Biol Chem, 278, (2003), 5794-5801

Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ferguson, C., Carozzi, A., Luetterforst, R., Enrich, C., Parton, R. G.

Dynamic and regulated association of Caveolin with lipid bodies; modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant

Mol Biol Cell, 15, (2004), 99-110

Porter, J. C., Hogg, N.

Integrins take partners: Cross-talk between Integrins and other membrane receptors

Trends Cell Biol, 8, (1998), 390-396

Pschyrembel

Klinisches Wörterbuch

Verlag de Gruyter, Berlin, 1998, 258. Auflage

Puck, T. T., Marcus, P. I., Cieciura, S. J.

Clonal growth of mammalian cells in vitro: growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a 'feeder' layer

J Exp Med, 103, (1956), 237-283

Qaddoumi, M. G., Gukasyan, H. J., Davda, J., Labhasetwar, V., Kim, K. J., Lee, V. H.

Clathrin and Caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis

Mol Vis, 9, (2003), 559-568

Racine, C., Belanger, M., Hirabayashi, H., Boucher, M., Chakir, J., Couet, J.

Reduction of Caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines

Biochem Biophys Res Commun, 255, (1999), 580-586

Raskopf, E., Vogt, A., Kornek, M., Scmitz, V.

Die Behandlung mit siRNA-VEGF führt in experimentellen Hepatomen zu einer signifikanten Reduktion der Tumorlast
Z Gastroenterol, 45, (2007), 967791

Ravid, D., Maor, S., Werner, H., Liscovitch, M.

Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling
Oncogene, 24, (2005), 1338-1347

Razani, B., Lisanti, M. P.

The role of Caveolae and Caveolins in mammalian physiology
Reviews in Undergraduate Research, 1, (2002), 44-50

Razani, B., Woodman, S. E., Lisanti, M. P.

Caveolae: From cell biology to animal physiology
Pharmacol Rev, 54, (2002), 431-467

Regina, A., Jodoin, J., Khoueir, P., Rolland, Y., Berthelet, F., Moumdjian, R., Fenart, L., Cecchelli, R., Demeule, M., Beliveau, R.

Down-regulation of Caveolin-1 in glioma vasculature: modulation by radiotherapy
J Neurosci Res, 75, (2004), 291-299

Reiser, M., Kuhn, F.-P., Debus, J.

Duale Reihe Radiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004, 1. Auflage

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D.

Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis
Biochem J, 377, (2004), 159-169

Ridley, A. J., Hall, A.

Snails, swiss and serum: The solution for Rac `n` Rho
Cell, 116, (2004), 23-25

Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., Parton, R. G.

Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains
Nat Cell Biol, 1, (1999), 98-105

Safran, H., Steinhoff, M., Mangray, S., Rathore, R., King, T. C., Chai, L. et al

Overexpression of the Her-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma
Am J Clin Oncol, 24, (2001), 496-499

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kacmaz, K., Linn, S.

Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints
Annu Rev Biochem, 73, (2004), 39-85

Sanguino, A., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K.

Strategies for in vivo siRNA delivery in cancer
Mini Rev Med Chem., 8, (2008), 248-255

Schmidt-Ullrich, R. K., Dent, P., Grant, S., Mikkelsen, R. B., Valerie, K.

Signal transduction and cellular radiation responses
Rad Res, 153, (2000), 245-257

Schwartz, M. A.

Integrins, oncogenes and anchorage independence
J Cell Biol, 139, (1997), 575-578

Schwartz, M. A.

Integrin signaling revisited
Trends Cell Biol, 11, (2001), 466-470

Schwartz, M. A., Ginsberg, M. H.

Networks and crosstalk: Integrin signalling spreads
Nat Cell Biol, 4, (2002), E65-E68

Sedding, D. G., Hermsen, J., Seay, U., Eickelberg, O., Kummer, W., Schwencke, C., Strasser, R. H., Tillmanns, H., Braun-Dullaeus, R. C.

Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo
Circul Res, 96, (2005), 635-642

Sens, P., Turner, M. S.

Theoretical model for the formation of Caveolae and similar membrane invaginations
Biophysic J, 86, (2004), 2049-2057

Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, J., Donnelly, S. C., Strieter, R., Haslett, C.

Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo
Nat Med, 5, (1999), 662-668

Shack, S., Wang, X. T., Kokkonen, G. C., Gorospe, M., Longo, D. L., Holbrook, N. J.

Caveolin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway increases arsenite cytotoxicity
Mol Cell Biol, 23, (2003), 2407-2414

Shatz, M., Liscovitch, M.

Caveolin-1 and cancer multidrug resistance: coordinate regulation of pro-survival proteins?
Leuk Res, 28, (2004), 907-908

Shi, Y., Massague, J.

Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus
Cell, 113, (2003), 685-700

Sowa, G., Pypaert, M., Fulton, D., Sessa, W. C.

Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae
PNAS, 98, (2001), 14072-14077

Sowa, G., Pypaert, M., Fulton, D., Sessa, W. C.

The phosphorylation of Caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates Caveolin-1-dependent Caveolae formation
PNAS, 100, (2003), 6511-6516

Spisni, E., Bianco, M. C., Griffoni, C., Toni, M., D'Angelo, R., Santi, S., Riccio, M., Tomasi, V.

Mechanosensing role of Caveolae and caveolar constituents in human endothelial cells
J Cell Physiol, 197, (2003), 189-204

Steven, K. H., Ryzhova, L., Shin, N., Brabek, J.

Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility
Front Biosci, 8, (2003), 982-996

Stryer, L.

Biochemie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996, 4. Auflage

Sunaga, N., Miyajima, K., Suzuki, M., Sato, M., White, M. A., Ramirez, R. D.

Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer
Cancer Res, 64, (2004), 4277-4285

Suzuki, T., Suzuki, Y., Hanada, K., Hashimoto, A., Redpath, J. L., Stanbridge, E. J., Nishijima, M., Kitagawa, T.

Reduction of Caveolin-1 Expression in tumorigenic human cell hybrids
J Biochem, 124, (1998), 383-388

Suzuoki, M., Myamoto, M., Kato, K., Hiraoka, K., Oshikiri, T., Nakakubu, Y., Fukunaga, A., Shichinohe, T., Shinohara, T., Itoh, T., Kondo, S., Katoh, H.

Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma
Br J Cancer, 87, (2002), 1140-1144

Thompson, T. C., Timme, T. L., Li, L., Goltsov, A.

Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer
Apoptosis, 4, (1999), 233-237

Thorn, H., Stenkula, K. G., Karlsson, M., Ortegren, U., Nystrom, F. H., Gustavsson, J., Stralfors, P.

Cell surface orifices of Caveolae and localization of Caveolin to the necks of Caveolae in adipocytes
Mol Biol Cell, 14, (2003), 3967-3976

Thyberg, J.

Caveolin-1 and Caveolae act as regulators of mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 23, (2003), 1481-1483

Upla, P., Marjomaki, V., Kankaanpaa, P., Ivaska, J., Hyypia, T., Van Der Goot, F. G., Heino, J.

Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to Caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization

Mol Biol Cell, 15, (2004), 625-636

Van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A. M., Sandvig, K.

Caveolae: Anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean

Trends Cell Biol, 13, (2003), 92-100, 2003

Van Slambrouck, S., Grijelmo, C., De Wever, O., Bruyneel, E., Emami, S., Gespach, C., Steelnant, W. F.

Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by alpha1-integrins during colon cancer cell invasion

Int J Oncol, 31, (2007), 1501-1508, 2007

Wang, X. M., Zhang, Y., Kim, H. P., Zhou, Z., Feghali-Bostwick, C. A., Liu, F., Ifedigbo, E., Xu, X., Oury, T. D., Kaminski, N., Choi, A. M. K.

Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis

J Exper Med, 203, (2006), 2895-2906

Wannenmacher, M., Debus, J., Wenz, F.

Strahlentherapie

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006, 1. Auflage

Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., Giancotti, F. G.

A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth

Cell, 94, (1998), 625-634

Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J. A., Chapman, A. H.

A role for Caveolin and the Urokinase Receptor in Integrin-mediated adhesion and signaling

J Cell Biol, 144, (1999), 1285-1294

Wilkowski, R., Thoma, M., Heinemann, V.

Radiochemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin bei Pankreaskarzinom – durchführbar und effektiv

Strahlenther Onkol, 2, (2003), 78-86

Williams, T. M., Lee, H., Cheung, M. W., Cohen, A. W., Razani, B., Iyengar, P., Scherer, P. E., Pestell, R. G., Lisanti, M. P.

Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/Cav-1 in mammary epithelial cell hyperplasia

J Biol Chem, 279, (2004), 24745-24756

Williams, T. M., Lisanti, M. P.

Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer and metastasis
Am J Physiol Cell Physiol, 288, (2005), C494-506

Xie, Z., Zeng, X., Waldman, T., Glazer, R. I.

Transformation of mammary epithelial cells by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activates beta-catenin and c-Myc, and down-regulates Caveolin-1
Cancer Res, 63, (2003), 5370-5375

Xiong, H. Q., Rosenberg, A., LoBuglio, A., Schmidt, W., Wolff, R. A., Deutsch, J., Needle, M., Abbruzzese, J. L.

Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial
J Clin Oncol, 22, (2004), 2610-2616

Yacoub, A., Hawkins, W., Hanna, D., Young, H., Park, M. A., Grant, M., Roberts, J. D., Curiel, D. T., Fisher, P. B., Valerie, C., Grant, S., Hagan, M., Dent, P.

Human chorionic gonadotropin modulates prostate cancer cell survival after irradiation or HMG CoA reductase inhibitor treatment
Mol Pharmacol, 71, (2007), 259-275

Yamada, E.

The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse
J Biophys Biochem Cytol, 1, (1955), 445-458

Yamada, K. M., Even-Ram, S.

Integrin regulation of growth factor receptors
Nat Cell Biol, 4, (2002), E75-E76

Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., Nomura, M., Wakabayashi, G., Kitajima, M., Ishii, H.

Elevated expression of Caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide
J Gastroenterol, 38, (2003), 854-860

Yoo, S. H., Park, Y. S., Kim, H. R., Sung, S. W., Kim, J. H., Shim, Y. S., Lee, S. D., Choi, Y. L., Kim, M. K., Chung, D. H.

Expression of Caveolin-1 is associated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the lung
Lung Cancer, 42, (2003), 195-202

Zamir, E., Geiger, B.

Components of cell-matrix adhesions
J Cell Sci, 114, (2001), 3577-3579

Zamore, P. D.

RNA interference: big applause for silencing in Stockholm
Cell, 127, (2006), 1083-1086

Zijian X., Ting, C.

Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function
Mol Intervent, 3, (2003), 157-168

Zutter, M. M.

Integrin-mediated adhesion: tipping the balance between chemosensitivity and chemoresistance
Adv Exp Med Biol, 608, (2007), 87-100

C Abkürzungsverzeichnis

α	Koeffizient des linearen Terms der Dosis-Effekt-Kurve
AK	Ausgesäte Klone
AKT/PKB	Wachstumsfaktor regulierte Serin-Threonin-Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Engl.: Ataxia-teleangiectasia mutated
β	Koeffizient des quadratischen Terms der Dosis-Effekt-Kurve
$\beta 1$	$\beta 1$ -Integrin
Bad	Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie
BAX	BCL-2 assoziiertes Protein
BCL-2	Engl.: B-cell lymphoma 2
BrdU	Bromodeoxyuridin
$^{\circ}\text{C}$	SI-Einheit für Grad Celsius
Cas	Engl.: Crk-associated substrate
Cav-1	Caveolin-1
cm	SI-Einheit für Zentimeter
Crk	Engl.: Cell cycle related kinase
d	SI-Einheit für Tag
D_0	D_0 repräsentiert den subletalen Zellschaden bei der Interpretation von Dosis-Effekt-Kurven
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-oktan
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	Destilliert
DMEM	Engl.: Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl.: Deoxyribonucleic acid
DNS	Deoxyribonukleinsäure
D_q	Quasi-Schwellen-Dosis
ECM	Engl.: Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Engl.: Epidermal growth factor receptor
ELISA	Engl.: Enzyme linked immunosorbent assay

eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
FAK	Engl.: Focal adhesion kinase
FKHR	Engl.: Forkhead transcription factor
FKS	Fetales Kälberserum
fl	SI-Einheit für Femtoliter
g	SI-Einheit für Gramm
GF	Engl.: Growth factor
GK	Gezählte Kolonien
Grb2	Engl.: Growth factor receptor bound protein 2
Grb7	Engl.: Growth factor receptor bound protein 7
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
Gy	SI-Einheit für Gray
h	SI-Einheit für Stunde
HCl	Chemische Formel für Hydrochlorid
H ₂ O ₂	Chemische Formel für Wasserstoffperoxid
HRP	Engl.: Horseradish peroxidase
i	Natürliche Zahl
IL6	Interleukin 6
ILK	Engl.: Integrin-linked kinase
JNK	Engl.: Jun N-terminal kinase
KB	Koloniebildungsassay
KCl	Chemische Formel für Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogencarbonat
l	SI-Einheit für Liter
M	SI-Einheit für Mol
m	SI-Einheit für Meter
MAPK	Engl.: Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MEM	Engl.: Minimal essential medium
MeV	SI-Einheit für Megaelektronenvolt
mg	SI-Einheit für Milligramm
MG	Molekulargewicht
Min	SI-Einheit für Minute

mm	SI-Einheit für Millimeter
mRNA	Engl.: Messenger RNA
n	Natürliche Zahl
N	SI-Einheit für Normalität
N ₂	Chemisches Zeichen für Stickstoff
NAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NaCl	Chemische Formel für Natriumchlorid
NaF	Chemische Formel für Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Chemische Formel für Natriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Chemische Formel für Natrium-Orthovanadat
Nck-2	Nicht-katalytische Region des Tyrosin Kinase Adapter Proteins 2
NFκB	Engl.: Nuclear factor-kappa B
nm	SI-Einheit für Nanometer
NO	Chemische Formel für Stickstoff
NP-40	N-Nonylphenol-Derivat
P53	Tumorsuppressorprotein
PAK	Engl.: Activated protein kinase
Pax	Paxillin
PBS	Engl.: Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline mit Tween
PCR	Engl.: Polymerase chain reaction
PDGF	Engl.: Platelet derived growth factor
PE	Platiereffizienz
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKCα	Engl.: Protein kinase C-alpha
PLC-gamma 1	Phospholipase C-gamma 1
pRb	Engl.: Phospho-retinoblastoma protein
Rac	Guanosintriphosphatase
Raf	Guanosintriphosphatase
Ras	Guanosintriphosphatase
RISC	Engl.: RNA-induced silencing complex
RNA	Engl.: Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Engl.: Rounds per minute

RPMI	Medium für die Zellkultivierung
RTK	Engl.: Receptor tyrosine kinase
σ	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	SI-Einheit für Sekunde
SF	Engl.: Surviving fraction
siRNA	Engl.: Small interfering RNA
SOS	Engl.: Sevenless homolog protein
Src	Engl.: Sarcoma protein
Tal	Talin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tween	Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat
uPAR	Engl.: Urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Engl.: Vascular endothelial growth factor
Vin	Vinculin

D Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn PD Dr. Nils Cordes für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas und seinem großen Engagement, mich bei der Durchführung der Arbeit zu unterstützen und mir immer beratend zur Seite zu stehen. Zudem möchte ich mich bei ihm für die Einführung in das experimentelle Arbeiten bedanken. Die Zusammenarbeit in seiner Gruppe war außergewöhnlich und brachte viel konstruktive Kritik und neue Sichtweisen hervor, die nicht zuletzt entscheidend zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich dem Leiter des Institutes für Radiobiologie der Bundeswehr, Herrn OTA PD Dr. Viktor Meineke, und seinem Vorgänger Herrn OTA Prof. Dr. Dirk van Beuningen, danken, dass ich die Räumlichkeiten des Instituts für die Durchführung meiner Experimente nutzen konnte, sowie allen Angestellten für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Molls gebührt mein Dank für die Vertretung meiner Dissertation vor der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München und für die umfassende Einführung in das Fach Strahlentherapie im Rahmen des Praktischen Jahres in der Strahlentherapie am Klinikum Rechts der Isar.

Bei Frau Bärbel Reincke und Frau Gabi Schröder bedanke ich mich für ihre freundliche Unterstützung und kompetente fachliche Hilfe bei der experimentellen Durchführung der Arbeit, sowie die darüber hinausreichende gute Zusammenarbeit.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, Frau Roswitha Frick und Herrn Klaus Frick, für ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit und ihre ideelle und finanzielle Unterstützung, ohne die diese aufwendige Doktorarbeit in dieser Form niemals möglich gewesen wäre.

Letztlich möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinem Lebensgefährten Herrn Björn Schweinoch bedanken, der mich in der ganzen Zeit unterstützt und mir die Arbeit am Computer erheblich durch seine fundierten PC-Kenntnisse erleichtert hat.

E Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Silke Frick
Geburtsdatum	30.09.1979
Geburtsort	Mannheim
Konfession	evangelisch

Schullaufbahn

1986 - 1999	Grundschule und Gymnasium in Bad Aibling, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
-------------	---

Studium

1999 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilian Universität München und der Technischen Universität München
28.04.06	3. Staatsexamen
05.05.06	Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

seit 01.02.2007	Assistenzärztin in der Praxis und Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter der Leitung von Frau PD Dr. Staar und Herrn Dr. Bund am Klinikum Bremen-Mitte
-----------------	--