

Die Rolle der Proteinkinase B (Akt) bei der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Sebastian Oeck
geboren in Remscheid/Lennep

Dezember 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) in der Abteilung für molekulare Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof.in Dr. Verena Jendrossek

2. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2016

„Wir werden ja sehen, was wir sehen werden.“

Wilhelm Conrad Röntgen

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Verzeichnis der Abkürzung | 7 |
| Verzeichnis der Abbildungen | 10 |
| Verzeichnis der Tabellen | 12 |
| 1 Einleitung | 13 |
| 1.1 Strahlentherapie und ionisierende Strahlung | 14 |
| 1.1.1 Bedeutung der Strahlentherapie bei der Behandlung von Tumoren | 14 |
| 1.1.2 Strahleninduzierte Schäden und zelluläre Antwort | 17 |
| 1.2 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen | 22 |
| 1.2.1 DNA-PK-abhängiges non-homologous end joining (D-NHEJ) | 23 |
| 1.2.2 DNA-PK-unabhängiges non-homologous end joining (B-NHEJ) | 24 |
| 1.2.3 Homologe Rekombinationsreparatur (HRR) | 25 |
| 1.3 Der PI3K/Akt-Signalweg in der Onkologie | 26 |
| 1.3.1 Die Proteinkinase B (Akt) | 26 |
| 1.3.2 Der PI3K/Akt-Signalweg | 27 |
| 1.3.3 Veränderungen im PI3K/Akt-Signalweg in der Onkogenese | 29 |
| 1.3.4 Die klinisch relevante Akt1-Mutationen E17K und artifizielle Akt1-Varianten | 30 |
| 1.3.5 Therapie von Tumoren mit Veränderungen im PI3K/Akt-Signalweg | 32 |
| 1.3.6 Einfluss der Kinase Akt1 auf die DNA-Reparatur-Signalwege | 34 |
| 2 Zielsetzung | 37 |
| 3 Material und Methoden | 39 |
| 3.1 Materialien | 39 |
| 3.1.1 Verbrauchsmaterialien | 39 |
| 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien | 40 |
| 3.1.3 Genutzte Geräte | 41 |
| 3.1.4 Verwendete Kits | 43 |
| 3.1.5 Puffer und Lösungen | 43 |
| 3.1.6 Kulturmedien und Zusätze | 45 |
| 3.1.7 Oligonukleotide | 47 |
| 3.1.8 Enzyme und rekombinante Proteine | 47 |
| 3.1.9 Antikörper | 48 |
| 3.1.10 Ursprüngliche und erzeugte Plasmide | 49 |
| 3.1.11 Ursprüngliche und erzeugte Bakterienstämme | 50 |
| 3.1.12 Ursprüngliche und erzeugte Zelllinien | 50 |
| 3.1.13 Verwendete Mäusestämme | 51 |
| 3.1.14 Datenbanken | 52 |
| 3.1.15 Digitale Auswertungs- und Bearbeitungsprogramme | 52 |

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------|----|
| 3.2 | Molekularbiologische Methoden | 53 |
| 3.2.1 | Primer-Design | 53 |
| 3.2.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 53 |
| 3.2.3 | Restriktion von DNA | 54 |
| 3.2.4 | Ligation von DNA-Fragmenten | 54 |
| 3.2.5 | Gel-Elektrophorese | 55 |
| 3.2.6 | DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen | 56 |
| 3.2.7 | Kultivierung und Lagerung von Bakterien | 56 |
| 3.2.8 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 56 |
| 3.2.9 | Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen | 57 |
| 3.2.10 | Isolierung von Plasmid-DNA (Standard-Minipräparation) | 57 |
| 3.2.11 | Sequenzierung von DNA-Fragmenten | 58 |
| 3.2.12 | Site-Directed Mutagenese-PCR | 58 |
| 3.2.13 | DNA-Isolierung aus Bakterienzellen (Maxipräparation) | 58 |
| 3.2.14 | Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration | 59 |
| 3.3 | Zellbiologische Methoden | 59 |
| 3.3.1 | Kultivierung von Zellen | 59 |
| 3.3.2 | Passagieren von Zellen | 59 |
| 3.3.3 | Konservieren und Reaktivieren von Zellen | 60 |
| 3.3.4 | Quantifizierung vitaler Zellen mittels CASY® Cell Counter | 60 |
| 3.3.5 | Transfektion von Säugetierzellen | 61 |
| 3.3.6 | Virusproduktion und Transduktion von murinen Zellen | 61 |
| 3.3.7 | Selektion von transfizierten und transduzierten Zellen | 64 |
| 3.3.8 | Fluoreszenz-basierte Zellsortierung | 64 |
| 3.3.9 | Proliferationstest | 65 |
| 3.3.10 | Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung (IR) | 65 |
| 3.3.11 | Kristallviolett-Assay | 66 |
| 3.3.12 | Metabolischer Assay mit WST-1 | 66 |
| 3.3.13 | Koloniebildungs-Assay | 67 |
| 3.3.14 | Durchflusszytometrie | 68 |
| 3.3.15 | Fluoreszenzmikroskopie und Immunfluoreszenz | 70 |
| 3.4 | Proteinbiochemische Methoden | 75 |
| 3.4.1 | Herstellung von Zelllysaten | 75 |
| 3.4.2 | Zelllyse mittels Ultraschall-Homogenisation | 75 |
| 3.4.3 | Konzentrationsbestimmung nach Bradford | 76 |
| 3.4.4 | SDS-PAGE | 76 |
| 3.4.5 | Western Blot | 77 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.6 | DNA-PKcs und Akt1 Kinase-Assay | 79 |
| 3.5 | Tierexperimentelle Verfahren | 81 |
| 3.5.1 | Tierhaltung | 81 |
| 3.5.2 | Transplantation von Akt1-Mutanten exprimierenden Zellen | 81 |
| 3.5.3 | Messungen des Tumorwachstums | 81 |
| 3.5.4 | Vorbereitung von Tumoren für histologische Färbungen | 82 |
| 3.5.5 | Hämatoxylin/Eosin-Färbung histologischer Schnitte | 82 |
| 3.6 | Statistische Auswertung | 83 |
| 4 | Ergebnisse | 84 |
| 4.1 | Mutationen des PI3K/Akt-Signalwegs in aktuellen Studien | 84 |
| 4.2 | Generierung von Akt1-Mutanten exprimierenden Zellen | 89 |
| 4.2.1 | Mutagenese der Akt1-Mutanten und Klonierung in retrovirale Verpackungsplasmide (pBEC) | 89 |
| 4.2.2 | Fluoreszenz-basiertes Sortieren der TrC1 | 91 |
| 4.2.3 | Fluoreszenz-basiertes Sortieren der MEF -/- | 93 |
| 4.3 | Effekte der Expression von Akt1-Mutanten auf die Zellen | 94 |
| 4.3.1 | Expression und Phosphorylierung der Akt1-Mutanten | 94 |
| 4.3.2 | Auswirkung der Akt1-Mutationen auf Proliferation und metabolische Aktivität | 95 |
| 4.3.3 | Tumorwachstum in Nacktmäusen | 102 |
| 4.4 | Akt1-bedingte Modulation der zellulären Antwort auf IR | 104 |
| 4.4.1 | Proliferations- und Zellzyklusveränderungen nach IR | 104 |
| 4.4.2 | Apoptose und Zelltod nach IR | 107 |
| 4.4.3 | Effekte der Mutanten auf das Langzeitüberleben nach IR | 108 |
| 4.4.4 | Phosphorylierung der Akt1-Mutanten nach Bestrahlung | 110 |
| 4.4.5 | Inhibition der Akt1-Mutanten und Folgen für das Überleben nach IR | 112 |
| 4.5 | Effekte der Akt1-Mutationen auf die DNA-Reparatur | 114 |
| 4.5.1 | Focinator – Programmierung einer Auswertesoftware für Foci von DNA-Schäden | 114 |
| 4.5.2 | Effekte der Akt1-Mutationen auf die Reparatur-Kinetiken von DNA-Schäden (γ -H2.AX-Assay) | 115 |
| 4.5.3 | Effekte der Akt1-Mutationen auf DNA-DSB-Reparatur im direkten DNA-Schaden Assay (neutrales Comet Assay) | 120 |
| 4.5.4 | Inhibition der Akt1-Mutanten und die Reparatur von DNA-Schäden | 125 |
| 4.6 | Subzelluläre Lokalisation von Akt1-Mutanten | 127 |
| 4.6.1 | Lokalisation der Akt1-Varianten in TrC1 nach IR | 127 |
| 4.6.2 | Lokalisation der Akt1-Varianten in MEF -/- nach IR | 131 |
| 4.7 | Einfluss von aktiven Akt1-Mutanten auf das NHEJ | 136 |
| 4.7.1 | Inhibition der DNA-PKcs und das zelluläre Überleben nach IR | 136 |
| 4.7.2 | Inhibition der DNA-PKcs und die DNA-Reparatur nach IR | 137 |

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7.3 | Akt1 Kinase-Assay mit DNA-PKcs als Substrat | 139 |
| 4.7.4 | Akt1 als Substrat von DNA-PKcs im Kinase-Assay | 140 |
| 5 | Diskussion | 142 |
| 5.1 | Mutationen des PI3K/Akt-Signalwegs in aktuellen Studien | 143 |
| 5.2 | Generierung von Akt1-Mutanten und Zelllinien | 147 |
| 5.3 | Effekte der Akt1-Mutationen auf Mutanten-exprimierende Zellen | 149 |
| 5.4 | Modulation der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung durch Expression der Akt1-Mutanten | 151 |
| 5.5 | Effekte der Akt1-Mutationen auf die DNA-Reparatur | 155 |
| 5.6 | Subzelluläre Lokalisation von Akt | 160 |
| 5.7 | Einfluss von aktiven Akt1-Mutanten auf die DNA-DSB Reparaturwege | 162 |
| 6 | Zusammenfassung | 169 |
| 7 | Ausblick | 172 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 173 |
| 9 | Danksagungen | 183 |
| 10 | Anhang | 184 |
| 10.1 | DNA- und Proteinmarker | 184 |
| 10.2 | Plasmidkarten | 184 |
| 10.3 | Sequenzvergleich der AKT1-Varianten | 187 |
| 11 | Lebenslauf | 188 |

Verzeichnis der Abkürzung

Tab 1 in der Arbeit verwendete Abkürzungen

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------------|----------------------------------------------------------------|
| A. dest. | Aqua destillata (Destilliertes Wasser) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Amp ^R | Ampicillin-Resistenz |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| ctr | Kontroll-Zellen |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNA-PK | Komplex der Proteine DNA-PKcs, Ku70 und Ku80 |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| GVO | gentechnisch veränderter Organismus |
| HD | hydrophobe Domäne |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| Kit | Reagenziensysteme (englisch) |
| LB | Lysogeny Broth |
| LED | light-emitting diode (Licht-emittierende Diode) |
| MEF -/- | Murine embryonale Fibroblasten mit vollständiger Akt1-Deletion |
| Neo ^R | Neomycin/G418-Resistenz |
| p- | phosphoryliertes |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PH | Pleckstrin-Homology |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat |
| PIP ₃ | Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat |
| px | Pixel |
| Puro ^R | Puromycin-Resistenz |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur (21°C) |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SOC | Super Optimal broth with Catabolite repression |
| TAE | Tris-Acetat EDTA |
| TrC1 | TRAMP-C1 Zellen |

| | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Tris | Trishydroxymethylaminoethan |
| vgl. | vergleiche |
| Well | Vertiefung (Kalotte) für Zellen in einer Zellkulturtestplatte (englisch) |
| γ -H2.AX | Phosphoryliertes Protein H2.AX Ser139 |

Tab 2 Abkürzungen von Einheiten und Formelzeichen

| Einheiten und Zeichen | Bedeutung |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| μ _ | mikro_ (millionster Teil) |
| c | Konzentration [mol pro Liter] |
| c_ | centi_ (hundertster Teil) |
| d | Schichtdicke der Küvette [cm] |
| Da | Dalton (atomare Masseneinheit) |
| E | Extinktion |
| g | Gramm |
| Gy | Gray (Joul pro Kilogramm) |
| k_ | kilo_ (tausend) |
| L | Liter |
| M | Molarität (mol pro Liter) |
| m | Meter |
| m_ | milli_ (tausendster Teil) |
| mol | Stoffmenge |
| OD | optische Dichte |
| rpm | Rounds per minute (Drehungen pro Minute) |
| T_m | mittlerer DNA-Schmelzpunkt in °C |
| U | Unit (Menge um in 1 min 1 μ mol Substrat umzusetzen) |
| ϵ | Extinktionskoeffizient [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] |
| RLU | relative light units |

Tab 3 Abkürzungen von Proteinennamen

| Abkürzung | Bedeutung |
|--------------|--------------------------------------------------------------------|
| Akt | Proteinkinase B (PKB) |
| Akt1 | Isoform α der Proteinkinase B (PKB α) |
| Akt2 | Isoform β der Proteinkinase B (PKB β) |
| Akt3 | Isoform γ der Proteinkinase B (PKB γ) |
| ATM | Ataxia telangiectasia mutated |
| ATR | Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein |
| BAD | Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death |
| BRCA1 | Tumorsuppressorprotein Breast Cancer 1 |
| CDK | Cyclin-abhängigen-Kinasen |
| CtIP | C-terminal Protein 1 Interacting Protein |
| DNA-PK | DNA-dependent protein kinase |
| DNA-PKcs | Katalytische Untereinheit des DNA-PK Komplexes |
| FOXO | Forkhead-Box-Protein O |
| GSK3 β | Glykogensynthase-Kinase 3 β |
| H2.AX | Variante des Histon H2A |
| Ku70 | Untereinheit des DNA-PK Komplexes; bildet ein Heterodimer mit Ku80 |
| Ku80 | Untereinheit des DNA-PK Komplexes; bildet ein Heterodimer mit Ku70 |

| | |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| Lig4 | DNA-Ligase 4 |
| MDM2 | Mouse double minute 2 homolog |
| MRN | Mre11-Rad50-Nbs1 |
| mTOR | Ziel des Rapamycins im Säugetier |
| NEDD | E3 Ubiquitin Proteinligase |
| Nf-κB | Nukleärer Faktor κB |
| p53 | Tumor Protein 53 |
| eGFP | Enhanced Green Fluorescent Protein |
| PARP1 | Poly-ADP-Ribose-Polymerase1 |
| PDK1 | 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PTEN | Phosphatase and Tensin homolog |
| Rad51 | DNA repair protein RAD51 homolog 1 |
| RIP | Receptor-interacting protein |
| RTK | Receptor tyrosine kinases |
| TCL1 | T-Zellen Lymphom 1 |
| WRN | Werner Syndrome Helicase |
| XRCC | X-ray repair cross-complementing protein |
| | |
| pBEC | eGFP (Transduktionskontrolle) |
| WT | Fusionsprotein aus nicht mutiertem Akt1 und eGFP |
| E17K | Fusionsprotein aus mutiertem Akt1-E17K und eGFP |
| R25C | Fusionsprotein aus mutiertem Akt1-R25C und eGFP |
| myr | Fusionsprotein aus myristoylierter Akt1-Kinasedomäne und eGFP |
| TDSD | Fusionsprotein aus mutiertem Akt1-T308D/S473D und eGFP |
| K179A | Fusionsprotein aus mutiertem Akt1-K179A und eGFP |

Verzeichnis der Abbildungen

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 1-1 Krebsmortalitätsraten weltweit im Jahr 2012..... | 13 |
| Abb. 1-2 Inzidenz- und Mortalitätsraten verschiedener Tumorarten im Jahr 2012..... | 14 |
| Abb. 1.1.1-1 Weltweiter Zugang zu Strahlentherapie im Jahr 2012 | 15 |
| Abb. 1.1.2-1 Molekulare Antwort von Zellen auf Bestrahlung..... | 19 |
| Abb. 1.2.1-1 D-NHEJ Mechanismus | 23 |
| Abb. 1.2.2-1 B-NHEJ-Weg der DNA-Reparatur | 24 |
| Abb. 1.2.3-1 Initiierung und Ablauf der HRR | 25 |
| Abb. 1.3.1-1 Schematische Darstellung des Akt1-Aufbaus | 26 |
| Abb. 1.3.1-2 Dreidimensionale Struktur von Akt1 | 27 |
| Abb. 1.3.2-1 PI3K/Akt-Signalweg..... | 28 |
| Abb. 1.3.4-1 Verwendete Mutationen und ihre postulierten Effekte auf den Akt-Signalweg..... | 31 |
| Abb. 1.3.6-1 Akt-Phosphorylierung nach IR und dessen Abhängigkeit zur Kinase DNA-PKcs..... | 34 |
| Abb. 1.3.6-2 Einfluss der Akt1-Inhibition auf das Überleben und die DNA-Reparatur-Kinetik nach IR | 35 |
| Abb. 1.3.6-3 Was ist die Funktion von Akt1 in der zellulären Antwort auf Bestrahlung? | 36 |
| Abb. 2-1 Ziele der Promotionsarbeit..... | 38 |
| Abb. 3.3.6-1 Retroviraler Ursprung des pBABE/Plat-E Transduktionssystems | 62 |
| Abb. 3.3.8-1 Ablauf der Generierung von Akt1-Mutanten exprimierender Zellen..... | 65 |
| Abb. 3.4.6-1 Schematischer Ablauf des Kinase Assays für DNA-PKcs und Akt1 | 79 |
| Abb. 3.4.6-2 Ablauf des Kinase-Assays für DNA-PKcs, Akt1 und die jeweiligen Kontrollsubstrate..... | 80 |
| Abb. 4.1-1 Analyse der somatischen <i>PI3KCA</i> -Mutationen mittels COSMIC-Datenbank | 85 |
| Abb. 4.1-2 Analyse der somatischen <i>PTEN</i> -Mutationen mittels COSMIC-Datenbank..... | 86 |
| Abb. 4.1-3 Analyse der somatischen Akt1-E17K-Mutationen mittels COSMIC-Datenbank..... | 88 |
| Abb. 4.2.1-1 Mutagenese und Sequenzierung der pBABE-AKT1-XX-eGFP Plasmide..... | 90 |
| Abb. 4.2.2-1 Durchflusszytometrie der Akt1-eGFP-Expression in TrC1 unmittelbar nach Sortierung..... | 91 |
| Abb. 4.2.2-2 Langzeitentwicklung der Akt1-eGFP-Expression in TrC1 | 92 |
| Abb. 4.2.3-1 Durchflusszytometrie der Akt1-eGFP-Expression in MEF -/- unmittelbar nach Sortierung | 93 |
| Abb. 4.2.3-2 Langzeitentwicklung der Akt1-eGFP-Expression in MEF -/-..... | 94 |
| Abb. 4.3.1-1 Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen | 95 |
| Abb. 4.3.2-1 Proliferation im Zeitverlauf des PH-Domänen-Sets in TrC1 | 96 |
| Abb. 4.3.2-2 Proliferationsmessung im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 Kinase-Domänen-Sets..... | 97 |
| Abb. 4.3.2-3 KV-Assay im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 PH-Domänen-Sets | 98 |
| Abb. 4.3.2-4 KV-Assay im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 Kinase-Domänen-Sets | 99 |
| Abb. 4.3.2-5 Metabolischer Assay WST-1 im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 PH-Domänen-Sets | 100 |
| Abb. 4.3.2-6 Metabolischer Assay WST-1 im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 Kinase-Domänen-Sets | 101 |
| Abb. 4.3.3-1 Tumorwachstum in Nacktmäusen im Vergleich von MEF ctr und MEF -/- E17K..... | 103 |
| Abb. 4.4.1-1 KV-Assay 72 h nach Behandlung der sieben TrC1 Zelllinien mit 5 Gy..... | 105 |
| Abb. 4.4.1-2 Metabolischer Assay WST-1 72 h nach Bestrahlung der sieben TrC1 Zelllinien mit 5 Gy..... | 106 |
| Abb. 4.4.2-1 Apoptose- und Zelltod-Analyse der TrC1 72 h nach 5 Gy | 107 |
| Abb. 4.4.3-1 Koloniebildungs-Assay des TrC1 PH-Domänen-Sets mit steigender IR-Dosis..... | 109 |
| Abb. 4.4.3-2 Koloniebildungs-Assay des TrC1 Kinase-Domänen-Sets mit steigender IR-Dosis..... | 110 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 4.4.4-1 Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden TrC1 nach IR | 111 |
| Abb. 4.4.4-2 Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden MEF -/- nach IR | 111 |
| Abb. 4.4.5-1 Koloniebildungs-Assay der aktivierenden Mutanten mit Akt-Inhibitor MK-2206 und IR | 113 |
| Abb. 4.5.1-1 Vergleich der Quantifizierungsmethoden von Foci in TrC1 nach 3 Gy Bestrahlung | 114 |
| Abb. 4.5.2-1 γ -H2.AX-Assay der TrC1 PH-Domänen-Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy | 116 |
| Abb. 4.5.2-2 γ -H2.AX-Assay der TrC1 Kinase-Domänen-Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy | 117 |
| Abb. 4.5.2-3 γ -H2.AX-Assay der MEF Akt1 PH-Domänen Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy | 118 |
| Abb. 4.5.2-4 γ -H2.AX-Assay der Akt1 Kinase-Domänen Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy | 119 |
| Abb. 4.5.3-1 Neutraler Comet Assay der Akt1-Varianten in TrC1 nach 40 Gy | 121 |
| Abb. 4.5.3-2 Neutraler Comet Assay mit Auswertung der Akt1-Varianten in TrC1 nach 4 h nach 40 Gy | 122 |
| Abb. 4.5.3-3 Neutraler Comet Assay der Akt1-Varianten in MEF -/- nach 40 Gy | 123 |
| Abb. 4.5.4-1 γ -H2.AX-Assay der TrC1 Akt1-Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy mit Akt-Inhibitoren | 125 |
| Abb. 4.6.1-1 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-WT-eGFP in TrC1 nach 3 Gy | 128 |
| Abb. 4.6.1-2 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-E17K-eGFP in TrC1 nach 3 Gy | 129 |
| Abb. 4.6.1-3 Subzelluläre Lokalisation des myrAkt1-eGFP in TrC1 nach 3 Gy | 130 |
| Abb. 4.6.1-4 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-TDSD-eGFP in TrC1 nach 3 Gy | 131 |
| Abb. 4.6.2-1 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-WT-eGFP in MEF -/- nach 3 Gy | 132 |
| Abb. 4.6.2-2 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-E17K-eGFP in MEF -/- nach 3 Gy | 133 |
| Abb. 4.6.2-3 Subzelluläre Lokalisation des myrAkt1-eGFP in MEF -/- nach 3 Gy | 134 |
| Abb. 4.6.2-4 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-TDSD-eGFP in MEF -/- nach 3 Gy | 135 |
| Abb. 4.7.1-1 Koloniebildungs-Assay der aktivierenden Mutanten mit DNA-PK-Inhibitor NU7441 | 136 |
| Abb. 4.7.2-1 γ -H2.AX-Assay der TrC1 Akt1-Mutanten mit DNA-PK-Inhibitor | 138 |
| Abb. 4.7.3-1 Kinase-Assay zur Testung der Aktivität des Akt1-TDSD und der Autophosphorylierung | 139 |
| Abb. 4.7.3-2 Kinase-Assay der DNA-PK als putatives Substrat des Akt1 | 140 |
| Abb. 4.7.4-1 Kinase-Assay des Akt1 als Substrat von DNA-PK | 141 |
| Abb. 5.4-1 Schematische Darstellung der Inhibition von Akt mit verschiedenen Wirkstoffen | 153 |
| Abb. 5.7-1 Schema der erhaltenen Ergebnisse der Akt1/DNA-PKcs-Kinase-Assays | 165 |
| Abb. 10.1 -1 Die in dieser Arbeit genutzten DNA- und Protein-Marker | 184 |
| Abb. 10.2-1 pBABE-puro und pBABE-eGFP | 184 |
| Abb. 10.2-2 pBABE-AKT1_WT-eGFP und pBABE-AKT1_E17K-eGFP | 185 |
| Abb. 10.2-3 pBABE-AKT1_R25C-eGFP und pBABE-myrAKT1(-PH)-eGFP | 185 |
| Abb. 10.2-4 pBABE-AKT1_TDSD-eGFP und pBABE-AKT1_K179A-eGFP | 186 |

Verzeichnis der Tabellen

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab 1 in der Arbeit verwendete Abkürzungen | 7 |
| Tab 2 Abkürzungen von Einheiten und Formelzeichen | 8 |
| Tab 3 Abkürzungen von Proteinamen..... | 8 |
| Tab 1.3.4-1 Akt1-Mutationen und ihre postulierten Effekte | 32 |
| Tab 3.1.1-1 Eingesetzte Verbrauchsmaterialien..... | 39 |
| Tab 3.1.2-1 Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien | 40 |
| Tab 3.1.3-1 Verwendeten Geräte | 41 |
| Tab 3.1.4-1 Verwendeten Kits | 43 |
| Tab 3.1.5-1 Eingesetzte Puffer und Lösungen | 43 |
| Tab 3.1.6-1 Eingesetzte Bakterienmedien und Medienzusätze | 46 |
| Tab 3.1.6-2 Eingesetzte Zellkulturmedien und Medienzusätze | 46 |
| Tab 3.1.6-3 Eingesetzte Wirkstoffe und Antibiotika | 46 |
| Tab 3.1.7-1 Verwendete Oligonukleotide | 47 |
| Tab 3.1.8-1 Verwendete Proteine..... | 47 |
| Tab 3.1.9-1 Verwendeten Primärantikörper..... | 48 |
| Tab 3.1.9-2 Verwendete Sekundärantikörper..... | 49 |
| Tab 3.1.10-1 Liste der verwendeten Plasmide | 49 |
| Tab 3.1.11-1 Liste der verwendeten Bakterienstämme | 50 |
| Tab 3.1.12-1 Liste der eingesetzten ursprünglichen Zelllinien | 50 |
| Tab 3.1.12-2 Liste der in dieser Arbeit erzeugten Zelllinien | 51 |
| Tab 3.1.13-1 Liste der eingesetzten Mausstämme | 51 |
| Tab 3.1.14-1 Verwendete Datenbanken | 52 |
| Tab 3.1.15-1 Genutzte digitale Auswertungs- und Bearbeitungsprogramme | 52 |
| Tab 3.2.2-1 Verwendetes Temperaturprogramm der PCR..... | 54 |
| Tab 3.2.3-1 Bestandteile des Restriktions-Doppelverdau | 54 |
| Tab 3.2.4-1 Verwendeter Ligationsansatz..... | 55 |
| Tab 3.4.4-1 Zusammensetzung SDS-Trenngel | 77 |
| Tab 3.4.4-2 Zusammensetzung SDS-Sammelgel..... | 77 |
| Tab 4.2.1-1 Erzeugte Akt1-Mutanten | 90 |
| Tab 4.3.2-1 Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien | 97 |

1 Einleitung

Krebs gehört zu den häufigsten auftretenden Erkrankungen und Todesursachen weltweit. Die globale Bedeutung von Krebserkrankungen ist in Abb. 1-1 dargestellt. Trotz der umfassender therapeutischen und diagnostischen Möglichkeiten, stellt diese Erkrankung für Wissenschaftler und Ärzte weiterhin eine Herausforderung dar. [38, 71, 73, 213]

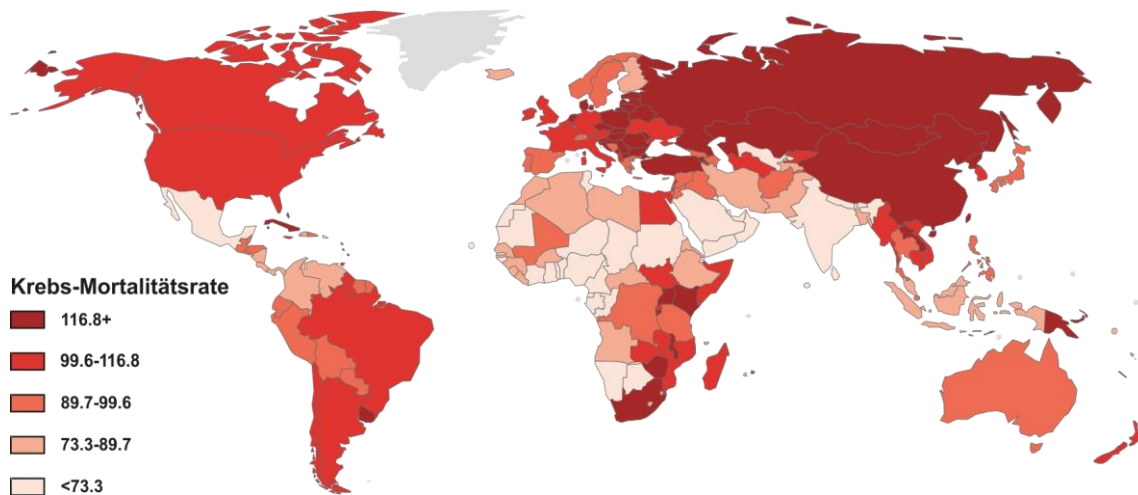


Abb. 1-1 Krebsmortalitätsraten weltweit im Jahr 2012

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Krebsmortalitätsraten bezogen auf die gesamte Welt im Jahr 2012. Die Mortalität ist als Rate pro 100.000 Personen pro Jahr angegeben. Die Darstellung verdeutlicht die globale Herausforderung und Verantwortung ausgelöst durch Krebserkrankungen verdeutlicht. Die Krebsmortalität ist als altersstandardisierte Rate angegeben. Verändert nach [38, 73]

Tumorerkrankungen weisen weltweit die höchsten Raten bei Neuerkrankung; Inzidenz, und Sterberate, Mortalität, auf. Im Jahr 2012 betrug die weltweite Inzidenz von Tumoren 14,1 Millionen und die Mortalität lag bei 8,2 Millionen. Hiervon waren zu 53% Männer und zu 47% Frauen betroffen [38, 71, 73, 213]. Voraussagen und Hochrechnungen bis zum Jahr 2030 gehen von einem Anstieg der Inzidenz auf 21 bis 22 Millionen von Neuerkrankungen aus [31].

Die vier häufigsten und tödlichsten Tumorarten sind in der Abb. 1-2 zusammengefasst. Brust-, Dickdarm-, Prostata- und Lungenkrebs, machen 46% der gesamten Mortalität aus [38, 71, 73, 213]. Aufgrund der hohen Inzidenz, Mortalität und Prävalenz von Tumorerkrankungen sowie dem daraus entstehendem Leid und der auftretenden Kosten ist es essentiell die Behandlung von Tumoren zu verbessern. Die aktuelle Forschung hat das Ziel, die Behandlung von Tumoren an verschiedensten Ansatzpunkten zu optimieren und unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren [16, 240]. Aktuell unterscheidet man in der Behandlung von Tumoren drei mögliche Therapieformen, die miteinander kombinierbar sind;

das operativer Vorgehen, Radiotherapie und Chemotherapie. Optimierungen der

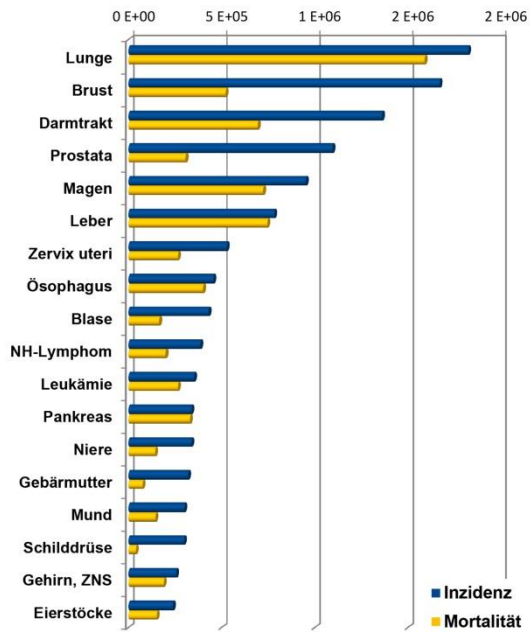


Abb. 1-2 Inzidenz- und Mortalitätsraten verschiedener Tumorarten im Jahr 2012

Das Balkendiagramm stellt Inzidenzen und Mortalitätsraten bezogen auf die Krebslokalisationen im Jahr 2012 dar. Erstellt anhand von Daten aus [38, 73]

Therapieformen für die häufigsten Tumorarten könnten bereits eine enorme Verringerung der Mortalität bewirken. Aktuelle Ziele der Wissenschaft sind unter anderem die Erhöhung der Tumor-Antwort auf Strahlentherapie durch das Sensitivieren von Tumorzellen und deren Umgebung, die Modulation der Antwort auf DNA-Schaden sowie das Eingreifen in Signaltransduktionswege. [16, 240]

Hierbei ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB, Akt)-Signalweg intensiv erforschter Ansatzpunkt, der in der Tumorentwicklung verändert sein kann [222]. Akt spielt in diesem Signalweg eine essentielle Rolle und nimmt eine Schlüsselposition in der Regulation der Zellfunktion ein. [1, 39, 109, 224]

1.1 Strahlentherapie und ionisierende Strahlung

1.1.1 Bedeutung der Strahlentherapie bei der Behandlung von Tumoren

Im Jahr 1895 wurden von Wilhelm Conrad Röntgen die Röntgenstrahlen entdeckt. Seitdem wird ionisierende Strahlung in der Medizin zur Diagnostik und Therapie verwendet [178]. Radiotherapie ist die Verwendung von Strahlung zur Behandlung von Krankheiten. Hierzu werden vor allem hochenergetische Photonen (Röntgenstrahlen) eingesetzt. Die Strahlentherapie mit ionisierenden Strahlen ist heutzutage ein essentieller Teil der modernen Therapie von Tumoren. Etwa 40% der Krebspatienten weltweit erhalten eine Strahlentherapie als Teil ihrer Behandlung [52]. Nach Hochrechnungen von Barton *et al.* sollten für eine optimale Therapie mindestens 52% aller Patienten mit einem Tumor eine Strahlentherapie erhalten; dies wird durch eine weltweit unterschiedliche Verfügbarkeit der Strahlentherapie eingeschränkt [13, 14]. Schätzungen der Internationalen Atom-Energie-Behörde (IAEA) zufolge fehlen in Entwicklungsländern mindestens 5000 Radiotherapiegeräte. Als Folge

dessen können 70% der Krebspatienten, die von Strahlentherapie profitieren könnten, nicht ausreichend behandelt werden.

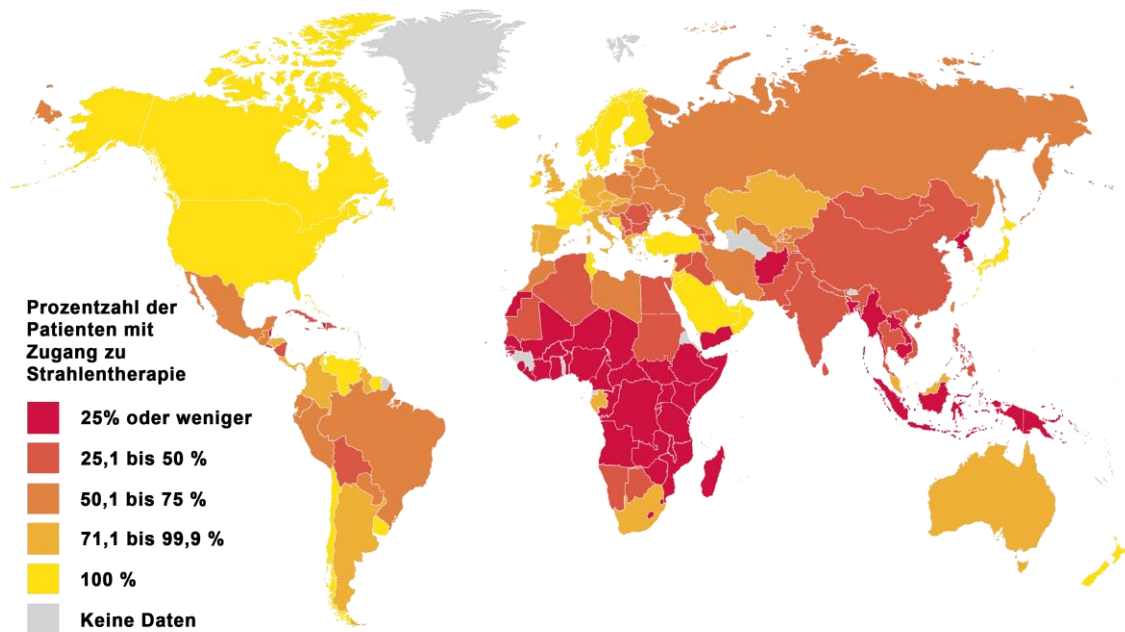


Abb. 1.1.1-1 Weltweiter Zugang zu Strahlentherapie im Jahr 2012

Dargestellt ist der weltweite Zugang zu Strahlentherapie im Jahr 2012. Sie hebt die lokalen Disparitäten bezüglich dieser Therapieoption hervor. Verändert nach [3, 38, 73]

Es existieren große Bereiche der Welt mit sehr gutem Zugang zur Strahlentherapie, wie Abb. 1.1.1-1 demonstriert. Insbesondere in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika liegt die flächendeckende Versorgung mit Strahlentherapie zwischen 70 und 100%. [3, 38, 73]. Von den vier häufigsten Tumorarten werden Patienten mit Brusttumoren in 24 bis 81%, abhängig von dem Land, mit einer Bestrahlungstherapie behandelt, eine optimale Versorgung wäre bei 83% gewährleistet. Für Dickdarntumore werden in ein bis sechs Prozent bestrahlt, ideal wären 16%, Prostata in 16-51%, optimal wären 60% und Lungenkrebs in 36 bis 71%, notwendig wären 76%. [52]

Trotz der hohen Verfügbarkeit in einigen Teilen der Welt, bleibt die Mortalität von Tumorpatienten weiterhin hoch verglichen mit anderen Erkrankungen. Neben der Verfügbarkeit der Radiotherapie sollte deswegen auch die Therapieform und ihre Effizienz verbessert werden. Eine Radiotherapie kann auf verschiedene Arten erfolgen. Man unterscheidet externe und interne Strahlentherapie. Externe Strahlentherapie wird von außen durch Linearbeschleuniger appliziert. Die interne Strahlentherapie kann das Trinken radioaktiver Flüssigkeiten oder die Implantation einer radioaktiven Strahlenquelle, die Brachytherapie, umfassen. Die Strahlentherapie kann als alleinige Behandlung angewandt

oder in Kombination mit anderen Behandlungen, wie operativem Vorgehen, Chemotherapie, Hormontherapie oder Immuntherapien, kombiniert werden. Das Ziel der Radiotherapie kann kurativ oder palliativ, zur Symptomlinderung sein. Es wird zwischen adjuvanter, nach einer Operation, und neoadjuvanter Therapie, vorbereitend auf eine Operation, unterschieden. [52, 136, 219]

Ein begrenzender Faktor der Strahlentherapie ist die akute und späte Toxizitätsreaktion gegenüber normalen Tumor-umgebenden Geweben und die darauffolgende Abnahme der Lebensqualität. Weitere begrenzende Faktoren sind intrinsische Resistenzen (vgl. Abb. 1.1.2-1), die Repopulation nicht abgetöteter Tumorzellen bzw. Tumorstammzellen. Besonders in ausgedehnten und schnellwachsenden Tumoren kann es zu hypoxischen Arealen kommen, in denen die Abwesenheit von Sauerstoff, zu einer Verringerung der Effektivität der Strahlentherapie führen kann. [77, 94, 218]

So ist das lokale Wiederauftreten von Primärtumoren und Fernmetastasen immer noch die häufigste Todesursache bei Patienten mit Krebs [48]. Weiterhin können Tumorzellen, die sich während des Behandlungszeitraumes vermehren, den Therapieerfolg einschränken [230]. Des Weiteren zeigen einige Tumorarten eine Radioresistenz [227]. All diese Faktoren können in einer suboptimalen Tumorkontrolle durch Bestrahlungstherapie resultieren.

In der akuten Phase sind die Nebenwirkungen der Strahlentherapie abhängig von Art, Dauer und Lokalisation der Behandlung. Es kann in Müdigkeit, Schwächegefühl, Dyspnoe, Veränderungen der Haut, Juckreiz, Haarausfall im Behandlungsbereich, allgemeine abdominelle Beschwerden, wie Schmerzen, Diarrhoe, Übelkeit, Schluckbeschwerden, Gewichtsverlust, bis hin zu Infertilität resultieren. Des Weiteren können Blutbildveränderungen wie Anämie und Neutropenie auftreten. Langfristige Nebenwirkungen als Ausdruck der späten Toxizitätsreaktion sind Veränderung der Hautfarbe in dem Behandlungsbereich, ein trockener, entzündeter Mundbereich, Pneumonitis, Impotenz, chronische Schmerzsyndrome, Blasenentzündungen sowie Magen- und Darmbeschwerden. [3, 38, 73]

Die Strahlentherapie hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte bezüglich der Genauigkeit der Bestrahlung, der Dosisanpassung, der Optimierung der Bildgebung und kombinatorischer Therapien gemacht, sodass nicht befallenes Gewebe weniger Strahlung ausgesetzt ist [22]. Trotz diverser therapeutischer Möglichkeiten und Kombinationen von Therapien, wie ionisierender Strahlung (IR), Operationen, Chemotherapie und zielgerichteter medikamentöser Therapie, besteht in diesem Bereich dennoch enormes Potenzial und Bedürfnis für Weiterentwicklung, da die auftretenden unerwünschten Nebenwirkungen und begrenzenden Faktoren der Therapie bislang nicht gänzlich gelöst werden konnten.

Das Ziel der aktuellen Forschung ist, die Behandlungsprotokolle und Bestrahlungsvorgänge zu optimieren, kombinatorische Effekte verschiedener Therapien zu nutzen und auf molekularer Ebene die zielgerichtete medikamentöse Therapie voranzutreiben [16, 240]. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze, die verfolgt werden. Auf der einen Seite wird an der Verbesserung der Bestrahlungstechnik und Strahlenapplikation geforscht. Ansätze finden sich hier in der Kombination von externer und interner Strahlentherapie, oder in verschiedenen Arten, Dosierungen und Häufigkeiten der Strahlungsapplikation, wie hyperfraktionierte oder hypofraktionierte Strahlentherapie [116, 149]. Beispielsweise kann der Einsatz von Protonen statt der Photonenbestrahlung zu einer verminderten Strahlenbelastung von Risikoorganen, sowie einer generell verbesserten Dosisverteilung im Nicht-Zielgewebe führen [161], was unter anderem zu einer deutlich halbierten Inzidenz sekundärer Neoplasien führt [177].

Auf der anderen Seite wird versucht die kombinatorischen Effekte besser zu nutzen, wie interne Radiotherapie während, vor oder nach einer Operation, die Kombination mit Chemotherapie, hormonellen oder immunologischen Therapien oder die zusätzliche Gabe von Antikörpern oder Inhibitoren der Signaltransduktion [116].

Zu diesen Ansatzpunkten gehört ebenso die Erhöhung der Tumor-Antwort auf Strahlentherapie durch Sensitiveren von Tumorzellen und deren Umgebung, die Modulation der Antwort auf Schäden der Desoxyribonukleinsäure eines Organismus, das Eingreifen in Signaltransduktion sowie eine genetische Herangehensweise. Dies hat zu Überlegungen geführt, die DNA-Reparatur, insbesondere Doppelstrangbruch(DSB)-Reparatur, zu beeinflussen, mit dem Ziel die Tumorzellen für eine Behandlung mit ionisierender Strahlung zu sensibilisieren. Hierbei fungieren Moleküle der DSB-Reparatur als Ziel, wie z.B. die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). [222]

1.1.2 Strahleninduzierte Schäden und zelluläre Antwort

Mit Hilfe ionisierender Strahlung werden unter anderem DNA-Schäden in den Tumorzellen verursacht, wodurch die gesteigerte Proliferation der Tumorzellen gehemmt und Zelltod (u.a. Apoptose) ausgelöst wird. Strahlung induziert an mehreren Stellen Schäden an der DNA, dies umfasst sowohl Schäden an den Nukleinbasen, als auch an den Zucker- bzw. Phosphat-Molekülen des DNA-Rückgrats. [87, 94]

Ionisierende Strahlung regt durch die vermittelte Energie Atome bzw. Moleküle an, sodass ihre Elektronen ein höheres Energieniveau erreichen. Wenn diese Energie die Bindungsenergie des Elektrons übersteigt, wird es aus dem Atom herausgelöst. Ein zuvor neutrales Atom wird so zu einem positiven Ion, es wird ionisiert. Das herausgelöste Elektron

kann ebenso ionisierend wirken. Die Energiemenge, die durch ionisierende Strahlung auf eine bestimmte Materialmenge übertragen wird, bezeichnet man als Energiedosis, ihre Einheit ist das Gray (Gy) ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). Durch ionisierende Strahlung kann es innerhalb von Zellen durch direkte oder indirekte Wechselwirkungen zu Schäden an der DNA kommen. Direkte Wechselwirkungen durch ionisierende Strahlung entsteht durch Energieübertragung eines Photons auf Sekundärelektronen. Diese geben die Energie direkt an die Zucker und Phosphate des DNA-Rückgrats oder die Nukleinbasen weiter und führen so zur Lösung von Bindungen und Ionisation, die resultiert in Strangbrüchen und Verlust von Nukleinbasen. Im Falle der indirekten durch ionisierende Strahlung ausgelösten Schäden hingegen wirken freie Elektronen auf die DNA-umgebende Moleküle. Organische Zellen bestehen zu über 80% aus Wasser, sodass die überwiegenden ionisierenden Wechselwirkungen das umgebende Wasser betreffen. Die hierbei auftretende Spaltung der Wasser-Moleküle, die Radiolyse des Wassers, resultiert in Hydroxyl-Radikalen, die wiederum die DNA schädigen können. [87, 94]

Die Schäden können Brüche an Einzel- oder Doppelsträngen durch Spaltung der Phosphatesterbindungen hervorrufen. Basenverlust kann bei Schädigung von Zucker-Basen-Bindungen auftreten, aber auch Veränderungen an den Basen wie Desaminierung, Dimerisierung oder Oxidierung können entstehen. Wenn die entstandenen Schäden nicht repariert werden, können ebenso Doppelstrangbrüche auftreten [20, 62, 125]. DSB sind die am stärksten toxische Form der Schädigung, die durch ionisierende Strahlung an der DNA hervorgerufen werden kann. Durch Doppelstrangbrüche werden verschiedene Signalwege initiiert, so kann abhängig von Dosis und Strahlenempfindlichkeit der Zelle Zelltod ausgelöst werden. Es werden die Kinasen Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) und Ataxia Telangiectasia And Rad3-related (ATR) aktiviert, die über nachgeschaltete Signalkaskaden Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen bzw. Apoptose einleiten können [63, 66, 107]. Im Fall von nicht stattgefundenen oder unzureichender Reparatur wird der Zelltod eingeleitet, um ein Weiterbestehen oder Vermehren von Veränderungen im Genom sowie eine daraus möglicherweise entstehende Onkogenese zu verhindern. [20, 62, 125]

Der Zelltod wird definiert als das vollständige Erliegen des Stoffwechsels und mündet in dem irreversiblen Verlust der morphologischen Integrität der Zelle. Zu den drei Formen des Zelltodes zählen Apoptose, Autophagozytose und (programmierte) Nekrose. Während manche Tumorzellen mit diesen Mechanismen auf Bestrahlung reagieren, kann alternativ auch die mitotische Katastrophe die Folge sein. Hierbei führt der Verlust an genetischem Material, Chromosomberrationen und dem resultierenden Mangel an Protein-kodierenden Genabschnitten zu einem Erliegen der Zellteilung. [142]

Mediatorprotein in der Apoptose, dem Zellzyklusarrest und der DNA-Reparatur [120]. Es ist ein Protein mit geringer Stabilität, das erst durch posttranslationale Modifikation in der Lage ist, als Transkriptionsfaktor auf viele verschiedene Gene zu wirken.

Unter anderem wird z.B. die p21-Expression in der Zelle reguliert. Dieses Protein hemmt als Ligand die Cyclin-abhängigen-Kinasen-Komplexe (CDK) in der Zelle und führt so zu einem Zellzyklusarrest, der es der Zelle ermöglicht, beschädigte DNA zu reparieren [58]. Auf die gleiche Weise ist p53 an der Regulation von Proteinen der Bcl-2-Familie beteiligt, vor allem des Proteins Bcl-2-associated X Protein (Bax). Dieses dient dazu, den intrinsischen Weg der Apoptose einzuleiten, indem es die Cysteinproteasen Caspase 9 und 3 durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aktiviert. [207]

Die Abb. 1.1.2-1 zeigt schematisch noch andere mögliche molekulare Antworten auf Bestrahlung. Ein direkterer Weg, Bax zu aktivieren, kann durch das Sphingolipid Ceramid erfolgen. In diesem Fall führt die ionisierende Strahlung zu Veränderungen in der Zellmembran und so zur Aktivierung von Sphingomyelinase, die die enzymatische Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid katalysiert [114]. Dieses aktiviert als Signalmolekül das Bax-Protein und damit die Apoptose (s. Abb.1.1.2-1). Abgesehen davon kann Ceramid auch *de novo* durch Ceramid-Synthase synthetisiert werden, die durch Schäden an der DNA aktiviert wird [2]. Auch kann Bestrahlung durch die Hochregulation von CD95/CD95L den extrinsischen Zelltod fördern [17].

Über ATM und ATR kann p53 aktiviert werden, wenn Reparaturmechanismen versagen [83]. Die Aktivierung und erhöhte Expression von p53 löst unter anderem die Synthese von proapoptischen Molekülen aus. Es wird ein intrinsischer und extrinsischer apoptotischer Zelltod vermittelnder Signalweg unterschieden. Die intrinsische Apoptose wird durch äußere Einflüsse und DNA-Schädigung initialisiert und durch die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert [221], während der extrinsische Apoptoseweg durch Todesrezeptoren, wie Fas, vermittelt wird. Bcl-2 ähnliche Proteine beeinflussen dabei die Aktivierung von Caspase-Signalwegen sowie die apoptotischen Veränderungen der Mitochondrien. [6, 110]

Die Caspaseaktivierung, -rekrutierung, -domänisierung und autokatalytische Spaltung, wichtige Schritte in der Apoptoseinduktion [64, 212], erfolgen durch die Zusammenlagerung eines Rezeptorkomplexes bestehend aus dem Fas-Rezeptor und aggregiertem Todesrezeptorprotein zu einem Liganden-Rezeptorkomplex, Apoptosom oder dem todinduzierenden Signalkomplex (DISC) [154]. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. Caspase-8-Inhibition, wird der Signalweg Richtung Nekrose geführt. IR kann ebenso ER-Stress hervorrufen oder Autophagozytose als Reaktion auf die Akkumulation von oxidierten

oder fehlgefalteten Proteinen. [88, 162] (Abb. 1.1.2-1 Molekulare Antwort von Zellen auf Bestrahlung)

Die Protein Kinase B (PKB oder Akt) wird ebenfalls mit der Regulation von Apoptose als Antwort auf Bestrahlung in Verbindung gebracht. Akt reguliert verschiedene Transkriptionsfaktoren und wirkt so unter anderem indirekt auf die Proteine der Bcl-2-Familie, wie das Unterdrücken der Apoptose durch Akt-bedingte Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death (BAD)-Phosphorylierung. Fällt dieses Überlebenssignal aus, wird ein Signalweg initiiert, der die Transkription von verschiedenen Zelltod-Genen, wie dem Gen für das Protein Fas-Ligand, induziert [111]. Des Weiteren reguliert Akt ebenso Proteine der Bcl-2-Familie in antiapoptotischer Weise, sobald Akt als Überlebenssignal ausfällt, wird die Apoptose gefördert [111]. Da Akt beispielsweise in Prostatakrebs und Mammakarzinomen hochreguliert und bei bestimmten Lungenkrebsarten dauerhaft aktiv ist, fördert es das zelluläre Überleben und die Therapieresistenz auf Chemotherapie und Bestrahlung durch Inhibition apoptotischer Signale. [32, 102, 113]

Die Autophagozytose beschreibt einen zellulären Mechanismus des Selbstabbaus. Es wird unter anderem durch Nährstoffmangel, speziell dem Mangel an Aminosäuren, eingeleitet. Sie zeichnet sich wiederum durch eine Akkumulation von autophagischen Vakuolen in der Zelle aus. Innerhalb dieser Vakuolen werden Zellorganellen und andere beschädigte zytosolische Bestandteile sowie geschädigte Proteine in Lysosomen abgebaut. Der PI3K/Akt-Signalweg spielt ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Autohagozytose mittels indirekter Aktivierung des Autophagozytose-Regulators mTOR durch Akt. [200, 233]

Ebenso kann direkt eine programmierte Nekrose ausgelöst werden, bei der über ein Heterodimer von Receptor-interacting protein 1 und 3 (RIP1 und RIP3) Nekrosom gebildet wird, sodass die Nekrose über mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore eingeleitet wird. [65, 68, 162]

Falls das zelluläre Gleichgewicht dieser Signalwege nicht direkt zum Tod der Zelle führt, wird der Zellzyklus gestoppt und sehr früh nach der Schädigung die Reparatur der DNA eingeleitet. Dieser Vorgang verhindert eine Akkumulation von Schäden in der Zelle und damit einer potentiellen Entartung eines Gewebes. [2, 162]

1.2 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-DSB können durch verschiedene chemische und physikalische Einflüsse entstehen. DSB sind die Unversehrtheit und die Funktion der Zellen gefährdende DNA-Läsionen, die nicht nur durch IR entstehen können. DNA-Schäden können durch sogenannte Ionisations-Cluster lokal gehäuft vorkommen. In solchen Bereichen kann es durch verschiedene Faktoren zu DSB kommen. Neben dem direkten DSB können auch chemische und enzymatische Prozesse am Ort eines Einzelstrangbruchs so zu DSB führen. Da DSB schwere biologische Effekte verursachen können, besitzen die Zellen effektive Reparaturmechanismen, um diese Läsionen wieder zu reparieren und die Integrität des Genoms zu bewahren. Im Fall von nicht stattgefundenener oder unzureichender Reparatur von DSB-Schäden, können die Mutationen bei der Mitose weiterbestehen und sich akkumulieren. Das wiederum kann zu Zelltod, Verlust genetischer Informationen, Chromosomenanomalien, Mutagenese und schließlich Karzinomentwicklung führen [20, 62, 125]. Durch Doppelstrangbrüche werden die Kinasen ATM und ATR aktiviert, die über nachgeschaltete Signalkaskaden Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen bzw. Apoptose einleiten können [63, 66, 107]. Beide Kinasen sind verantwortlich für die Phosphorylierung des Histons H2A (H2AX) zu γ -H2AX als eine der ersten Reaktionen auf DNA-Schäden [36, 147]. An diese Schäden werden weitere DNA-Reparatur-assoziierte Proteine rekrutiert, um durch Reparatur des DNA-Schadens die Integrität des Genoms zu bewahren und potentielle negative Folgen für die Zelle zu umgehen. Man kann zwei verschiedene Reparaturmechanismen differenzieren, homologe Rekombination (HRR) sowie das non-homologous end joining (NHEJ). Das NHEJ kann weiter in DNA-PK-abhängiges und Backup-NHEJ (bzw. das alternative NHEJ) unterteilt werden. Alternatives NHEJ (B-NHEJ) wird in der Abwesenheit der D-NHEJ-Agenten aktiviert. [145, 192, 199, 203]

Die Reparaturmechanismen unterscheiden sich stark voneinander. Während HRR homologe, unbeschädigte DNA-Sequenzen als Vorlage für die Strangbruchreparatur benötigt, werden beim NHEJ zwei Doppelstrangbruchenden ohne homologe Vorlage verbunden. Das ist ein Grund, warum NHEJ schneller abläuft als HRR. Nachteil der Schnelligkeit und Effizienz der DNA-Reparatur durch NHEJ ist, dass es schneller zu Deletionen und Mutationen kommen kann. In Säugetierzellen beträgt das Verhältnis zwischen NHEJ und HRR ca. 3:1, also werden 75% der DSB durch NHEJ repariert. Welcher Mechanismus in einem speziellen Fall genutzt wird, hängt von der chromosomalen Lokalisation des DSB ab, aber auch von den vorliegenden 3'- und 5'-Enden der DNA. [140]

1.2.1 DNA-PK-abhängiges non-homologous end joining (D-NHEJ)

Der Proteinkomplex DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) besteht aus einer katalytischen Untereinheit und den Proteinen Ku70 und Ku80. Die katalytische Untereinheit

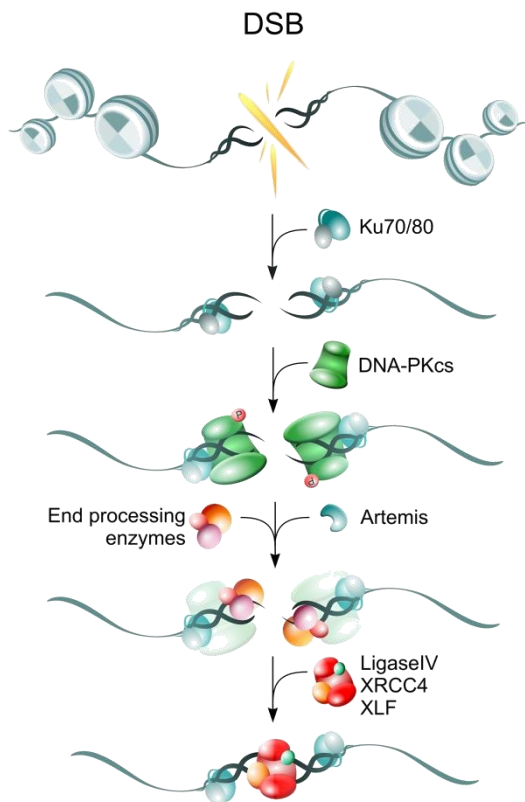


Abb. 1.2.1-1 D-NHEJ Mechanismus

Diese Abbildung zeigt schematisch den Ablauf des D-NHEJ Mechanismus. Nach einem Doppelstrangbruch ermöglicht Ku die Anlagerung der Kinase DNA-PKcs. Ku70/80 schützt die DNA-Stränge vor Exonukleasen und rekrutiert die Artemis-Nuklease, die die freien DNA-Enden prozessiert und so dem LigIV/XRCC4/XLF-Komplex die DNA-Verknüpfung ermöglicht. Bei NHEJ gibt es keinen Mechanismus, der die DNA-Sequenz auf Vollständigkeit und Richtigkeit überprüft. [145]

Polynukleotid-Kinase weitergeführt, die die ligierbaren Enden generieren. Die DNA-Polymerasen λ und μ füllen fehlende Basen wieder auf. Es folgt die Bindung des DNA-Ligase IV/XRCC4-Ligationskomplexes an den gebildeten Komplex [60, 129].

der DNA-PK (DNA-PKcs) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, der PI3K-Familie. DNA-PK ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) im Rahmen des D-NHEJ beteiligt. Das DNA-PK-abhängige NHEJ benötigt keine homologe Vorlage, deswegen kann D-NHEJ während des gesamten Zellzyklus stattfinden. Die Reparatur läuft innerhalb von Minuten ab, somit schneller als bei der HRR (vgl. Abschnitt 1.2.3), ist jedoch fehleranfälliger, da es ohne homologe Matrize abläuft [192]. Der Mechanismus des D-NHEJ ist in Abb. 1.2.1-1 dargestellt. Der NHEJ Reparatur-Komplex besteht aus DNA-PKcs mit einem Ku70 / Ku80-Heterodimer, X-ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4), XRCC4-like factor (XLF) sowie DNA-Ligase 4 (LIG4) [128, 163]. Ku70 und Ku80 lagern sich an die Doppelstrangbrüchenden an, um die Bindung an DNA-PKcs vorzubereiten, sowie die Enden vor Abbau durch Exonukleasen zu schützen [220]. Die Bildung dieses Komplexes bewirkt eine Phosphorylierung sowie Autophosphorylierung an den Stellen, T2620/S2624, T2638, T2647 und S2612 [60]. Die Wiederverknüpfung der DNA-Stränge wird durch die Anlagerung der Nuklease Artemis und der

1.2.2 DNA-PK-unabhängiges non-homologous end joining (B-NHEJ)

In D-NHEJ-defizienten Zellen wurde eine alternative Form des DNA-end-joinings gefunden, die insbesondere während der G₂-Phase aktiv ist. Es wird angenommen, dass B-NHEJ

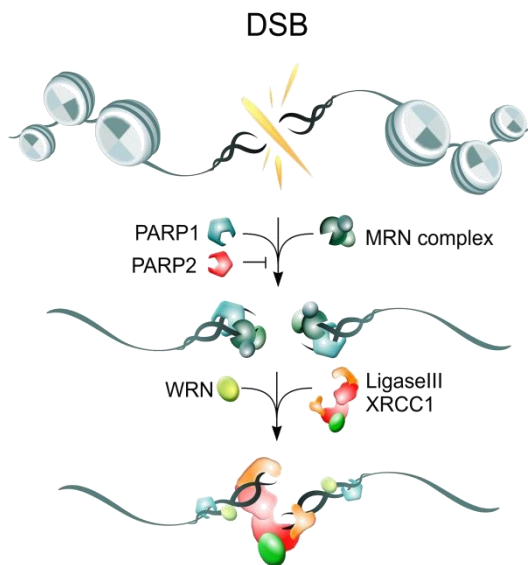


Abb. 1.2.2-1 B-NHEJ-Weg der DNA-Reparatur

Diese Abbildung zeigt schematisch den Ablauf von B-NHEJ. Nach der Assoziation von PARP1 mit den freien DNA-Enden kann sich der MRN anlagern, der, statt des LigIV/XRCC4/XLF-Komplexes, den LigIII/XRCC1-Komplex zur Reparatur des Doppelstrangbruchs rekrutiert. PARP1 konkurriert zu Beginn mit Ku um die Assoziation mit den freien DNA-Enden, wobei Ku eine höhere Affinität aufweist. Deshalb wird der Großteil der DSBs auch durch den D-NHEJ-Weg repariert. [145]

stattfindet, wenn D-NHEJ und HRR versagen. Am B-NHEJ soll die DNA Ligase III und die Poly-ADP-Ribose-Polymerase I (PARP1) beteiligt sein [231]. Der Mechanismus von B-NHEJ ähnelt dem D-NHEJ, ist jedoch langsamer, weniger effizient und fehleranfälliger. Die Wahrscheinlichkeit, dass es zu Translokationen zwischen verschiedenen Chromosomen kommt, ist ebenfalls größer. Jedoch ist eine stärkere Prozessierung der DNA-Enden möglich [192].

Der Mechanismus von B-NHEJ ist in Abb. 1.2.2.-1 dargestellt. Nach der Assoziation von PARP1 im Bereich der freien DNA-Enden kann sich der Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1, anlagern. Dies ermöglicht auch dem C-terminal Protein 1 Interacting Protein (CtIP) und der Werner Syndrome Helicase (WRN), sich am B-NHEJ zu beteiligen und führt zu einer Rekrutierung des LigIII/XRCC1-Komplexes statt des LigIV/XRCC4/XLF-Komplexes, der aus dem D-NHEJ-Weg bereits bekannt ist. Die Ligase-

komplexe beider Wege führen zur Ligation. PARP1 konkurriert zu Beginn mit Ku um die Assoziation mit den freien DNA-Enden, wobei Ku eine höhere Affinität aufweist [231]. Deshalb wird der Großteil der DSBs durch den D-NHEJ-Weg repariert. Sowohl D-NHEJ, als auch B-NHEJ korrigieren DNA-Doppelstrangbrüche ohne Berichtigung etwaiger Mutationen, Deletionen oder Translokationen. Wesentlich mehr Wert auf Richtigkeit der Sequenz und Lokation bzw. Berichtigung der eventuell auftretenden Fehler wird im Mechanismus der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination gelegt. [192]

1.2.3 Homologe Rekombinationsreparatur (HRR)

Homologe Rekombination ist abhängig vom Vorhandensein homologer

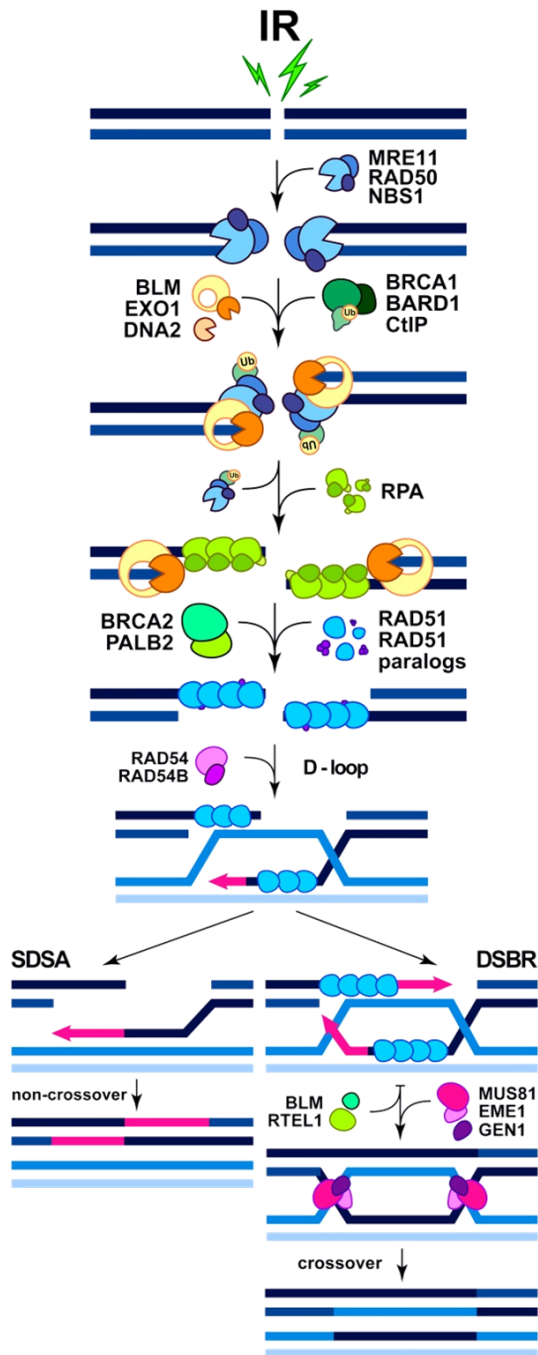


Abb. 1.2.3-1 Initiierung und Ablauf der HRR

Diese Abbildung zeigt schematisch die notwendigen Schritte zur Erstellung des präsynaptischen Rad51-Filaments, um das Schwesterchromosom als Vorlage zur DNA-Reparatur nutzen zu können. Verändert nach [146]

Schwesterchromatiden und unbeschädigter DNA-Sequenzen als Vorlage und kann somit nur ablaufen, nachdem die semikonservative DNA-Replikation abgeschlossen wurde. Folglich kann HRR nur in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfinden. Die Verwendung des homologen Chromosoms als Matrize z.B. in der G1-Phase wird vermeintlich sogar aktiv unterdrückt, um einen Verlust von Heterozygotie zu vermeiden. [10, 164]

Die HRR ist auf Grund des größeren Aufwands auf molekularer Ebene ein komplexerer und langsamerer Mechanismus als NHEJ [140]. Ebenso ist die HRR weniger fehleranfällig, da keine Nukleotide zur Erzeugung überstehender Enden entfernt werden müssen [185]. Initiierung und Ablauf der HRR ist in Abb. 1.2.3-1 zu sehen.

Der Mechanismus wird durch Doppelstrangbrüche in den Schwesterchromatiden initiiert, das Schwesterchromosom dient als Matrize und wird als Vorlage für die Reparatur verwendet. Initial wird das Brustkrebsgen1 (BRCA1) durch ATM phosphoryliert und darauffolgend an den DSB rekrutiert [66]. Es akkumulieren weitere Proteine, unter anderem Rad51 und BRCA2. Inaktivierung von HRR-Genen fördert Radiosensitivität und genomische Instabilität und kann Tumorentstehung fördern. [146]

1.3 Der PI3K/Akt-Signalweg in der Onkologie

1.3.1 Die Proteinkinase B (Akt)

Bei Akt handelt es sich um eine 57 kDa große Serin-Threonin-Kinase, die eine N-terminale Pleckstrin-Homology-(PH)-Domäne, eine zentrale katalytische sowie eine C-terminale regulatorische, hydrophobe Domäne (HD) aufweist [18]. Es werden drei humane Isoformen, Akt1, Akt2 und Akt3 (PKB α , β und γ), unterschieden, die sich in ihrer Sequenz sehr ähneln [81, 158]. Für diese Arbeit relevant ist die Isoform Akt1 (PKB α). Akt1 wird ubiquitär exprimiert.

Akt kann bei Krebserkrankungen hyperaktiviert sein. Es spielt eine essentielle Rolle in der Regulation von Zellfunktionen, einschließlich Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese, Glukosestoffwechsel, Invasion und Überleben bei Zellstress sowie vielen Weiteren. [1, 39, 109, 224]

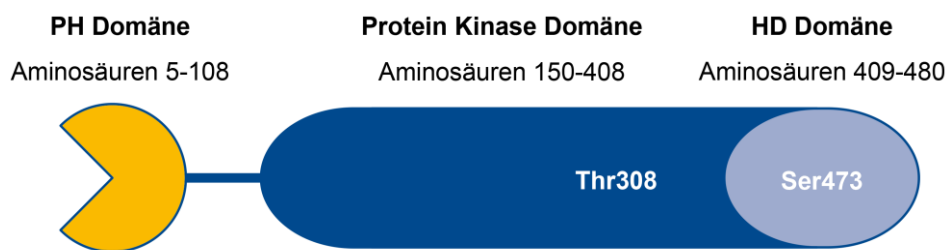


Abb. 1.3.1-1 Schematische Darstellung des Akt1-Aufbaus

Das humane Akt1 setzt sich aus einer N-terminalen PH-Domäne, einer Kinase-Domäne und einer C-terminalen HD-Domäne zusammen. Am Eingang der Substratbindetasche sitzt die Phosphorylierungsstelle Threonin 308, die für die Aktivierung von Akt essentiell ist. Das phosphorylierbare Serin 473 hingegen befindet sich am Ende der regulatorischen Domäne in einem flexiblen Loop.

Die Akt-Aktivität wird durch Phosphorylierung an Threonin 308 (T308) und Serin 473 (S473) bzw. durch Hemmung der Dephosphorylierung reguliert [18, 28, 49]. Für die Aktivierung wird dabei im Allgemeinen eine Translokation von Akt und der aktivierenden Kinase(n) zur Plasmamembran benötigt [18, 49]. Der Aufbau von Akt1 ist in Abb. 1.3.1-1 schematisch und die dreidimensionale Proteinstruktur in Abb. 1.3.1-2 dargestellt.

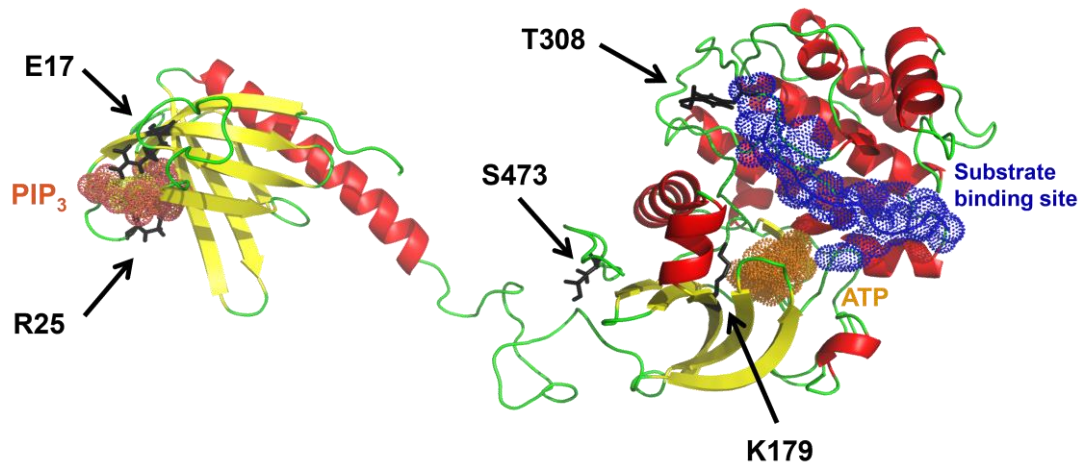


Abb. 1.3.1-2 Dreidimensionale Struktur von Akt1

Links ist die PH-Domäne von Akt1 dargestellt, die zur Bindung an PIP₃ dient. Rechts im Bild sind die regulatorische und die katalytische Domäne mit ihrer Substratbindungs- sowie ihrer ATP-Bindestelle zu sehen. Die Pfeile weisen auf die Phosphorylierungsstellen von Akt1 (T308 und S473), sowie die im Folgenden beschriebenen Mutationsstellen der PH-Domäne (E17, R25) und der ATP-Bindestasche (K179A) hin. Editiert von S. Oeck, Quelle: RSCB 1UNP, 3O96, [115].

1.3.2 Der PI3K/Akt-Signalweg

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt in vielen wichtigen zellulären Prozessen eine Rolle, hierunter sind Zellwachstum, Migration, Überleben sowie Glukosemetabolismus zu nennen [19, 39]. Der Signalweg kann aber auch zur Tumorentwicklung beitragen. [32, 76]

Der PI3K-Signalweg wird durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Integrine oder zellulären Stress stimuliert. Initiiert wird der Signalweg durch die Aktivierung und der daraus folgenden Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Dies führt zu einer Translokation des multidomänen Proteins PI3K an die Zellmembran sowie der Aktivierung des PI3K. Die katalytische Untereinheit der PI3K gelangt somit in räumliche Nähe zu ihrem membranständigen Substrat, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Dieses wird unter ATP-Verbrauch an der Position D3 zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert. PIP₃ ist ein Signalmolekül, das die Aktivierung weiterer Signalwege ermöglicht. [98]

PIP₃ rekrutiert Proteine wie Akt und Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (PDK-1), welche mit ihrer PH-Domäne PIP₃ koordinieren können. PDK-1 phosphoryliert Akt am T308, wodurch Akt aktiviert wird [74]. Diese Phosphorylierung erhöht die Aktivität von Akt1 hundertfach. Für eine maximale Aktivierung muss Akt zusätzlich von einem Protein der PDK-2-Familie am Serin 473 phosphoryliert werden, was zu einer weiteren zehnfachen

Erhöhung der Aktivität führt [188]. Der Ablauf der Aktivierung und der weitere Signalweg von Akt1 sind mechanistisch in der Abb. 1.3.2-1 aufgezeigt.

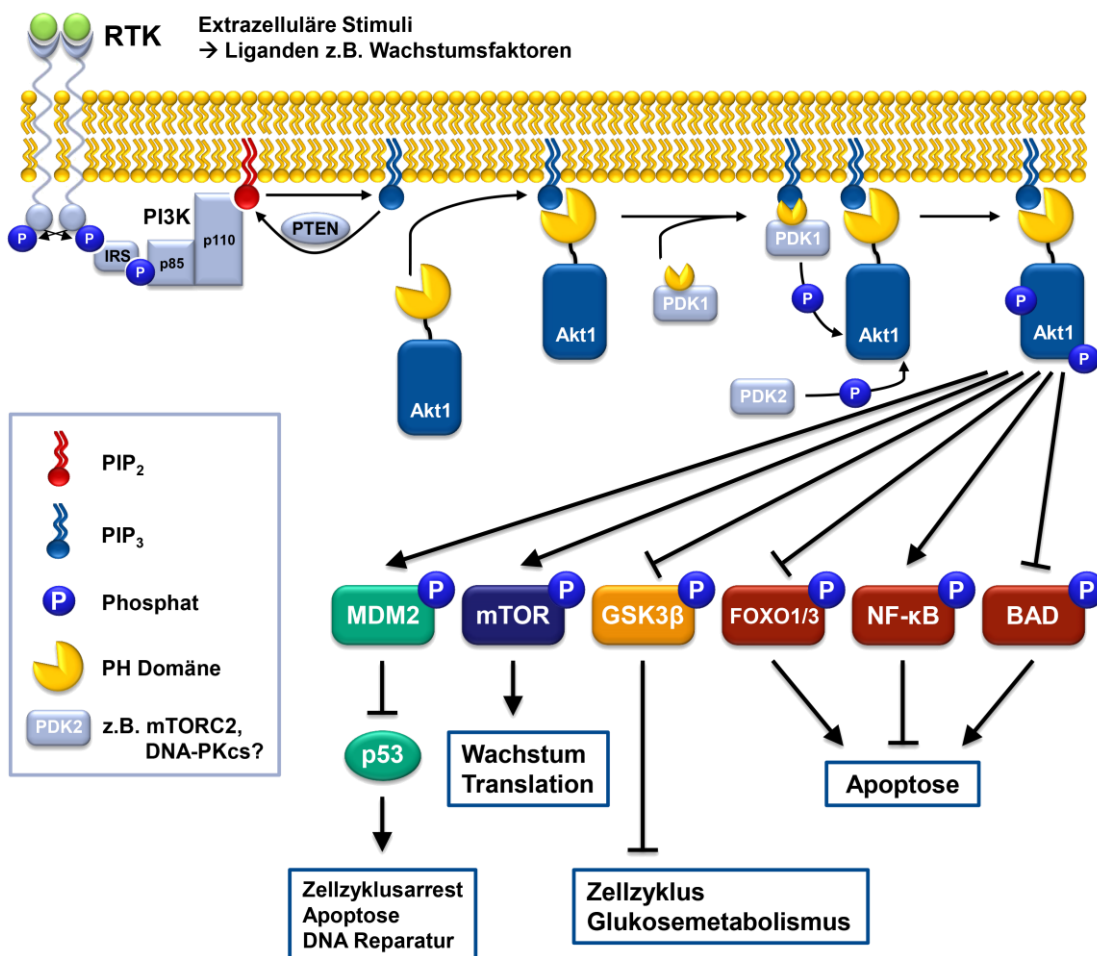


Abb. 1.3.2-1 PI3K/Akt-Signalweg

Die Aktivierung von PI3K geschieht durch die Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen und der darauf folgenden Bildung des Rezeptor-PI3K-Komplexes. Dieser Komplex ist an der Membran lokalisiert, wo die p110-Untereinheit der PI3K die Umwandlung von PIP₂ in PIP₃ katalysiert. PIP₃ wirkt als Signalmolekül, das dabei hilft Akt zu phosphorylieren. Akt aktiviert oder inhibiert seinerseits verschiedene Targets über Phosphorylierung. So kann es Einfluss auf z.B. Zellzyklusarrest, Apoptose, Zellproliferation oder den Glukosemetabolismus nehmen. Außerdem reguliert PI3K Akt-unabhängig die Aktivität anderer zellulärer Targets. Erstellt anhand von Daten aus [224].

Aktiviertes Akt lokalisiert in das Zytoplasma und den Zellkern. Durch Phosphorylierung reguliert Akt die Aktivierung oder Inhibition verschiedener Effektorproteine wie z.B. BAD, ein Protein der Bcl-2-Familie, Nukleärer Faktor κB (NF-κB), Forkhead-Box-Protein O (FOXO1/3), Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3β) und p53 über Mouse double minute 2 homolog (MDM2) zur Inhibition von Apoptose [111]. p53 ist für die Regulation von DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose essentiell. mTOR, ein Regulator der

Autophagozytose, des Zellwachstums und der Translation, ist ebenso ein indirektes Zielprotein von Akt [200]. Über GSK3 β reguliert Akt den Zellzyklus und den Glukosemetabolismus [47].

1.3.3 Veränderungen im PI3K/Akt-Signalweg in der Onkogenese

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt in vielen wichtigen zellulären Prozessen eine Rolle [39]. Es handelt sich um den am häufigsten deregulierten Signalweg in malignen Neoplasien und wird im Zuge der Entartung häufig hyperaktiviert. Dies kann zu einem verstärkten Tumorwachstum sowie Metastasierung und Chemoresistenz führen. [32, 76]

Veränderungen des PI3K-Signalwegs sind besonders häufig bei Brust-, Kolon-, Lungen- und Ovarialkarzinomen zu finden. [84, 184, 210]. Diese führen häufig zu einer Proteinüberexpression oder Hyperaktivität von PI3K oder Akt1 und entstehen in einer Vielzahl der Fälle durch Genamplifikation mit Proteinüberexpression oder eine gain-of-function-Mutation, also einer Mutation, die zu erhöhter Aktivität des Proteins führt. [89, 139] PIK3CA-Mutationen werden häufig in der katalytischen Untereinheit gefunden und tragen zur Onkogenese und dem malignen Verhalten der Tumorzellen bei. Besonders häufig tritt diese Mutation bei Krebserkrankungen des Kolons, der Mamma, des Gehirns und der Lunge auf. Diese Mutation erhöht die Kinaseaktivität der PI3K und ist folglich eine somatische Mutation [184].

Der Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) wirkt als Gegenspieler zu PI3K. PTEN ist bei verschiedenen Tumorarten dereguliert bzw. inaktiviert, einschließlich vieler Brust- und Prostatakrebsarten. Die PIP₃-Phosphatase dephosphoryliert ihr Substrat wieder zu PIP₂. Das Fehlen von PTEN kann somit zu einer übermäßigen Aktivierung von Akt und seinen Targets, einer konstitutiven Aktivierung und Hochregulation Akt-beeinflusster Zellproliferation und Apoptose führen. Dies kann Mutagenese und Tumorentwicklung fördern. [97, 102, 189]

Der Grund für eine verminderte Aktivität oder das Fehlen von PTEN sind Genverlust, veränderte Transkription, Methylierungsveränderungen, verminderte mRNA oder Proteinstabilität [108, 202]. PTEN-Mutationen wurden in über 30-50% der Tumoren mit Veränderungen des PI3K-Signalwegs gefunden [35, 202, 235, 237].

1.3.4 Die klinisch relevante Akt1-Mutationen E17K und artifizielle Akt1-Varianten

Onkogene Veränderungen treten auch im Signalmolekül Akt auf. Eine verstärkte Aktivierung von Akt wurde in Mamma-, Colon-, Ovarial- und Lungenkarzinomen beobachtet [32, 102, 113]. In 16% der Tumoren mit PI3K-Veränderungen zeigen sich Mutationen von Akt1. Es wird geschätzt, dass dies 26.000 neuen Tumoren mit einer Akt1-Mutation pro Jahr in den Vereinigten Staaten von Amerika entspricht. [35]

Es sind unterschiedlich relevante Mutationen an Akt1 bekannt bzw. denkbar, die unterschiedliches Verhalten und klinische Relevanz aufweisen können. Die klinische Relevanz von Akt1 Veränderungen für Bestrahlungswiderstand in menschlichen Tumoren ist bereits beschrieben [32, 210]. Erstmals wurde 2007 eine klinisch relevante Mutation in der PH-Domäne von Akt1 beschrieben. Die Mutation an c.49G>A wird E17K genannt [40]. Diese Mutation ist in verschiedenen Krebsarten wie in Mamma-, Blasen-, Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinomen zu finden [25, 40]. E17K-Mutationen kommen in 8% aller Mammakarzinome vor, insbesondere in duktalem Mammakarzinomen [25, 35]; auch 1% der Kolon- und 1% der Lungenkarzinome weisen diese Veränderung auf. Es handelt sich hierbei um eine Gesamtmutationsfrequenz von 2,4% [25]. Die E17K-Mutation ist in der PH-Domäne lokalisiert, die für die Koordination von Akt1 an PIP₃ notwendig ist. So führt diese Mutation zu einer veränderten elektrostatischen Wechselwirkung. Daraus folgt eine verbesserte Koordination von PIP₃ in der Bindetasche der PH-Domäne des Akt1. Es wird angenommen, dass die gesteigerte Translokation des Akt1 zur Membran eine Steigerung der Phosphorylierung und damit eine Erhöhung der Aktivität der Kinase zur Folge hat. Die E17K-Variante ist eine dominant aktive Mutation, weiterhin auf die Umwandlung von PIP₂ zu PIP₃ durch die PI3K-Kinase angewiesen ist.

Mutationen von AKT1 oder PIK3CA sind in etwa 32% der Mammakarzinome zu finden, was die Notwendigkeit der Forschung und den möglichen therapeutischen Ansatz an diesen Mutationen unterstreicht [25]. Das gleichzeitige Auftreten von AKT1- und PIK3CA-Mutationen ist sehr selten [40].

Neben der klinisch relevanten E17K Mutation werden experimentell weitere artifizielle Akt Mutanten genutzt, um die Funktion von Akt1 zu untersuchen. Diese sind in Abb. 1.3.4-1 und in Tab 1.3.4-1 aufgelistet und erklärt.

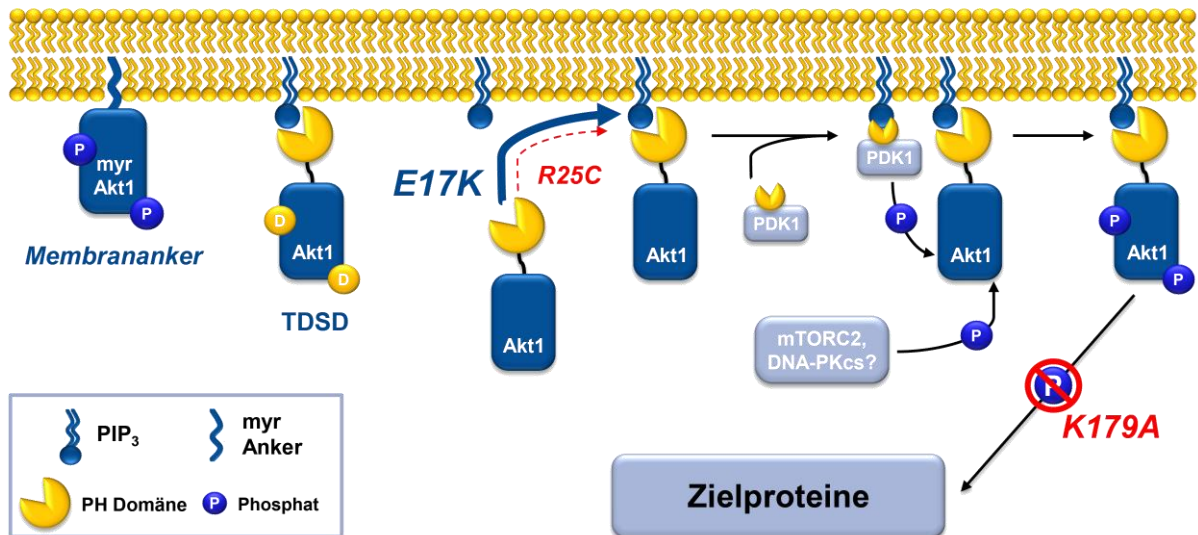


Abb. 1.3.4-1 Verwendete Mutationen und ihre postulierten Effekte auf den Akt-Signalweg

In dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Akt1-Varianten genutzt. Zum einen der Akt1-WT der als Überexpressionskontrolle diente und zum anderen aktivierende bzw. Aktivität hemmende Veränderungen der Kinase. Akt1-E17K ist die einzige klinisch-relevante Mutation. Sie führt zu einer erhöhten Bindung an die Membran. Akt1-R25C im Gegensatz verschlechtert die Koordination von PIP₃. Neben diesen beiden Mutationen der PH-Domäne wurde auch eine myristoylierte Form genutzt (myr)Akt1. Bei dieser Variante wurde die PH-Domäne durch einen direkten Membrananker ausgetauscht, was eine stark erhöhte direkte Membranbindung zur Folge hat. Die beiden Kinase-Domäne-Mutationen des Sets sind TDS und K179A. TDS imitiert durch die Mutationen der Phosphorylierungsstellen zu der Aminosäure Asparaginsäure eine phosphorylierte Stelle und besitzt eine unveränderte PH-Domäne. Folglich ist diese mit einer konstitutiv aktivierten Kinase-Domäne versehen. Die K179A-Mutation sitzt in der ATP-Bindetasche der Kinase und hemmt dort die Koordination des ATP. Eine starke Verringerung der Funktionalität ist die Folge. Erstellt aus Daten von [5, 7, 18, 25, 40, 209, 224]

Anstelle der PH-Domäne befindet sich hier ein PIP₃-unabhängiger, direkter Membrananker. So liegt myrAkt1 größtenteils gebunden an Membranstrukturen vor. myrAkt1 zeigt auf Grund dieser Tatsache eine erhöhte Aktivität, kann erheblich weniger durch Wachstumsfaktoren oder Phosphatase-Inhibitoren beeinflusst werden. Akt1-WT hingegen ist vorwiegend zytosolisch lokalisiert. Es hat laut Literatur eine um den Faktor 60 niedrigere Aktivität im Vergleich zu myr [5]. Die Mutation K179A ist an der Bindungsstelle von ATP, der katalytischen Domäne, am Akt1 lokalisiert. Das hat zur Folge, dass Akt1 die Fähigkeit Substrate zu phosphorylieren verliert [209]. Eine weitere interessante Mutation von Akt1 ist R25C. Es handelt sich um eine Veränderung der PH-Domäne, bei der im Gegensatz zu E17K eine verminderte PIP₃-Koordination resultiert und folglich eine geringere Aktivität erwartet wird [25, 40]. Die im Rahmen dieses Projektes genutzte Mutante T308D/S473D (TDS) imitiert eine T308/S473-Phosphorylierung und somit die konstitutive Aktivierung der Kinase-Domäne von Akt1 [18].

1 Einleitung

Tab 1.3.4-1 Akt1-Mutationen und ihre postulierten Effekte

| Kurzname | Postulierter Effekt und Verwendung |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| pBEC | Expression von eGFP, Leervektor-Kontrolle |
| WT | Wildtyp- Überexpressionskontrolle |
| E17K | Erhöhte PIP ₃ Koordination, erhöhte Phosphorylierung, dominant aktiv |
| R25C | Gehinderte PIP ₃ Koordination, verringerte Phosphorylierung, dominant negativ |
| K179A | Gehinderte ATP-Bindung, konstitutiv inaktiv |
| myr(-PH)Akt1 | Myristoyliert Form ohne PH-Domäne (direkter Membrananker), dominant aktiv |
| T308D/S473D | Nachahmung der Phosphorylierung an beiden Stellen, konstitutiv aktiv |
| T308A | Verhinderung der Phosphorylierung am T308, stark inhibierte Aktivität |
| S473A | Verhinderung der Phosphorylierung am S473, gehemmte Aktivität |
| T308A/S473A | Verhinderung der Phosphorylierung am T308 und S473, inaktiv |

Weitere denkbare und im Projekt erzeugte Mutationen wie die T308A oder die S473A Mutation, verhindern die Phosphorylierung an diesen Stellen und damit die Aktivierung der Kinase [7]. Mit diesen beiden Mutanten konnte auch gezeigt werden, dass für eine vollständige Aktivierung des Akts beide Stellen phosphoryliert sein müssen. Phosphoryliert man Serin 473 in einer T308A-Mutante, zeigten sich lediglich 2% der Wildtyp-Aktivität. Wenn man hingegen S473A an T308 phosphoryliert, ergibt sich eine Aktivität von 10–15%. Dies entspricht auch anderen Studien, die gezeigt haben, dass die Phosphorylierung an T308 und die Aktivität von Akt1 hundertfach erhöht ist im Vergleich zu einer zehnfachen Erhöhung durch Phosphorylierung an S473. [5, 188]

1.3.5 Therapie von Tumoren mit Veränderungen im PI3K/Akt-Signalweg

Aufgrund der vielen Möglichkeiten für Veränderungen sowie der hohen Inzidenz an Mutationen im PI3K Signalweg bei Tumoren ist die Erforschung und Etablierung verschiedenster therapeutischer Optionen für die Modifikation des Signalweges ein erfolgsversprechender Ansatz. Um in die mutierten PI3K- und Akt1-Signalwege eingreifen zu können, wurden verschiedene Inhibitoren entwickelt. Hierunter zählt die Entwicklung von dualen PI3K-/mTOR-, PI3K- sowie Akt-Inhibitoren. Diese sollen die deregulierten Signalwege inhibieren und so das Überleben der Tumoren verschlechtern und oder ihre Chemo- oder Radiosensitivität erhöhen. Angedacht ist es insbesondere die Inhibitoren für Brustkrebs einzusetzen, da in diesen die meisten PI3K/Akt-Signalwegs-Mutationen auftreten [25]. Für verschiedene Inhibitoren, MK-2206 und GDC0941, konnte bereits bei Tumoren mit PIK3CA und PTEN Mutationen eine sensitivierende Wirkung gegenüber der Behandlung mit

anderen Chemotherapeutika *in vitro* und *in vivo* im humanen Modell nachgewiesen werden. [144, 156, 186]

Im Juli 2014 wurde Idelalisib als erster PI3K-Inhibitor in Kombination mit Rituximab zur Behandlung von erwachsenen Patienten bei chronischer lymphatischer Leukämie in den Vereinigten Staaten von Amerika und Europa zugelassen. Für Akt gibt es aktuell keinen zugelassenen selektiven Inhibitor zur Behandlung von Tumoren. Der einzige sich im klinischen Einsatz befindende Akt-Inhibitor, Miltefosine, wurde im März 2014 von der FDA zugelassen, jedoch nicht für die Tumorthherapie, sondern zur Behandlung von Leishmaniose [59]. Es zeigte jedoch Wirkung bei kutanen Metastasen [101].

Aktuell sind 201 Studien unter dem Stichwort der Akt-Inhibitoren bei ClinicalTrials.gov des U.S. National Institutes of Health eingetragen, davon befinden sich die meisten Studien mindestens in Phase I der klinischen Prüfung, in Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder als Monotherapie. Jedoch ist aktuell keine Studie für die Erforschung von Bestrahlungstherapie mit Akt-Inhibitoren eingetragen. Es beziehen sich 51 Studien auf den Inhibitor MK-2206 und 44 auf Perifosin. In fortgeschrittenen Phasen pharmakologischer Studien befinden sich unter den Akt-Inhibitoren zur Tumorthherapie Perifosin (KRX-0401) und MK-2206. [44]

MK-2206 ist ein allosterischer Akt-Inhibitor, der sich in Phase I- und II-Studien insbesondere mit dem Ziel der Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika befindet [92]. Besonders zeigten sich positive synergistische Effekte mit Trastuzumab bei Brust und gastrointestinalen Tumoren [95]. Die Therapie mit MK-2206 wird in nicht kleinzelligen Lungentumoren, kolorektalen Karzinomen, Melanomen, Tumoren der Prostata, der Ovarien, des Kopf- und Halsbereiches, des hämatopoetischen Systems sowie bei Leukämien durchgeführt. [92, 186]

ARQ 092 und ARQ 751 sind selektive, allosterische, pan-Akt und Akt1-Inhibitoren, die insbesondere E17K-Mutationen als Therapieziel haben. Sie hemmen die Phosphorylierung von Akt und verhindern die Translokation von inaktivem Akt an die Plasmamembran. Die beiden Inhibitoren hemmen die Proliferation verschiedenster Tumortypen, wie bei Leukämie, Brust-, Endometrium- und Dickdarmkrebs-Zelllinien. [234]

Bei vielen Tumorarten ist Akt überexprimiert. Da es eine zentrale Rolle in der Tumorentwicklung, -progression und der -resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung einnehmen kann sowie eine Schlüsselrolle in Regulation vieler Zellmechanismen spielt, stellt es ein attraktives Ziel für die Entwicklung der zielgerichteten Tumorthherapie dar [1, 224]. Der Fokus der Forschung an Akt als Inhibitor liegt aktuell auf der Kombination mit

anderen Chemotherapeutika, die Kombination mit Bestrahlung wird aktuell wenig erforscht [44].

1.3.6 Einfluss der Kinase Akt1 auf die DNA-Reparatur-Signalwege

Obwohl bereits früh gezeigt wurde, dass Akt1 als Antwort auf genotoxischen Stress aktiviert wird und so das Überleben der Zellen fördert [239], beschränkte sich die Argumentation zu den zugrunde liegenden Mechanismen auf die Bedeutung von Akt im Rahmen der Transduktion von Überlebenssignalen. Die Arbeiten von Bozulic *et al.* 2008 und Toulany *et al.* stellten 2008 erstmals einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Akt und der DNA-PKcs-abhängigen DNA-Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen her [28, 214]. Bozulic *et al.* zeigten einen Anstieg der Akt-Phosphorylierung an Serin 473 proportional zur applizierten Dosis von IR, wobei bei sehr hohen Strahlungsdosen bzw. ausgeprägter DNA-Schädigung (30 Gy) eine Inhibition der Aktivierung von Akt1 gefunden wurde. Zusätzlich zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass eine Kolo-kalisation von Akt1 und pS473-Akt zur Schadenstelle von 93,1% bestand. Interessanterweise führte die Inhibition der DNA-PKcs zu einer verringerten Phosphorylierung und Lokalisation von phosphoryliertem Akt1 an dem Ort der DNA Schädigung in den bestrahlten Zellen. (vgl. Abb. 1.3.6-1) Diese Ergebnisse wiesen auf eine Interaktion der beiden Kinasen nach Bestrahlung mit Akt als Target der DNA-PKcs hin. [28]

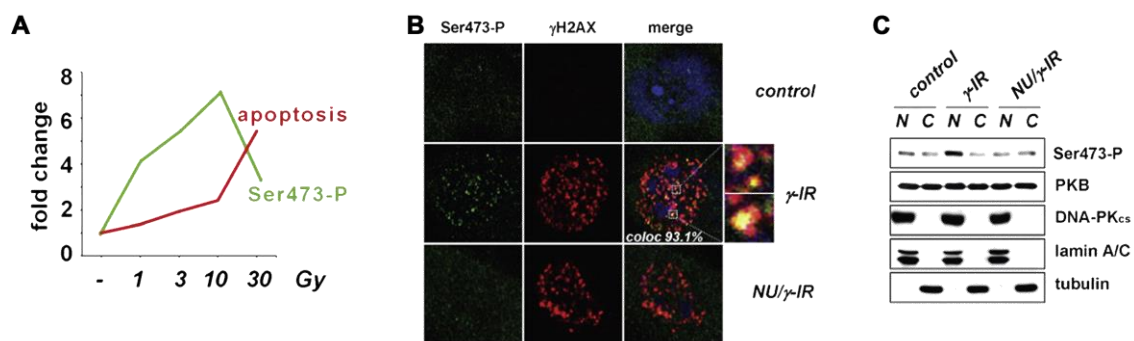


Abb. 1.3.6-1 Akt-Phosphorylierung nach IR und dessen Abhängigkeit zur Kinase DNA-PKcs

Bozulic *et al.* zeigten 2008 die Abhängigkeit der Akt-Phosphorylierung zur applizierten Strahlendosis. Der Abfall dieser Phosphorylierung bei höheren Dosen geht mit der Initiation der Apoptose einher (A). Zusätzlich zeigte die Arbeitsgruppe, dass Akt abhängig von der Aktivität der DNA-PKcs an DNA-Schadstellen des Serins 473 phosphoryliert vorliegt. Nach Daten aus [28]

Eine physische Verbundenheit der beiden Kinasen wurde auch von Toulany *et al.* im Jahr 2008 beschrieben und durch Immunopräzipitation bewiesen. Allerdings zeigte Toulany, dass die Inhibition der Expression von Akt eine Verringerung der Phosphorylierung der DNA-

1 Einleitung

PKCs an den Positionen Serin 2056 und Threonin 2609 zur Folge hatte. Die pharmakologische Inhibition von Akt1 verringerte nicht nur das Überleben nach Bestrahlung, sondern verlangsamte auch die Reparatur von DNA-DSB, allerdings nur in DNA-PKcs-profizienten Zellen, wie in Abb. 1.3.6-2 aufgeführt. Somit deuteten die Ergebnisse von Toulany im Gegensatz zu den Arbeiten von Bozulic auf eine Aktivierung der DNA-PKcs durch Akt hin. Die Daten gaben allerdings keinen Aufschluss darüber, ob die verminderte DNA-PKcs-Phosphorylierung ein direkter oder indirekter Effekt der Akt-Inhibition war. So könnte Akt die Trans- bzw. Autophosphorylierung der DNA-PKcs beeinflussen oder anderweitig auf die Phosphorylierung der DNA-PKcs Einfluss nehmen. [28, 214]

Die beschriebene Interaktion von Akt und DNA-PKcs suggerierte allerdings, dass durch Akt besonders der D-NHEJ-DNA-Reparaturweg beeinflusst wird. [192]

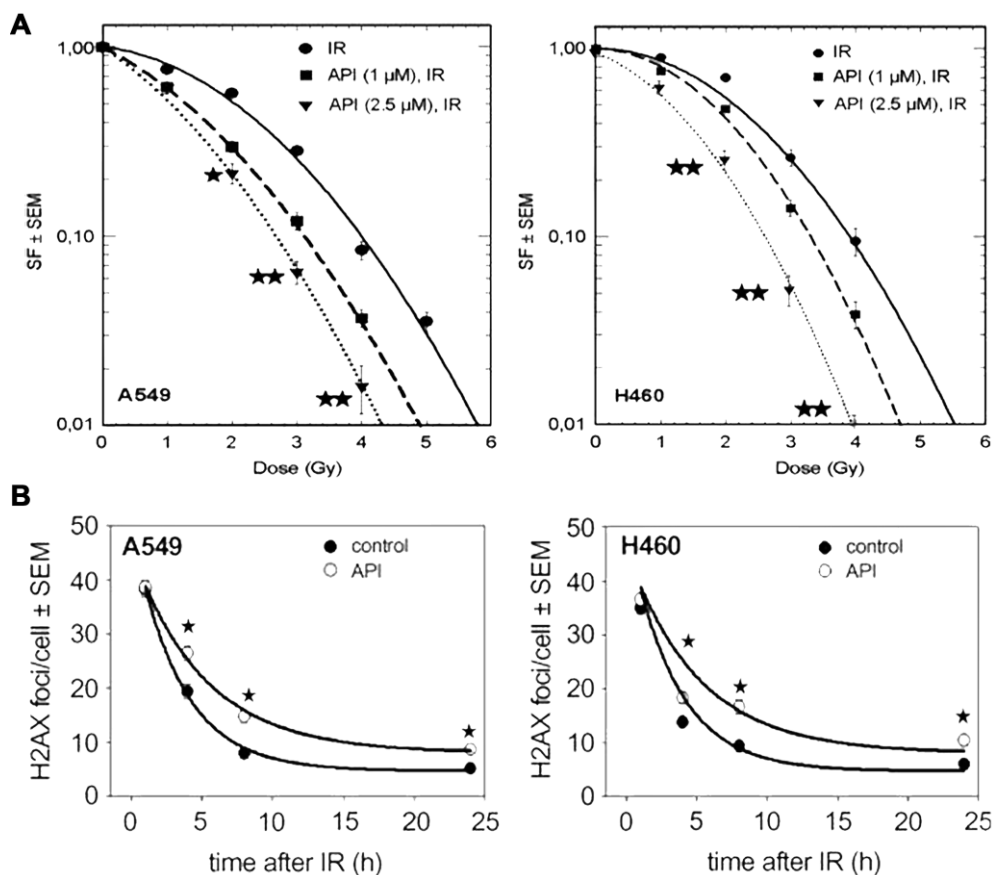


Abb. 1.3.6-2 Einfluss der Akt1-Inhibition auf das Überleben und die DNA-Reparatur-Kinetik nach IR

Diese Abbildung zeigt die von Toulany *et al.* durchgeführten Versuche nach IR unter Nutzung eines Akt Inhibitors (API). Die Inhibition von Akt führte zur Reduktion des Zellüberlebens zweier Lungenkrebszelllinien (A549, NCI-H460) nach Bestrahlung (A). Des Weiteren konnte die Geschwindigkeit der Reparatur von DNA-Schäden in diesen Zelllinien durch Inhibition der Kinase Akt signifikant verlangsamt werden (B). Nach Daten aus [214]

1 Einleitung

Auf Basis dieser Arbeiten kann angenommen werden, dass Akt als eine Art molekularer Schalter funktioniert, der je nach Grad der DNA-Schädigung zwischen Zellzyklusstopp und Reparatur der Schäden oder Apoptose wählt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien weisen dabei auf einen komplexen Mechanismus hin, bei dem Akt nicht direkt an der Reparatur teilnimmt, diese aber maßgeblich beeinflusst. Bislang bleibt jedoch die Interaktion der Kinasen Akt1 und DNA-PKcs weitestgehend unklar.

Insbesondere blieben folgende Fragen bislang ungeklärt: Welchen Einfluss hat Akt auf die Reparatur-Kinetik und auf das Zellüberleben nach Bestrahlung bzw. die zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung? Wie verlaufen die Überlebens-fördernden Signalwege unterhalb von Akt1? Gibt es Mediatoren und potenziellen Substrate von Akt1, die diese Kinase mit der DNA-Reparatur verbinden und wenn ja, welche?

Besonders der Einfluss der Hyperaktivierung von Akt, die in vielen Tumoren auftritt, sollte diesbezüglich weiter erforscht werden.

Diese Fragstellungen aus der vorliegenden Literatur wurden in der Abbildung 1.3.6-3 zusammengefasst und veranschaulicht. Aus diesen Fragen ergab sich die Zielsetzung dieses Projektes.

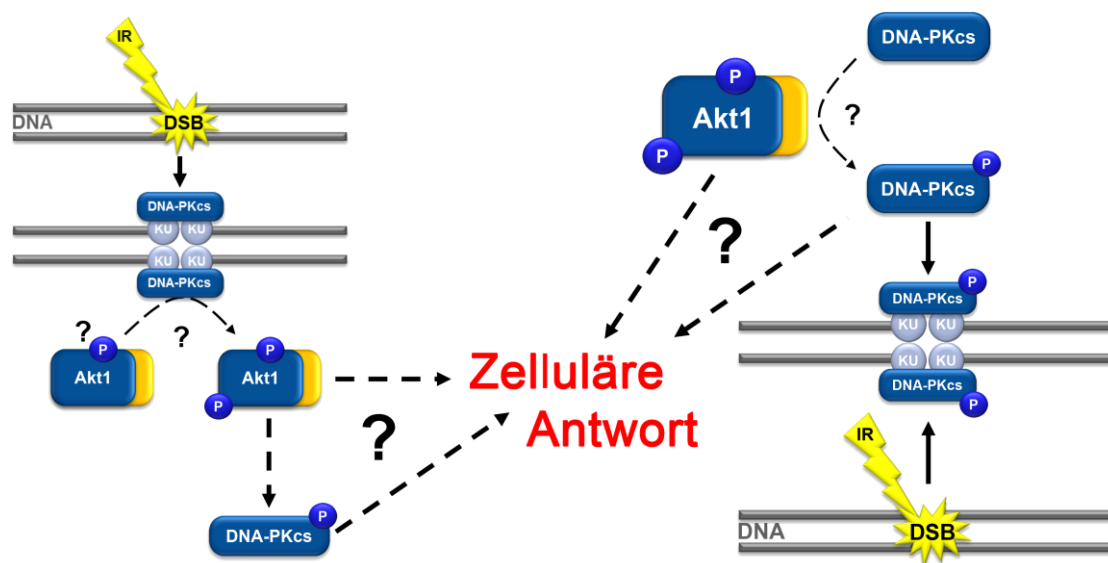


Abb. 1.3.6-3 Was ist die Funktion von Akt1 in der zellulären Antwort auf Bestrahlung?

Diese Abbildung fasst die offenen Fragen zusammen, die die Publikationen von Bozulich und Toulany hinterlassen und stellt das Fundament der Fragstellung dieser Arbeit dar.

2 Zielsetzung

Die Behandlung von Tumoren stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Eine tragende Säule der Behandlung ist die Bestrahlungstherapie. Ein schwerwiegendes Hindernis für die erfolgreiche Behandlung stellt die ausgeprägte intrinsische Strahlenresistenz einiger Tumoren dar. Ursache hierfür können Mutationen in Apoptose- und Überlebenssignalwegen sein, die zu verstärktem Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieresistenz führen können. In diesem Zusammenhang stellt der PI3K/Akt-Signalweg eine interessante therapeutische Zielstruktur dar, da dieser Signalweg in zahlreichen Tumoren übermäßig aktiviert ist. Dabei spielen Veränderungen in verschiedenen Komponenten des Signalwegs einschließlich Mutationen im Akt1-Gen eine Rolle. Interessanterweise zeigten neuere Arbeiten, dass Akt eine Rolle für das Zellüberleben nach Bestrahlung und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt. Allerdings waren die Beobachtungen zu den zugrundeliegenden Mechanismen widersprüchlich. Während die Kombination von Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges mit anderen Chemotherapeutika ein viel beforschtes Thema ist, ist bislang die Bedeutung von Akt1 für die Strahlensensitivität und der Wirkmechanismus der radiosensitivierenden Wirkung von Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges noch unzureichend erforscht.

Dieser Promotionsarbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass eine erhöhte Aktivität von Akt die intrinsische Strahlensensitivität von Tumorzellen steigert und folglich ein verschlechtertes Ansprechen auf eine Strahlentherapie bedingt. Ziel des Promotionsvorhabens war daher die Ergründung der Rolle und der Aktivität der Akt1 bei der Antwort von Zellen auf ionisierende Strahlung. Hierbei standen insbesondere die Charakterisierung des Einflusses von Akt1 auf die zelluläre Strahlenantwort, die Phosphorylierungshierarchie von Akt1 und DNA-PKcs und die Analysen der Eigenschaften, wie Lokalisation und Proliferation, verschiedener Mutationen. (vgl. Abb. 2-1) Dabei sollte mit Hilfe eines genetischen Ansatzes insbesondere die Bedeutung einer veränderten Aktivität von Akt für die Induktion von Schäden, das Überleben und die DNA-Reparatur nach Bestrahlung untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk in diesem Zusammenhang lag auf den klassisch genutzten Akt1-Mutanten myrAkt1 und Akt1-K179A, der klinisch relevanten Mutante Akt1-E17K und der Bedeutung der Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren Threonin 308 sowie Serin 473. Des Weiteren sollte die subzelluläre Lokalisation von Akt1 und die zelluläre Aktivität untersucht werden. Dies sollte auch im Bezug zu DNA-Reparatur-Mechanismen gesetzt werden. In diesem Kontext stand die Interaktion und Hierarchie von Akt1 und dem NHEJ-Reparaturprotein DNA-PKcs im Fokus. Hierzu sollte die Phosphorylierungs-abhängige Lokalisation näher ergründet werden.

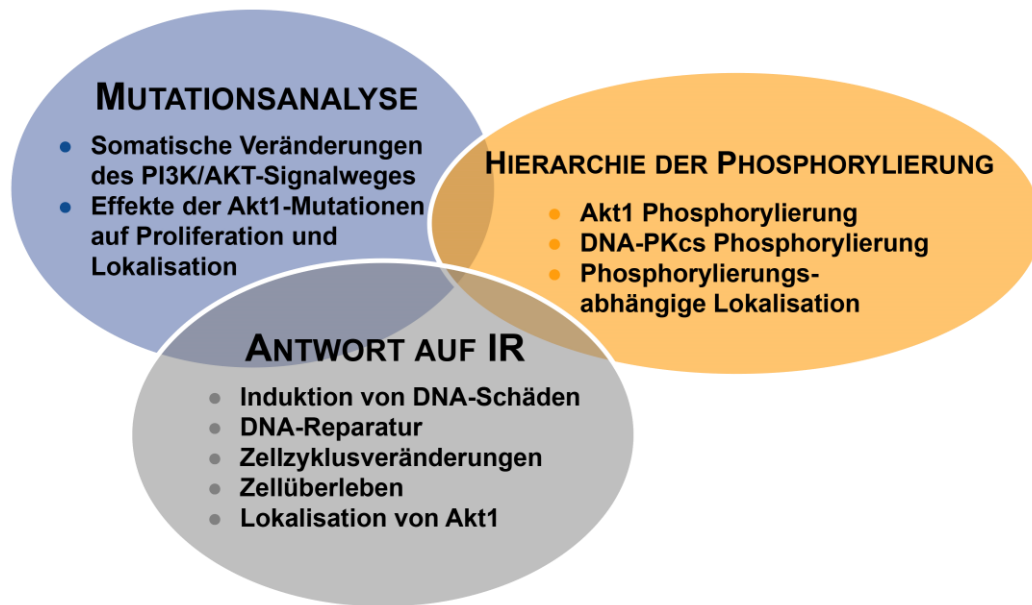


Abb. 2-1 Ziele der Promotionsarbeit

Die Abbildung demonstriert die Ziele, die dieser Arbeit zugrundeliegen. Gleichzeitig sind die Überschneidungsbereiche der verschiedenen Ziele abgebildet. Die Ziele waren die Funktionsweise des Akt1 in Bezug auf die Bestrahlungsantwort, Phosphorylierungshierarchie der DNA-PKcs und Analysen verschiedener Mutationen des Akt1 ergründen.

Um diese Ziele zu erreichen sollten zunächst verschiedene Akt1-Mutanten als eGFP-Fusionsproteine mittels retroviralem Gentransfer in einer murinen Prostatakrebszelllinie (TrC1) und in Akt1-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF $-/-$) stabil exprimiert werden. Mit Hilfe dieser Zellen sollten dann zunächst die Effekte der Akt1-Mutationen auf die Zellproliferation, sowie das Kurzzeit- und Langzeitüberleben nach Bestrahlung untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollten diese Zellen dann bezüglich ihres Einflusses auf die Kinetik der Induktion und Reparatur strahlungsinduzierter DNA-Schäden charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

Dieser Abschnitt listet im ersten Teil 3.1 alle Materialien auf, die für die beschriebenen Experimente benötigt wurden. Die folgenden Abschnitte 3.2 bis 3.6 beschreiben die Durchführung der Experimente. Zusätzlich erklären die jeweiligen Experimentabsätze kurz die Theorie und die Notwendigkeit des jeweiligen Versuchs.

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 3.1.1-1 sind alle genutzten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tab 3.1.1-1 Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| CASY [®] cups | Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz |
| Combitips advanced (0,2 / 1 / 5 mL) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Cryo-Röhrchen | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Deckgläser 60x24 mm | Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland |
| Deckgläser P233.1 (rund 15 mm) | Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland |
| FACS-Röhrchen | Peter Oehmen GmbH, Essen, Deutschland |
| Handschuhe Peha-soft nitrile L | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| Laboralufolie | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Objektträger 75x25 mm SuperFrost Plus | R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland |
| Objektträger 76x26 mm | Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland |
| Parafilm M PM-996 | Bemis Company Inc, Oshkosh, WI, USA |
| Petrischalen (10 cm, unbeschichtet) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen (0,5 / 10 µL Kristall) | Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen (100 / 200 / 1000 µL) | Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Plastik-Einmalpipetten (5 / 10 / 25 mL) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland |
| PVDF Membran | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Reaktionsgefäß (15 / 50 mL) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5 / 2 / 5 mL) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Super Frost Plus Objektträger | R. Langenbrock, Emmendingen, Deutschland |
| Whatman Filterpapier | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Zellkulturflaschen (75 / 175 cm ²) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland |
| Zellkulturschalen (10 cm) | TPP AG, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturtestplatten (6-, 12-, 96-Well) | TPP AG, Trasadingen, Schweiz |

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

In der Tabelle 3.1.2-1 werden alle Chemikalien genannt, die für die Erstellung von Puffer und Medien sowie als Zusätze genutzt wurden.

Tab 3.1.2-1 Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalie | Hersteller |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 2-Hydroxyethylagarose | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Acrylamid-/bisacrylamid (Gel 30) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Agar | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Agarose | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Amersham ECL Prime Reagenz | GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA |
| Amersham ECL Select Reagenz | GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Borsäure | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Bromphenolblau | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Calciumchlorid*2 H ₂ O | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| CASY@ton | Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz |
| Coomassie Brilliant Blue | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium | Dako NA Inc., Carpinteria, CA, USA |
| Dikaliumhydrogenphosphat*3 H ₂ O | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dinatrium-EDTA (Na ₂ EDTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dithiothreitol DTT (1 M) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Eosin (1% in A. dest) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Essigsäure | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ethanol 99,8% pro analysis (EtOH p.a.) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol 99,8% technisch (EtOH) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| FACS Clean | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| FACS Flow | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| FACS Rinse | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Formaldehyd | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Glukose | Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Glutaraldehyd | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Glutathion | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Glycerin | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Hämalaunlösung sauer nach Mayer | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Hoechst33342 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Immersol 518F | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Kaliumacetat | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

3 Material und Methoden

| Chemikalie | Hersteller |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Kollagen A | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| LB-Medium Pulver | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Manganchlorid*4 H ₂ O | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Magermilchpulver | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| N-Lauroyl Sarkosin Natriumsalz | Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA |
| Normales Ziegen Serum (NGS) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| PageRuler Prestained Protein-Marker | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Propidium Iodid (PI) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Proteaseinhibitortabletten | Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz |
| Roti®-Histokitt II | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Rubidiumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Tetramethyl-Rhodaminethylester (TMRE) | MoBiTec GmbH, Goettingen, Germany |
| Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Xylol | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| ZipRuler 2 Express DNA-Marker | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| β-Mercaptoethanol | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

3.1.3 Genutzte Geräte

Tabelle 3.1.3-1 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte auf.

Tab 3.1.3-1 Verwendeten Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---------------------------------------|------------------------------------------|
| -20°C Gefrierschränke | Liebherr AG, Bulle, Schweiz |
| 4°C Kühlschränke | Liebherr AG, Bulle, Schweiz |
| -80°C Gefrierschrank MDF-U55V | Panasonic GmbH, Hamburg, Deutschland |
| AlphaImager | Alpha Innotech, Kasendorf, Deutschland |
| ApoTome für Zeiss Mikroskope | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| AxioCam MRc Mikroskop Kamera | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| AxioCam MRm Mikroskop Kamera | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| BioPhotometer | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Colibri LED-Belichtungssysteme | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Colony Counter Zählstift | N. Usui & Co Ltd, Kobe, Japan |
| Destillieranlage Ro 01032 | ROWA GmbH, Heimsheim, Deutschland |
| Digitale Schiebellehre | R. Lühdorff GmbH, Remscheid, Deutschland |

3 Material und Methoden

| Gerät | Hersteller |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| DM IRB Fluoreszenzmikroskop | Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland |
| Eismaschine Scotsman AF 100 | Frimont S.P.A., Milan, Italien |
| Elektrophoresekammer Multigel G47 | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Entwicklermaschine Fusion Solo | peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland |
| FACSCalibur Durchflusszytometer | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| FACSDiva Zellsortierer | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Feinwaage ABS 120-4 | Kern GmbH, Albstadt, Deutschland |
| Glasgeräte | Duran Group GmbH, Mainz, Deutschland |
| Horizontalschüttler MTS 2/4 | IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland |
| Lichtmikroskop Diavert | Ernst Leitz, Wetzlar, Deutschland |
| Magnet-Rührer RH basic 2 | IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland |
| Mikrowelle MWO0308 | Westkauf GmbH, Mühlheim, Deutschland |
| Paraffinstrecktisch HI 1220 | Leica MS GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Paraffinwasserbad HI 1210 | Leica MS GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| PCR Mastercycler | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| pH-Meter edge | Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA |
| Pipetten (2,5 / 10 / 20 / 100 / 200 / 1000 µL) | Gilson AG, Mettmenstetten, Schweiz |
| Pipettierhilfe | Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland |
| RM2235 Rotationsmikrotom | Leica MS GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Rollenmischgerät RM5 | Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland |
| Schüttelinkubator G25 | New Brunswick Inc, Edison, NY, USA |
| Schüttelwasserbad SW21 | Julabo, Seelbach, Deutschland |
| Shandon Excelsior ES | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Shandon HistoCentre 2 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Spannungsquelle PowerPac HC | Bio-Rad GmbH, München, Deutschland |
| Spannungsquelle VWR 250V | VWR GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 | peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Sterilbank BDK HF6.12 | Faust AG, Schaffhausen, Schweiz |
| Stuart Gyro-Rocker SSL3 | Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK |
| Synergy HT ELISA Reader | Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Ultraschallgenerator GM 2070 mit Spitze MS 72 | Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland |
| Ultraschallwandler UW 2070 | Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland |
| Vakuumpumpe Mini-Vac (Zellkultur) | Axonlab AG, Baden, Schweiz |
| Vakuumpumpe Vacuskan | Skand AG, Basel, Schweiz |
| Vortex Mixer Reax 2000 | Heidolph GmbH, Schwabach, Deutschland |
| Waage 474-42 | Kern GmbH, Albstadt, Deutschland |
| Wärmeschrank Jouan | Astel Jouan, Unterhaching, Deutschland |
| Wasserbad 7 Liter (Zellkultur) | GFL mbH, Burgwedel, Deutschland |
| Western Blot Kammer Trans-Blot Cell | Bio-Rad GmbH, München, Deutschland |
| X-RAD 320 X-Ray Biological Irradiator | Precision X-Ray Inc, N. Branford, CT, USA |
| X-RAD MIR-324 X-Ray Röhre | Precision X-Ray Inc, N. Branford, CT, USA |
| Zellkultur-Inkubator C200 | Labotect, Rosdorf, Deutschland |
| Zellzähler CASY Model TT | Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland |
| Zentrifuge Avanti JXN-26 | Beckman Coulter, Brea, CA, USA |
| Zentrifuge Biofuge pico | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge Centrifuge 5417 R | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge Megafuge 1.OR | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |

3.1.4 Verwendete Kits

Die hier in Tab 3.1.4-1 aufgelisteten Kits wurden für die Klonierung, Transfektion und die Kinase Experimente verwendet. Sie beinhalten alle nötigen Puffer, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Tab 3.1.4-1 Verwendeten Kits

| Kit | Hersteller |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| ADP-Glo™ Kinase-Assay Kit | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| DNA-PK Kinase Enzyme System Kit | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| PCR-Clean up, gel extraction Kit | Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA |
| Phusion Kit High-Fidelity DNA-PCR | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Plasmid DNA Purification Kit | Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA |
| Plasmid Maxi Kit | Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA |
| QuikChange II | Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA |
| Rapid DNA Ligation Kit | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| SmartSeq Kit | Eurofins GSC, Luxembourg, Luxemburg |
| Trans-IT LT1 Transfection Kit | Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA |

3.1.5 Puffer und Lösungen

Hier werden alle Puffer und Lösungen in Tab 3.1.5-1 erwähnt, die für die Experimente verwendet wurden. Hierbei wurde der pH-Wert mit Hilfe einer pH-Elektrode und Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt.

Tab 3.1.5-1 Eingesetzte Puffer und Lösungen

| Puffer und Lösungen | Volumen | Inhalte | Menge |
|----------------------------------------------|---------|--------------------------|------------|
| Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung (0,05%) | 1 L | Methanol | 200 mL |
| | | Hydroxylapatit | 75 mL |
| | | Coomassie Brilliant Blue | 500 mg |
| | | A. dest | 735 mL |
| CST-Puffer (4-fach) pH 6,8 bei RT | 60 mL | Tris-HCl (3 M) | 1,26 mL |
| | | SDS (10%) | 12 mL |
| | | Glycerin | 6 mL |
| | | DTT (1 M) | 3 mL |
| | | Bromphenolblau | 0,06 g |
| | | A. dest | Auf 60 mL |
| SDS-Lösung (10%) | 200 mL | SDS | 20 mg |
| | | A. dest | Auf 200 mL |
| SDS-Laufpuffer (10-fach) pH 8,8 bei RT | 1 L | Tris | 30 g |
| | | Glycin | 144 g |
| | | SDS | 10 g |
| | | A. dest | Auf 1 L |

3 Material und Methoden

| Puffer und Lösungen | Volumen | Inhalte | Menge |
|------------------------------------------|---------|---------------------------------------|------------|
| SDS-Laufpuffer (1-fach) | 1 L | SDS-Laufpuffer (10-fach) | 100 mL |
| | | A. dest | 900 mL |
| SDS-Trenngel-Puffer pH 8,8 bei RT | 100 mL | Tris | 18,17 g |
| | | 10% SDS | 4 mL |
| | | A. dest | Auf 100 mL |
| SDS-Sammelgel-Puffer pH 6,8 bei RT | 100 mL | Tris | 6,06 g |
| | | 10% SDS | 4 mL |
| | | A. dest | Auf 100 mL |
| Transferpuffer (10-fach) | 1 L | Tris | 30,3 g |
| | | Glycin | 144,0 g |
| | | A. dest | Auf 1 L |
| Transferpuffer (1-fach) | 5 L | Blotting Puffer (10-fach) | 500 mL |
| | | Methanol | 1 L |
| | | A. dest | 3,5 L |
| TBS-Puffer (10-fach) pH 7,6 bei RT | 1 L | NaCl | 87,66 g |
| | | Tris | 60,57 g |
| | | A. dest | Auf 1 L |
| TBS-T Puffer (1-fach) | 2 L | TBS (10-fach) | 200 mL |
| | | Tween 20 | 2 mL |
| | | A. dest | 1798 mL |
| TAE-Puffer (50-fach) pH 8,3 bei RT | 1 L | Tris | 242 g |
| | | Essigsäure | 57,1 mL |
| | | EDTA (0,5 M) | 100 mL |
| | | A. dest | Auf 1 L |
| TAE-Puffer (1-fach) | 5 L | TAE-Puffer (50-fach) | 100 mL |
| | | A. dest | 4500 mL |
| Antikörperpuffer | 100 mL | BSA | 5,0 g |
| | | TBS-T (1-fach) | Auf 100 mL |
| Blockierpuffer | 100 mL | Milchpulver | 5,0 g |
| | | TBS-T (1-fach) | Auf 100 mL |
| Lysepuffer pH 7,4 bei RT | 10 mL | HEPES (1 M) | 500 µL |
| | | Triton X-100 (10%) | 1 mL |
| | | NaCl (5 M) | 300 µL |
| | | NaPP (200 mM) | 500 µL |
| | | NaF (1 M) | 100 µL |
| | | EDTA (0,5 M) | 20 µL |
| | | Na ₃ VO ₄ (1 M) | 20 µL |
| | | A. dest | 7,5 mL |
| | | Proteaseinhibitor | 1 Tablette |
| PI-Exclusion-Lösung | 10 mL | PI-Lösung (5 mg/ml) | 20 µL |
| | | DMEM10% | Auf 10 mL |
| Nicoletti-Lösung | 50 mL | Natriumcitrat | 50 mg |
| | | Triton X-100 | 100 µL |
| | | PI-Lösung (5 mg/ml) | 500 µL |
| | | PBS | Auf 50 mL |
| TMRE | 50 mL | TMRE-Lösung (25 mM) | 50 µL |
| | | DMEM10% | Auf 50 mL |

3 Material und Methoden

| Puffer und Lösungen | Volumen | Inhalte | Menge |
|----------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|------------|
| PBS-Puffer (10-fach) pH 7,4 bei RT | 1 L | KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| | | KCl | 2 g |
| | | NaCl | 80 g |
| | | Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O | 14,4 g |
| | | A. dest | Auf 1 L |
| PBS-Puffer (1-fach) | 1 L | PBS-Puffer (10-fach) | 100 mL |
| | | A. dest | 900 mL |
| Fix/Perm Fixierungs- und Permeabilisierungs-Lösung | 100 mL | 4% PFA in PBS | 75 mL |
| | | Triton X-100 | 2 mL |
| | | PBS | 23 mL |
| GOAT-Lösung | 100 mL | NGS | 2 mL |
| | | PBS | 98 mL |
| N1-Puffer pH 8,9 bei 4°C | 100 mL | Sarkosyl | 2 g |
| | | EDTA (0,5 M) | 0,1 mL |
| | | Proteinase K | 50 mg |
| | | A. dest | Auf 100 mL |
| N2-Puffer pH 8,5 bei RT | 100 mL | Tris | 90 mM |
| | | Borsäure | 90 mM |
| | | EDTA (0,5 M) | 400 µL |
| | | A. dest | Auf 100 mL |
| Tbfl-Puffer | 100 mL | Kaliumacetat | 0,3 g |
| | | Rubidiumchlorid | 1,21 g |
| | | Calciumchlorid*2 H ₂ O | 0,15 g |
| | | Manganchlorid*4 H ₂ O | 1 g |
| | | Glycerin | 15 mL |
| | | A. dest | Auf 100 mL |
| TbflII-Puffer | 100 mL | MOPS | 0,23 g |
| | | Rubidiumchlorid | 0,121 g |
| | | Calciumchlorid*2 H ₂ O | 1,1 g |
| | | Glycerin | 15 mL |
| | | A. dest | Auf 100 mL |

3.1.6 Kulturmedien und Zusätze

In diesem Abschnitt Tab 3.1.6-1 und Tab 3.1.6-2 werden alle Kulturmedien und ihre Zusätze aufgelistet. Dies umfasst enzym-spezifische Inhibitoren, die für die Experimente benötigt wurden. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer pH-Elektrode und Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt. Tabelle 3.1.6-3 listet eingesetzte Wirkstoffe und Antibiotika auf.

3 Material und Methoden

Tab 3.1.6-1 Eingesetzte Bakterienmedien und Medienzusätze

| Bakterienmedien | Volumen | Inhalte | Menge |
|----------------------------|---------|-------------------------|----------|
| LB-Medium pH 7,5 bei RT | 1 L | Baktotrypton | 10 g |
| | | Hefeextrakt | 5 g |
| | | NaCl | 10 g |
| | | A. dest | Auf 1 L |
| LB-Agar | 1 L | Agar | 10 g |
| | | LB-Medium | Auf 1 L |
| SOC-Medium | 50 mL | Baktotrypton | 1 g |
| | | Hefeextrakt | 0,25 g |
| | | Glukose-Lösung (2 M) | 0,5 mL |
| | | MgCl ₂ (1 M) | 0,5 mL |
| | | KCl (1 M) | 0,125 mL |
| | | NaCl (1 M) | 0,5 mL |
| | A. dest | Auf 50 mL | |

Tab 3.1.6-2 Eingesetzte Zellkulturmedien und Medienzusätze

| Zellkulturmedien | Zusätze/Inhalte | Hersteller |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------|
| DMEM+ | DMEM10% 1-fach Pen/Strep 1 µg/mL Ciprofloxacin | Diese Arbeit |
| DMEM10% | 10% FBS | Diese Arbeit |
| DMEM4 | DMEM+ 4 µg/mL Puromycin | Diese Arbeit |
| DMEM Plat-E | DMEM10% 10 µg/mL Blasticidin 1 µg/mL Puromycin | Diese Arbeit |
| Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) | | Life Technologies |
| Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) | | Gibco Life Technologies |
| TE (Trypsin/0,05% EDTA) | | Biochrom AG |

Tab 3.1.6-3 Eingesetzte Wirkstoffe und Antibiotika

| Wirkstoff | Art | Hersteller |
|-----------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Ampicillin | Bakteriostatikum | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Blasticidin | Selektionsantibiotikum | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ciprofloxacin | Mycobakteriostatikum | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Vollmediumszusatz | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| GDC-0068 (Ipatasertib) | Akt-Inhibitor | SelleckChem, Houston, USA |
| G418 (Geneticin) | Selektionsantibiotikum | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Kanamycin | Bakteriostatikum | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| MK-2206 | Akt-Inhibitor | SelleckChem, Houston, TX, USA |
| NU7441 | DNA-PKcs-Inhibitor | SelleckChem, Houston, TX, USA |
| Penicillin/Streptomycin100x (Pen/Strep) | Bakteriostatikum | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Puromycin | Selektionsantibiotikum | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

3.1.7 Oligonukleotide

Hier werden alle für diese Arbeit benötigten Oligonukleotide in Tab 3.1.7-1 aufgelistet und beschrieben. Mit jedem Primer konnten Schnittstellen eingefügt werden, die für die Klonierung in die jeweiligen Vektoren benutzt wurden.

Tab 3.1.7-1 Verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Primersequenz 5' -> 3' | Verwendung | Hersteller |
|-------------------|----------------------------------------|---------------|----------------------------------------|
| QC_AKT1_S473A_for | CTTCCCCCAGTTCGCCTACT CGGCCAG | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_S473A_rev | CTGGCCGAGTAGGCGAACT GGGGGAAG | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_S473D_for | CTTCCCCCAGTTCGACTACT CGGCCAGC | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_S473D_rev | GCTGGCCGAGTAGTCGAAC TGGGGGAAG | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_T308D_for | GTGCCACCATGAAGGACTT TTGCGGCACAC | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_T308D_rev | GTGTGCCGCAAAAGTCCTTC ATGGTGGCAC | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_E17K_for | GCTGCACAAACGAGGGAAG TACATCAAGACCTG | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_E17K_rev | CAGGTCTTGATGTACTTCCC TCGTTTGTGCAGC | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_R25C_for | CAAGACCTGGCGGCCATGC TACTTCCTCCTCAAG | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| QC_AKT1_R25C_rev | CTTGAGGAGGAAGTAGCAT GGCCGCCAGGTCTTG | Mutagenese | metabion GmbH, Planegg, Deutschland |
| AKT1_seq_forw | ATGAGCGACGTGGCTATTG TGAAGGAGG | Sequenzierung | Eurofins GSC, Luxembourg, Luxemburg |
| AKT1_seq_rev | TCAGGCCGTGCCGCTGGCC G | Sequenzierung | Eurofins GSC, Luxembourg, Luxemburg |

3.1.8 Enzyme und rekombinante Proteine

Dieser Abschnitt führt in Tab 3.1.8-1 alle in dieser Arbeit genutzten Enzyme und rekombinanten Proteine, die nicht Teil eines der genutzten Kits sind, auf. Dies umfasst sowohl die für die Klonierung benötigten Restriktionsenzyme als auch die von Rabea Julia Madel aufgereinigten Akt1-Varianten, die für die durchgeführten Akt1/DNA-PK Kinase-Assays essentiell waren.

Tab 3.1.8-1 Verwendete Proteine

| Proteine | Einsatzgebiet | Referenz |
|-----------------------|---------------|------------------------------------------|
| <i>EcoRI</i> Nuklease | Klonierung | Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| <i>BamHI</i> Nuklease | Klonierung | Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| <i>SalI</i> Nuklease | Klonierung | Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| GSK-3 Peptid | Kinase-Assay | SignalChem, Richmond, Kanada |

3 Material und Methoden

| Proteine | Einsatzgebiet | Referenz |
|-------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Humanes Akt1-S473A | Kinase-Assay | Masterarbeit R. Madel, 2014 |
| Humanes Akt1-T308A | Kinase-Assay | Masterarbeit R. Madel, 2014 |
| Humanes Akt1-T308A/S473A | Kinase-Assay | Masterarbeit R. Madel, 2014 |
| Humanes Akt1-T308D/S473D | Kinase-Assay | Masterarbeit R. Madel, 2014 |
| Humanes Akt1-WT | Kinase-Assay | Masterarbeit R. Madel, 2014 |
| Proteinase K | Comet Assay | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Trypsin (0,05% in 0,02% EDTA) | Zellkultur | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

3.1.9 Antikörper

Hier in Tab 3.1.9-1 und Tab 3.1.9-2 werden alle für diese Arbeit benötigten Antikörper aufgeführt.

Tab 3.1.9-1 Verwendeten Primärantikörper

| Antikörper | Wirtspezies | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Akt pan | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Cyclin-B 1 | Maus | Immuno: 1:100 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA |
| eGFP | Kaninchen | Western Blot: 1:1000; Immuno: 1:100 | Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland |
| FoxO3a | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| GSK3 | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Halo-Tag | Maus | Immuno 1: | |
| mTOR | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| p-GSK3 | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Phospho-FoxO1 (Thr24)/FoxO3a (Thr32) | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| p-MDM2 | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| p-mTOR | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| p-S473 Akt XP | Kaninchen | Western Blot: 1:1000, Immuno 1: | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| p-T308 Akt XP | Kaninchen | Western Blot: 1:1000, Immuno 1:100 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| RXRXXpS/pT | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| β -Actin | Maus | Western Blot: 1:20.000 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| γ -H3.AX | Kaninchen | Western Blot: 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| γ -H3.AX-AF 647 | Maus | direkt gekoppelt mit Alexa Flour 647, Immuno: 1:75 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |

3 Material und Methoden

Tab 3.1.9-2 Verwendete Sekundärantikörper

| Antikörper | Wirtspezies | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------|-------------|----------------------|-------------------------------------------------|
| Anti-Kaninchen-AF 488 | Ziege | Immuno: 1:400 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Anti-Kaninchen-AF 555 | Ziege | Immuno: 1:400 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Anti-Kaninchen-HRP | Ziege | Western Blot: 1:2000 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Anti-Maus-AF 488 | Ziege | Immuno: 1:400 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Anti-Maus-AF 555 | Ziege | Immuno: 1: 400 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Anti-Maus-HRP | Pferd | Western Blot: 1:2000 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |

3.1.10 Ursprüngliche und erzeugte Plasmide

Die folgende Tabelle 3.1.10-1 zeigt alle für diese Arbeit genutzten sowie die eigens erstellten Plasmide. Darüber hinaus sind neben der Größe in Basenpaaren der Vektoren ihre Besonderheiten, der Name des in den Vektor ligierten DNA-Fragments und der Referenz aufgelistet. Im Anhang finden sich die Vektorkarten der Plasmide.

Tab 3.1.10-1 Liste der verwendeten Plasmide

| Plasmid | Größe | Verwendung | Referenz |
|-----------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------|---------------------|
| pBABE-puro | 5169 Bp | Ursprungsvektor | |
| pBABE-eGFP | 5874 Bp | Zielplasmid für AKT1-Varianten | Nikola Haneke, 2010 |
| pBABE-AKT1_WT-eGFP | 7296 Bp | Virenproduktion und stabile Expression des AKT1-WT-eGFP | Nikola Haneke, 2010 |
| pBABE-AKT1_E17K-eGFP | 7296 Bp | Virenproduktion und stabile Expression des AKT1-E17K-eGFP | Diese Arbeit |
| pBABE-AKT1_R25C-eGFP | 7296 Bp | Virenproduktion und stabile Expression des AKT1-R25C-eGFP | Diese Arbeit |
| pBABE-myrAKT1(-PH)-eGFP | 7166 Bp | Virenproduktion und stabile Expression des AKT1-myrAKT1(-PH)-eGFP | Nikola Haneke, 2010 |
| pBABE-AKT1_T308D/S473D-eGFP | 7296 Bp | Virenproduktion und stabile Expression des AKT1-T308D/S473D-eGFP | Diese Arbeit |
| pBABE-Akt-K179A-eGFP | 7296 Bp | Virenproduktion und stabile Expression des AKT1-K179A | Diese Arbeit |

3.1.11 Ursprüngliche und erzeugte Bakterienstämme

In diesem Abschnitt in Tab 3.1.11-1 und 3.1.11-2 werden alle genutzten ursprünglichen Bakterienstämme aufgelistet. Des Weiteren werden die erzeugten Bakterien genannt, die über Transformation mit zusätzlichen Plasmiden versehen wurden. Zudem werden ihre genetischen Besonderheiten und die Lieferanten aufgeführt.

Tab 3.1.11-1 Liste der verwendeten Bakterienstämme

| Name | Ursprung | Genotyp | Referenz |
|--------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| DH5 α | <i>E. coli</i> | F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 | Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| DH5 α - pBABE-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-eGFP | Helena Riffkin & Nikola Haneke, 2010 |
| DH5 α - pBABE-AKT1_WT-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-AKT1-WT-eGFP | Helena Riffkin & Nikola Haneke, 2010 |
| DH5 α - pBABE-AKT1_E17K-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-AKT1-E17K-eGFP | Diese Arbeit |
| DH5 α - pBABE-AKT1_R25C-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-AKT1-R25C-eGFP | Diese Arbeit |
| DH5 α - pBABE-myrAKT1(-PH)-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-AKT1-myrAkt1(-PH)-eGFP | Helena Riffkin & Nikola Haneke, 2010 |
| DH5 α - pBABE-AKT1_T308D/S473D-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-AKT1-T308D/S473D-eGFP | Diese Arbeit |
| DH5 α - pBABE-Akt-K179A-eGFP | DH5 α | Trägt zusätzlich das Plasmid pBABE-AKT1-K179A-eGFP | Diese Arbeit |

3.1.12 Ursprüngliche und erzeugte Zelllinien

Hier werden die angewendeten ursprünglichen Zelllinien mit Herkunft und Besonderheiten erwähnt sowie die erzeugten Zelllinien beschrieben. (vgl. Tab 3.1.12-1 und Tab 3.1.12-2)

Als Grundlage für die Entwicklung weiterer Zelllinien dienten murine Prostata-Krebs-Zellen (TrC1) und AKT1-defiziente, murine, embryonale Fibroblasten (MEF -/-). In beiden Zelllinien wurden Akt1-Mutanten mittels retroviralem Gentransfers etabliert und folgende eGFP-fusionierte Konstrukte erstellt.

Tab 3.1.12-1 Liste der eingesetzten ursprünglichen Zelllinien

| Name | Spezies & Gewebeart | Herkunft |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| TRAMP-C1 (TrC1) | murine Prostata-Krebs-Zellen | ATCC, Manassas, VA, USA |
| MEF AKT1 -/- (MEF -/-) | Murine embryonale Fibroblasten aus C57BL/6 AKT1 knock-out Mausembryonen | Birnbaum-Labor, Philadelphia, USA |
| MEF ctr | Murine embryonale Fibroblasten aus C57BL/6 Mausembryonen | Birnbaum-Labor, Philadelphia, USA |
| Platinum-E (Plat-E) | Transfizierte HEK293-Zellen für retrovirale Virenproduktion | Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA |

3 Material und Methoden

Tab 3.1.12-2 Liste der in dieser Arbeit erzeugten Zelllinien

| Kurzname | Ursprungszellen | Expression von | Funktion / postulierter Effekt |
|--------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------------------|
| Plat-E pBEC | Plat-E | eGFP | Virenproduktion |
| Plat-E WT | Plat-E | Akt1-WT-eGFP | Virenproduktion |
| Plat-E E17K | Plat-E | Akt1-E17K-eGFP | Virenproduktion |
| Plat-E R25C | Plat-E | Akt1-R25C-eGFP | Virenproduktion |
| Plat-E K179A | Plat-E | Akt1-K179A-eGFP | Virenproduktion |
| Plat-E myr | Plat-E | Akt1-myr(-PH)Akt1-eGFP | Virenproduktion |
| Plat-E TDSD | Plat-E | Akt1-T308D/S473D-eGFP | Virenproduktion |
| TrC1 pBEC | TrC1 | eGFP (stabil) | Leervektor-Kontrolle |
| TrC1 WT | TrC1 | Akt1-WT-eGFP (stabil) | Wildtyp-Kontrolle |
| TrC1 E17K | TrC1 | Akt1-E17K-eGFP (stabil) | erhöhte PIP ₃ Koordination |
| TrC1 R25C | TrC1 | Akt1-R25C-eGFP (stabil) | gehinderte PIP ₃ Koordination |
| TrC1 K179A | TrC1 | Akt1-K179A-eGFP (stabil) | gehinderte ATP-Bindung |
| TrC1 myr | TrC1 | Akt1-myr(-PH)Akt1-eGFP (stabil) | myristoyliert (Membrananker) |
| TrC1 TDSD | TrC1 | Akt1-T308D/S473D-eGFP (stabil) | Konstitutiv aktiv |
| MEF pBEC | MEF -/- | eGFP (stabil) | Leervektor-Kontrolle |
| MEF WT | MEF -/- | Akt1-WT-eGFP (stabil) | Wildtyp-Kontrolle |
| MEF E17K | MEF -/- | Akt1-E17K-eGFP (stabil) | erhöhte PIP ₃ Koordination |
| MEF R25C | MEF -/- | Akt1-R25C-eGFP (stabil) | gehinderte PIP ₃ Koordination |
| MEF K179A | MEF -/- | Akt1-K179A-eGFP (stabil) | gehinderte ATP-Bindung |
| MEF myr | MEF -/- | Akt1-myr(-PH)Akt1-eGFP (stabil) | myristoyliert (Membrananker) |
| MEF TDSD | MEF -/- | Akt1-T308D/S473D-eGFP (stabil) | Konstitutiv aktiv |

3.1.13 Verwendete Mausstämme

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tumorstudien wurden in zwei Mausstämmen durchgeführt. Diese sind in Tab 3.1.13-1 mit ihren Eigenschaften und Ursprung aufgelistet. Die C57BL/6 Mäuse wurden im Institut für Zellbiologie gehalten. Die immundefizienten NMRI-nu/nu Nacktmäuse mussten auf Grund des erforderlichen Hygienestandards im zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums durchgeführt werden. Von beiden Stämmen wurden ausschließlich männliche Tiere für die Experimente genutzt.

Tab 3.1.13-1 Liste der eingesetzten Mausstämme

| Name | Stamm | Eigenschaften | Herkunft |
|---------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| NMRI-NU | RjOrl:NMRI-Foxn1 ^{nu} /Foxn1 ^{nu} | Immundefizienter mausstamm, kongener Auszuchtstamm | Nackt-albino Zentrales Tierlaboratorium, Universitätsklinikum Essen, Deutschland |

3.1.14 Datenbanken

Für die Arbeit wurden folgende in Tab 3.1.14-1 genannten Datenbanken verwendet.

Tab 3.1.14-1 Verwendete Datenbanken

| Datenbank | Quellenangabe |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) | Broad Institute, Cambridge, MA, USA |
| Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC) | Trust Sanger Institute, Hinxton, England |
| WHO Mortality Database | IARC, Lyon, Frankreich |

3.1.15 Digitale Auswertungs- und Bearbeitungsprogramme

Tabelle 3.1.15-1 listet alle Programme auf, die für die Erstellung der Ergebnisse und Abbildungen in dieser Arbeit benötigt wurden.

Tab 3.1.15-1 Genutzte digitale Auswertungs- und Bearbeitungsprogramme

| Programm | Hersteller |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Adobe Illustrator CS6 | Adobe Systems, San José, CA, USA |
| Adobe InDesign CS6 | Adobe Systems, San José, CA, USA |
| Adobe Photoshop CS6 64-bit | Adobe Systems, San José, CA, USA |
| AxioVision Software LE64 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Bioformats Importer ImageJ plugin | Glencoe Software, Inc., Seattle, WA, USA |
| Cell Quest | Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| CLC DNA Workbench | CLC Bio, Qiagen, Waltham, MA, USA |
| Flowing software 3.5 | Perttu Terho, Zentrum für Biotechnologie, Turku, Finnland |
| Focinator v1-03 | Diese Arbeit, [157] |
| Fusion Software | VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland |
| GraphPad Prism 5.01 | GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA |
| ImageJ | Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA |
| Microsoft Office | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| OpenComet | Gyori <i>et al.</i> , Redox Biol, 2014 |
| R | The R Foundation, Wien, Österreich |
| RStudio | RStudio, Boston, MA, USA |
| SnapGene Viewer | GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA |
| ZEN2 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Primer-Design

Für die Polymerase-Kettenreaktion (vgl. 3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)) wurden genspezifische Primer benötigt. Diese sind synthetisierte Einzelstrang-DNA-Moleküle mit einer Länge ca. 25 Basenpaaren (Bp). Jeder Primer besitzt auf Grund seiner Sequenz eine spezifische Schmelztemperatur (T_m), die für das Anlagern der Primer während der Hybridisierungsphase am zu vervielfältigenden DNA-Strang eine wichtige Rolle spielt (vgl. 3.1.7 Oligonukleotide). Je nach Design des Primers kann ein DNA-Fragment amplifiziert und mit Restriktionsstellen versehen werden. Dies ermöglicht die Ligation (vgl. 3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten) der DNA in Plasmide, die ebenfalls diese Schnittstellen in ihrer Sequenz tragen. Eine weitere Anwendung für Primer ist die über einen DNA-Strang durchgeführte Punkt-Mutagenese. In diesem Fall ist der Primer länger und trägt die gewünschte Mutation in seiner Mitte. Die DNA-Amplifikate besitzen nach der PCR diese Mutation, da die Primer im Laufe der PCR Teil des Amplifikats werden (vgl. 3.3.12 Site-Directed Mutagenese PCR).

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung von bestimmten DNA-Abschnitten [152, 182]. Diese Teilabschnitte werden durch Primer begrenzt (vgl. 3.1.7 Oligonukleotide S.47). Bei der Durchführung einer PCR werden die DNA-Matrizen zusammen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einem genspezifischen Primer-Paar in einem geeigneten Puffer mittels eines Thermocyclers inkubiert. Ein PCR-Zyklus umfasst drei Schritte, Denaturierung, Hybridisierung und Elongation (siehe Tab 3.3.2-1). Dieser Zyklus wird 20- bis 30-mal wiederholt und ermöglicht die exponentielle Amplifikation [181]. Das Temperaturprogramm des PCR-Zyklus hängt von den T_m -Werten der Primer ($T_m = 2^\circ\text{C} * (A + T) + 4^\circ\text{C} * (G + C)$), der Länge des zu amplifizierenden Teilstückes und der verwendeten DNA-Polymerase ab [225]. Bei hohen Temperaturen denaturieren die DNA-Doppelstränge und die Primer können darauf während der Hybridisierung bei einer bestimmten Temperatur binden. In der Elongationsphase werden die DNA-Fragmente durch die DNA-Polymerase amplifiziert. In dieser Arbeit wurde das Phusion High-Fidelity DNA PCR Kit verwendet. Die Kontrolle der PCR erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese mit einem 0,8% TAE Agarosegel (vgl. 3.3.5 Gel-Elektrophorese S.55).

Tab 3.2.2-1 Verwendetes Temperaturprogramm der PCR

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [sek] | |
|---------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 1 | Denaturierung | 95 | 300 |
| 2 | Denaturierung | 95 | 30 |
| 3 | Hybridisierung | 50-60 (T _m der Primer) | 45 |
| 4 | Elongation | 72 | 45 pro 1kBp |
| 5 | Letzte Elongation | 72 | 300 |
| 6 | | 4 | bis zur Probenentnahme |

30 Zyklen

3.2.3 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen bzw. Restriktionsenzyme sind rekombinante Proteine, die an spezifische Erkennungssequenzen doppelsträngiger DNA binden. Nach der spezifischen Bindung wird die Phosphodiesterbindung der DNA hydrolytisch gespalten. Beide DNA-Stränge werden jeweils einmal pro Erkennungssequenz geschnitten. Dabei entstehen, abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym, überhängende Enden mit spezifischer Sequenz (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends). Im 10-fach Fast Digest Green-Puffer können alle Enzyme parallel verwendet werden. Die pipettierten Restriktionsansätze wurden für 5-15 min bei 37°C auf einem Heizblock inkubiert. Die Proben wurden daraufhin direkt auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen, da der 10-fache FastDigest Green Puffer auch als Ladepuffer fungiert. Die Restriktion von DNA wurde auf diese Weise sowohl für das Schneiden von zu ligierenden DNA-Fragmenten (vgl. 3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten S.54) genutzt als auch zum Identifizieren von positiven Klonen. Die Restriktionsansätze wurden in beiden Fällen, wie in Tab 3.3.3-1 angegeben, angesetzt.

Tab 3.2.3-1 Bestandteile des Restriktions-Doppelverdau

| Bestandteil | Volumen [µL] |
|---------------------------------|--------------|
| DNA (10 ng) | 1 |
| FastDigest Enzyme A | 1 |
| FastDigest Enzyme B | 1 |
| 10-fach FastDigest Green Puffer | 2 |
| Nukleasen-freies Wasser | 15 |

3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

In einer Ligrationsreaktion werden zwei doppelsträngige DNA-Fragmente über eine Phosphodiesterbindung kovalent miteinander verknüpft. Die neue Bindung entsteht dabei aus der 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotids und der 3'-Hydroxylgruppe eines anderen

Nukleotids. Dies wird von einer DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch durchgeführt. Damit die Ligation ablaufen kann, müssen die beiden zu ligierenden DNA-Stränge entweder überhängende homologe oder glatte Enden besitzen. Im Verlauf einer Klonierungen wird ein geschnittenes DNA-Fragment (Insert) durch die Ligase in ein Zielplasmid ligiert. Das so entstandene Plasmid kann daraufhin in Bakterienzellen transformiert (vgl. 3.2.9 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen S.57) werden. Der verwendete Ligationsatz ist in Tab. 3.2.4-1 aufgelistet.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass sich das Insert mit dem Plasmid verbindet, wurde das Insert in dreifach molarem Überschuss in den Ligationsansatz gegeben. Des Weiteren wurde nach dem Protokoll des Rapid Ligation Kits verfahren.

Tab 3.2.4-1 Verwendeter Ligationsansatz

| Bestandteil | Volumen [μL] |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Geschnittenes Zielplasmid | Je nach Konzentration (75 ng) |
| Geschnittenes Insert | 3:1 molarer Überschuss |
| 5-fach Rapid Ligation Puffer | 4 |
| T4 DNA Ligase, 5U/ μL | 1 |
| Nukleasen-freies Wasser | Auf 20 μL |

3.2.5 Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet. Der Begriff Elektrophorese bezeichnet die Wanderung geladener Teilchen durch ein Trägermaterial in einem elektrischen Feld [183]. Als Matrix für die Elektrophorese dient ein Agarosegel. Nukleinsäuren wandern im Agarosegel aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste im Rückgrat zur Kathode, dies ermöglicht eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe. Um die Fragmente im UV-Licht bei 254 nm sichtbar zu machen, enthält der Agaroseansatz GelRed.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 0,8%ige Agarosegele in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) genutzt. Zur Markierung der zu trennenden Substanzen wurden 5 μL des Markierungsstoffes GelRed auf 100 mL TAE-Puffer gegeben. Dieser lagert sich während der Elektrophorese in die wandernde DNA ein und lässt diese so im UV-Licht fluoreszieren. Ein Gelkamm wurde zur Aussparung der Probenaschen eingesetzt. Das Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. PCR-Ansätze wurden vor dem Pipettieren in die Geltaschen mit Probenpuffer, in einem Verhältnis von 1:6, versetzt. Restriktionsansätze konnten direkt in die Taschen des Agarosegels aufgetragen werden. Als Größenstandard diente der Zip Ruler Express Ladder 2 (vgl. Abb. 10.1-1 S.184). Die Elektrophorese

wurde nach dem Auftragen der Proben mit einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 60 min durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht in einer UV-Licht-Kammer fotografiert.

3.2.6 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

Um restringierte DNA oder PCR-Produkte aus Agarose-Gelen zu extrahieren, wurden die jeweiligen Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in NTI-Puffer aus dem PCR Clean-up & Gel Extraction Kit gelöst. Anschließend wurde, wie im Protokoll des Herstellers angegeben, weiterverfahren.

3.2.7 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5 α erfolgte in LB Medium für zehn bis zwölf Stunden bei einer Temperatur von 37°C in einem Schüttelinkubator bei 120 rpm. Da pBABE-basierte Vektoren eine Ampicillin-Resistenz aufweisen, wurde dem Medium das Antibiotikum Ampicillin (Amp) zugefügt, um eine Selektion der Ampicillin-resistenten Plasmide bzw. positiver Transformanden zu gewährleisten. Um eine monoklonale Selektion putativ positiv transformierter Bakterien zu erreichen, wurden diese auf LB-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten bestanden aus warmem LB-Medium mit 1,6% (w/v) Agar und Ampicillin, das in 10 cm Petrischalen gegossen und ausgehärtet wurde. Die Platten wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert. Es wurde jeweils eine monoklonale Kolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 2 mL vorbereitetes Selektionsmedium gegeben. Von positiven Klonen wurde ein Kryo-Stock erstellt, indem zu 800 μ L einer Übernachtskultur 200 μ L Glycerin gegeben wurden. Die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Transformation bezeichnet den nicht-viralen Transfer fremder DNA in kompetente Zellen, wie z.B. Bakterien, um bei der Replikation auch die Fremd-DNA, das Plasmid, zu amplifizieren. Eine Möglichkeit zur Transformation von Bakterien ist die Hitzeschock-Transformation. Die Bakterien werden mit einer Salz-Lösung behandelt, die die Glykosid-Zellwand abbaut. So können die Bakterien unter Hitzeeinwirkung die fremde DNA durch ihre Zellmembran aufnehmen. So können die Bakterien unter Hitzeeinwirkung die fremde DNA durch ihre Zellmembran aufnehmen. [45, 138]

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 2 mL einer Übernachtskultur in 100 mL LB-Medium überführt. Diese Kultur wurde für ca. 2 Stunden bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Darauf wurde die Kultur für 5 min auf Eis gekühlt und bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 mL TfbI-Puffer resuspendiert. Es folgte eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Nach erneutem Zentrifugieren der Bakterien wurde das Pellet in 4 mL TfbII-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden 50-100 µL in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Chemisch kompetente *E. coli* Zellen können bei -80°C gelagert werden.

3.2.9 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Vorbereitung der Proben erfolgte auf Eis. Für die Transformation wurden 50 µL kompetenter *E. coli* Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 10 µL des Ligationsansatzes 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für eine Minute einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, was zu einer verbesserten DNA-Aufnahme führt. Nach sofortigem zweiminütigen Abkühlen auf Eis wurden 400 µL SOC-Medium (Tab 3.3.9-1 S.48) hinzugegeben und die Kultur eine Stunde lang bei 37°C bei 120 rpm im Heizblock inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µL auf einer vorgewärmten Amp-Selektionsplatte ausgestrichen und für 10-12 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Kolonien der Amp-resistenten putativ positiven Klone wurden in Übernachtskulturen vermehrt. Diese Kulturen wurden mittels des Minipräparationsprotokolls (vgl. 3.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA (Standard-Minipräparation) S.57) weiterverarbeitet.

3.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA (Standard-Minipräparation)

Für jedes klonierte Konstrukt wurden drei Einzelklone von der Selektionsplatte gepickt. Diese wurden in Reagenzgläser mit 3 mL LB-Amp-Medium gegeben und bei 37°C für 10-12 h im Wasserbad geschüttelt. Von diesen Bakterien-Suspensionskulturen wurden jeweils 2 mL in ein Reaktionsgefäß überführt und nach dem Protokoll des Plasmid DNA Purification-Kits verarbeitet. Von der so isolierten Plasmid-DNA wurde die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop-Photometers gemessen (vgl. 2.2.14 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration). gemessen (vgl. 3.2.14 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration S.59). Von jeder gewonnenen DNA wurde 1 µL für eine Testrestriktion mit den für die Klonierung benutzten Restriktionsenzymen genutzt. Dieser Restriktionsansatz wurde auf ein

Agarosegel aufgetragen, um potentiell positive Klone mit dem gewünscht DNA-Fragment im Zielplasmid zu identifizieren. Je Konstrukt wurde eine positive Probe sequenziert.

3.2.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Kontrolle der verschiedenen Konstrukte auf die gewünschten Mutationen bzw. zusätzlicher ungewünschter Mutationen wurden die Plasmide sequenziert. Sequenzierung basiert auf einer DNA-Kettenabbau-Reaktion [187]. Die Proben wurden mit Hilfe des SmartSeq-Kits vorbereitet und im Anschluss an Eurofins zur Sequenzierung geschickt. Dazu wurden die Proben auf 75 ng/μL verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 15 μL mit 2 μL des zugehörigen Sequenzierprimers in ein SmartSeq-Reaktionsgefäß überführt. Da jede Probe in beide Richtungen sequenziert werden sollte, wurden jeweils zwei Reaktionsgefäße je Probe mit dem zugehörigen Primern (vgl.3.1.7 Oligonukleotide S.47) versehen.

3.2.12 Site-Directed Mutagenese-PCR

Site-Directed Mutagenese-PCR ist eine Methode, bei der eine Punktmutation in ein Gen eines Plasmids eingefügt werden kann [30, 117]. Die Punktmutation wird so gewählt, dass die substituierte Base bei der Translation zu einem Austausch einer Aminosäure führt. Die mutierte Aminosäuresequenz kann die Funktion oder den Bindungscharakter des Proteins beeinflussen. Mit Hilfe dieser Methode wurden in dieser Arbeit verschiedene Mutationen von Akt1 mit unterschiedlichen Aktivitäten erzeugt. Die jeweiligen Primerpaare für die zielgerichtete Mutagenese sind im Abschnitt 3.1.7 Oligonukleotide S.47 aufgelistet. Es wurde das QuikChange II-Kit laut Herstellerangaben angewandt. Um unerwünschte Mutationen zu vermeiden, wurde für die Site-Directed Mutagenese PCR die im Kit enthaltene Polymerase durch die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase ersetzt.

3.2.13 DNA-Isolierung aus Bakterienzellen (Maxipräparation)

Nach positiver Kontrolle der gewünschten Mutationen durch die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA für die Transfektion von eukaryotischen Zellen in größerer Menge mit Hilfe einer Maxipräparation isoliert.

Es wurde nach dem Protokoll des Plasmid Maxi-Kits zur Maxipräparation verfahren. Die isolierte Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 1 mg/mL eingestellt (vgl. 3.2.14 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration S.59).

3.2.14 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration von Proben wurde eine spektralphotometrische Methode verwendet. Dies erfolgte mit Hilfe des NanoDrop-Photometers. Als Referenzwert wurde der Puffer des jeweiligen Aufreinigungskits verwendet. Die Bedingung des NanoDrops wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Vor Beginn der Arbeiten wurde die Sterilbank jeweils für zehn Minuten UV-Licht ausgesetzt und mit Incidin desinfiziert. Abhängig von den Experimenten wurden verschiedene Medien, Zellkulturflaschen, Petrischalen und Multi-Well-Platten verwendet. Hierzu wurden ausschließlich autoklavierte bzw. sterile Einweg-Materialien verwendet.

Sowohl TrC1, MEF $-/-$ Zellen, Plat-E Zellen als auch transfizierte und transduzierte Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in DMEM Medium mit Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS) in 75 cm² oder 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und in einem Inkubator bei 37°C, 99% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. Zur Selektion und Kontaminationsprophylaxe wurden transduzierte Zellen eine Woche vor und zwei Wochen nach dem GFP-basierten Sortieren in DMEM mit 10% FCS, 1x Penicillin/Streptomycin (Pen/Step), 1 µg/mL Ciprofloxacin und 4 µg/mL Puromycin expandiert.

3.3.2 Passagieren von Zellen

Um eine Konfluenz der Zellen bzw. eine Zelldichte von über 70% zu vermeiden, wurde im Verlauf des Kultivierens der Zellen ein Verdünnen der Kultur durchgeführt. Dies gewährleistet eine konstante Proliferation und verhindert eine Veränderung verschiedener z.B. auf Integrinen-basierender Signalwege.

Für das Passagieren wurde zunächst das alte Medium verworfen und die adhärenierten Zellen mit sterilem DPBS gewaschen (pro 75 cm² Flasche 5 mL TE, pro 175 cm² Flasche 10 mL). Auf diese Weise wurden tote Zellen und Reste des vorherigen Mediums entfernt. Zum Ablösen der Zellen erfolgte das Trypsinieren mittels TE-Lösung bei 37°C für 5 min (pro 75 cm² Flasche 2 mL TE, pro 175 cm² Flasche 5 mL). Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde frisches Zellmedium (vgl. 3.1.6 Kulturmedien und Zusätze) hinzugegeben (pro 75 cm² Flasche 8 mL TE, pro 175 cm² Flasche 21 mL). Die Zellsuspension wurde je nach Bedarf an

Zellen in einer Verdünnung von 1:5, 1:10 oder 1:20 angesetzt. Alternativ konnte auch die Zellkonzentration (vgl. 3.3.4 Quantifizierung vitaler Zellen mittels CASY® Cell Counter S.60) gemessen und eine bestimmte Anzahl Zellen ausgesät werden.

3.3.3 Konservieren und Reaktivieren von Zellen

Zum Lagern von Zellen wurde eine Kryo-Konservierung durchgeführt. Auf diese Weise können Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff für mehrere Jahre gelagert werden. DMSO im Einfriermedium verhindert während des Prozesses die Eiskristallbindung an den Zellen. Ein Großteil der Zellen überlebt das Auftauen und kann wieder in Kultur genommen werden. Um die Lagerung der Zellen vorzubereiten, wurden die Zellen zunächst trypsiniert, einmalig mit DPBS gewaschen und in DPBS suspendiert. Zellen wurden gezählt und mit Einfrier-Medium (DMEM mit 20% FCS, sowie 10% DMSO) auf eine Konzentration auf eine Million Zellen pro mL verdünnt (vgl. 3.3.4 Quantifizierung vitaler Zellen mittels CASY® Cell Counter). Je ein mL diese Suspension wurde in ein Kryo-Röhrchen gegeben und schonend in einem 5100 Kryo-Container, Isopropanol-Einfriergefäß, über Nacht bei -80°C eingefroren. Die dauerhafte Kryokonservierung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Reaktivieren wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit 10 mL frischem DMEM mit 10% FCS gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und DMSO zu entfernen.

3.3.4 Quantifizierung vitaler Zellen mittels CASY® Cell Counter

Die Bestimmung der Zellzahl vitaler Zellen wurde mittels des CASY® Cell Counter & Analyzer durchgeführt. Diese basiert auf einer Widerstandsmessung bei Zelldurchtritt mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran, die isolierend wirkt, verursachen hierbei andere Signale als geschädigte Zellen. Der Widerstand der durch die Kapillare wandernden Zellen korreliert mit der Intaktheit der Zellmembran und gibt so Rückschlüsse auf die Zellzahl. [131]

Für die Bestimmung der Zellzahl müssen sich die Zellen einzeln in Lösung befinden. Die Zellsuspension wird abhängig von der Zelldichte mit CASY®Ton-Messpuffer verdünnt (50 - 100 μL Zelllösung in 10 mL CASY®Ton). Der Zellzähler berechnet nach Mittelung dreier Messungen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration der Stammlösung (Zellen pro mL). Die gemessene Suspension kann nun für weitere im Experiment benötigte Zellzahlen verdünnt werden.

3.3.5 Transfektion von Säugetierzellen

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in Zellen. In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz TransIT-LT1 benutzt. Die Transfektion mittels dieses Reagenzes basiert auf dem Prinzip der Lipofektion. Das Reagenz bildet mit der einzubringenden DNA Komplexe und erzeugt so Liposom-artige Strukturen. Diese werden dann durch Fusion mit der Zellmembran aufgenommen und die DNA in das Zytoplasma entlassen. [69]

Es gibt verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für diese Methode. So kann z.B. ein Plasmid in Säugetierzellen eingebracht werden, um ein zuvor kloniertes Gen zu exprimieren. In solch einem Fall besitzt das Plasmid neben dem gewünschten Gen starke Promotoren (Säugetierkompatible, wie CMV oder SV40) und Ribosomenbindestellen. Weiterhin bieten die meisten Plasmide die Möglichkeit zur Selektion (vgl. 3.3.7 Selektion von transfizierten und transduzierten Zellen S.64) der eukaryotischen Zellen mit Hilfe von Resistenzgenen, ähnlich denen der Bakterienplasmide. Eine weitere weit verbreitete Anwendung der Transfektion ist das Herunterregulieren von Zielproteinen durch Hemmung der RNA des Proteins mittels eingebrachter small interfering RNA (siRNA).

Die Transfektion der in dieser Arbeit verwendeten Plat-E Zellen wurde mit Hilfe des TransIT-LT1 Reagenzes nach Herstellerangaben durchgeführt. Die jeweiligen Mengen an Plasmid und Transfektionsreagenz wurden, wie im Protokoll des Herstellers angegeben, an die Größe der Zellkulturgefäße angepasst. In dieser Arbeit wurde die Effizienz der Transfektion direkt über die Expression des grünen Fluoreszenzproteins (eGFP) mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. 3.3.15 Fluoreszenzmikroskopie und Immunfluoreszenz S.70) oder Durchflusszytometrie (vgl. 3.3.14 Durchflusszytometrie S.68) gemessen. Alternativ konnten die exprimierten Proteine mit Hilfe von Western Blots und Zielprotein-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (vgl. 3.4.5 Western Blot S.77).

3.3.6 Virusproduktion und Transduktion von murinen Zellen

Mit Hilfe einer viralen Transduktion ist es möglich ein zuvor kloniertes DNA-Fragment in ein Wirtsgenom zu integrieren und so eine stabile Expression eines gewünschten Proteins zu etablieren.

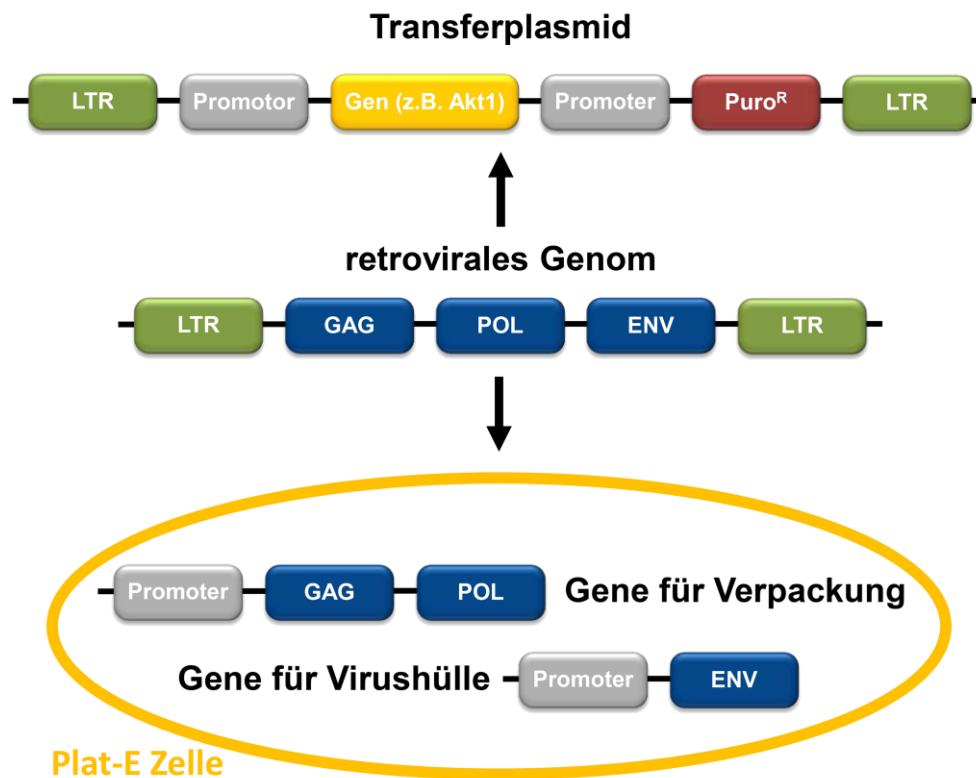


Abb. 3.3.6-1 Retroviraler Ursprung des pBABE/Plat-E Transduktionssystems

Diese Abbildung verdeutlicht schematisch die Erzeugung der Plat-E-Viren-Verpackungszelllinie aus der Ursprungszelllinie HEK293. Durch die Transfektion der HEK293-Zellen zweier Plasmide, die jeweils unterschiedliche Teile des retroviralen Genoms beinhalten. Die für die Expression und Integration im Wirtsgenom benötigten Sequenzen befinden sich auf dem Transferplasmid pBABE. Erstellt anhand von Daten aus [150, 151]

Diese Methode besitzt gegenüber der Transfektion den Vorteil, dass im Laufe der Kultivierung der Zellen oder im Experiment die Expression des gewünschten Proteins unverändert bleibt, da es nicht zu einem Ausdünnen der transfizierten Plasmide kommt. Dies rührt von der Tatsache, dass eukaryotische Zellen im Gegensatz zu Prokaryoten Plasmid-DNA nicht kopieren. [151]

Die Virusproduktion wurde mit Hilfe eines ecotropen retroviralen Expressionssystems durchgeführt. Zu dem in dieser Arbeit verwendeten System gehört zum Einen das Säugetier-Expressionsplasmid pBABE-puro und zum Anderen die Zelllinie Platinum-E (Plat-E). Das pBABE-puro Plasmid dient als Transferplasmid und beinhaltet flankiert von zwei langen sich wiederholenden DNA-Sequenzen (Long Terminal Repeat (LTR)) das zu integrierende DNA-Fragment. Diese DNA wird als Provirus bezeichnet, wobei die LTRs für die Integration in das Wirtsgenom benötigt werden. [150]

Plat-E Zellen sind im Ursprung HEK-293T Zellen, welche die retroviralen Gene GAG und POL tragen. Diese sind für das Verpacken des Provirus nötig. Zusätzlich besitzen sie das

3 Material und Methoden

ENV-Gen. Es wird für den Aufbau der Virushülle benötigt und bestimmt daher auch die Fähigkeit des Virus eine Wirtszelle anzustecken. Plat-E Zellen produzieren ecotrope Viren, die ausschließlich Ratten- und Mauszellen infizieren können.

Die Plat-E und die zu transduzierenden Zielzellen (TrC1, MEF -/-) wurden am selben Tag ausgesät. Es wurden jeweils 500.000 Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche in 10 mL DMEM mit 10% FCS gegeben. Sobald die Plat-E Zellen eine Dichte von 50-70% erreicht hatten, wurde die Transfektion mit den Transferplasmiden mit TransIT-LT1 Transfektionsreagenz durchgeführt. Die Komplexbildung von DNA und Reagenz erfolgte in 1 mL serumfreien DMEM. Zunächst wurden 10 µg Plasmid-DNA im Medium verteilt. Darauf wurden 30 µL TransIT-LT1 hinzugefügt und der Ansatz durch Invertieren vermischt. Zur Bildung der Komplexe wurde der Ansatz für 25 min bei RT inkubiert. Gegen Ende dieser Inkubationszeit wurde das Medium von den Plat-E Zellen durch 7 mL frisches DMEM mit 10% FCS ersetzt. Der Transfektionsansatz konnte nun tröpfchenweise der Zellkulturflasche hinzugefügt werden. Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht in einem CO₂-Inkubator, wurde am Vormittag des folgenden Tages das Medium von den Zellen entfernt und 8 mL DMEM mit 10% FCS auf die transfizierten Zellen gegeben. Da die transfizierten Plat-E nun bereits Viren in ihr Medium abgeben sollten, wurde jedes Konstrukt einzeln weiterverarbeitet. Um eine Vermischung der verschiedenen Akt1-Mutanten beinhaltenden Viren zu vermeiden, wurde zusätzlich die Sterilbank zwischen jedem Konstrukt gereinigt und 15 min mit UV-Licht bestrahlt. Am Nachmittag des folgenden Tages wurde die Transduktion der Zielzellen durchgeführt. Dies geschah durch die Überführung des Viren beinhaltenden Mediums der Plat-E Zellen auf die Zielzellen. Zunächst wurde das Medium der Plat-E Zellen mit einem 0,45 µm-Filter von Zellresten, toten oder nicht adhärenierten Plat-E Zellen befreit. Dieser Schritt verhindert, dass Plat-E Zellen die Zielkultur kontaminieren. Zu diesem Viren beinhaltenden gefilterten Überstand wurden zur Verbesserung der Transduktionseffizienz das Polykation Hexadimethrinbromid (4 µg/mL; 3,2 µL des 10 mg/mL Stocks) hinzugefügt. Anschließend wurde das Medium von den Zielzellen entfernt und 8 mL der Viruslösung auf die Zellen gegeben. Im Falle der TrC1 wurde am folgenden Tag einmal mit DMEM mit 10% FCS gewaschen. Daraufhin wurde mit der Selektion und Expansion der putativen positiven Zellen begonnen. Da die MEF -/- deutlich langsamer proliferierten, wurde bei der Transduktion dieser Zelllinie ein weiterer Transduktionsschritt eingefügt. Hierzu wurden die Plat-E Zellen nach erster Entnahme des Viren beinhaltenden Mediums erneut mit 8 mL DMEM mit 10% bedeckt. Nach dem Entfernen des ersten Transduktionsmediums konnte so eine weitere Transduktion durchgeführt werden, um die Ausbeute positiver Zellen zu erhöhen.

3.3.7 Selektion von transfizierten und transduzierten Zellen

Die Selektion mit Hilfe von Selektionsantibiotika (vgl. 3.1.6 Kulturmedien und Zusätze) ermöglicht es nicht transfizierte oder transduzierte Zellen zu hemmen. Bei der Expansion von Zellen erhöht sich so in erster Linie die Anzahl der erfolgreich veränderten Zellen.

Einen Tag nach der Transfektion/Transduktion wurde die Selektion mit 1 µg/mL Puromycin in DMEM10% begonnen. Am zweiten Tag konnte die Puromycin-Konzentration auf 4 µg/mL (DMEM4) angehoben werden. Die erhöhte Konzentration an Puromycin bevorzugte das Anreichern von Zellen mit besonders großer Anzahl an aufgenommenen Resistenzgenen und ermöglichte so auf Grund der Beschaffenheit der Konstrukte eine hohe Expression des gewünschten Proteins.

3.3.8 Fluoreszenz-basierte Zellsortierung

Das aktive Zellsortieren basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie (vgl. 3.3.13 Durchflusszytometrie). Das in dieser Arbeit genutzte Durchflusszytometer FACSDiva ist in der Lage Zellen auf Grund verschiedener Eigenschaften auszuwählen und nach der Messung wieder aufzufangen. Dies wurde genutzt um erfolgreich transduzierte und selektierte Zellen basierend auf ihrer Menge an exprimiertem Akt1-eGFP Protein aus der Gesamtpopulation zu sortieren. Auf diese Weise konnten verschiedene, Akt1-Mutanten exprimierende Zelllinien etabliert werden, die eine möglichst hohe und gleiche Menge an Akt1-eGFP-Fusionsprotein besaßen. Die so angeglichenen Zelllinien waren Grundlage für die Vergleichbarkeit der Effekte der Akt1-Mutanten ohne eine Verfälschung durch Unterschiede in der exprimierten Proteinmenge pro Zelle. Zur Vorbereitung auf die Zellsortierung sollten die Zellen in DMEM+ (vgl. 3.1.6 Kulturmedien und Zusätze) gehalten werden und die Zellzahl sollte 15×10^6 Zellen pro Konstrukt nicht überschreiten. Zunächst wurden die Zellen in Suspension gebracht und die Zelllösung durch einen 70 µm-Filter in ein steriles 50 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Zentrifuge pelletiert (3 min, 1200 rpm) und nach dem Entfernen des Überstandes in 2-4 mL DMEM4 resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde in ein steriles FACS-Röhrchen gegeben und die Zellen zeitnah mit FACSDiva sortiert. Dieser Vorgang wurde für jede Zelllinie einzeln durchgeführt und das FACSDiva nach einer Zelllinie gründlich gespült. Zusätzlich wurden die Zelllinien, die langsamer proliferieren, zuerst sortiert, um das Kontaminieren der Zelllinien untereinander weitestgehend zu reduzieren. Die Sortierung wurde so durchgeführt, dass nur Zellen mit einer grünen Fluoreszenz im Bereich 120- bis 150-facher Intensität der nicht transduzierten Wirtszelle selektiert wurden.

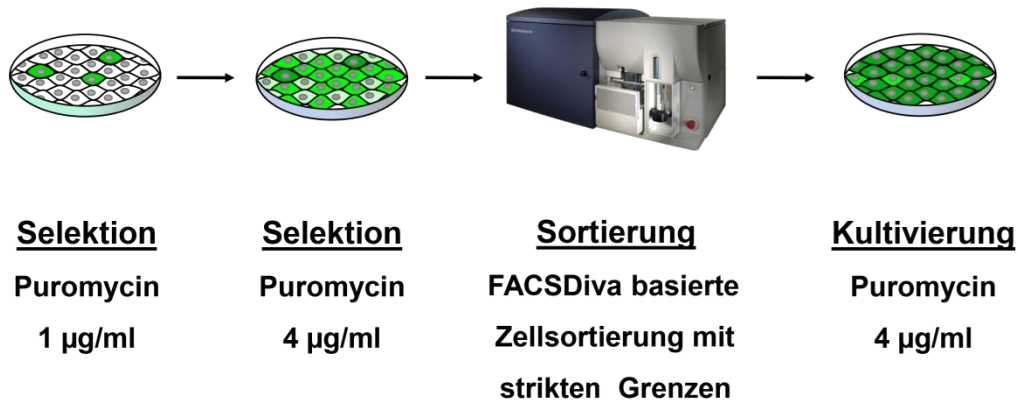


Abb. 3.3.8-1 Ablauf der Generierung von Akt1-Mutanten exprimierender Zellen

Der Ablauf der Generierung von Akt1-Mutanten exprimierenden Zellen beinhaltet mehrere Schritte. Zunächst wurden die Zellen mit 1 µg/mL Puromycin selektiert. Es folgte eine zweite Selektion mit 4 µg/mL Puromycin. Danach wurden die verschiedenen stabil exprimierenden Zelllinien nach ihrem zellulären eGFP-Level mittels Intensität-basierter FACS Diva sortiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung mit 4 µg/mL Puromycin. Erstellt mit Bilddaten der Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.

Die so gewonnenen Zellen wurden in eine 25 cm²-Zellkulturflasche (unter 750.000 Zellen) oder in eine 75 cm²-Zellkulturflasche (über 750.000 Zellen) mit DMEM4 transferiert. Die Zellen wurden unter Selektionsdruck mit DMEM4 expandiert und bei einer Zellanzahl von 20 Millionen für die folgenden Experimente konserviert. Auf diese Weise konnte für alle Experimente mit diesen Zellen auf die gleichen Zelllinien mit angeglicherer Expression der jeweiligen Akt1-Variante zurückgegriffen werden.

3.3.9 Proliferationstest

Für die Proliferationsmessung wurden 100.000 Zellen in DMEM10% in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Für jede Zelllinie und Messzeitpunkt wurde eine eigene Flasche verwendet. Die Zellzahl wurde mittels CASY® Cell Counter nach 24, 48, 72 und 96 h nach Trypsinieren der Zellen gezählt.

3.3.10 Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung (IR)

Bei Photonen (Röntgen-, Gammastrahlen) handelt es sich um indirekt ionisierende Strahlung. Durch das Energiepotential eines Photons wird aus einem Atom auf dem Weg des Photons ein Elektron aus einer äußeren Elektronenschale freigesetzt. Das Photon verliert einen Teil seiner Energie und wird in eine andere Richtung abgelenkt (Streuung). Beim Durchtreten von Materie verliert die ionisierende Strahlung daher einen Teil ihrer Energie. Das freigesetzte Elektron kann seinerseits darauf zu direkter Ionisation führen. Diese Ionisationsereignisse

können wiederum Schäden an Zellen anrichten. Auf diese Weise schädigt die Bestrahlung unter anderem die DNA und die Membran von Zellen. [173]

Je nach experimentellem Aufbau wurden die Zellen in bestimmter Zellzahl und verschiedenen Zellkulturtestplatten am Institut für medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinikum Essen (Prof. Dr. George Iliakis, Universität Duisburg-Essen) mit Photonen aus einem X-RAD 320 X-Ray Biological Irradiator und einer MIR-324 Röntgenröhre bestrahlt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei 320 keV, 10 mA, mit einem 1.65 mm Aluminium-Filter in einem Abstand von 75 cm für 10 cm-Platten und Zellkulturtestplatten bei Raumtemperatur. Die effektive Energie der Photonen betrug dabei ca. 90 keV bei einer Dosisrate von ca. 2,76 Gy/min. Die verwendeten Bestrahlungsdosen lagen im Bereich von 0 bis 40 Gy.

Eine gleichmäßige Dosisverteilung wurde durch eine rotierende Bestrahlungsplatte und einen gleichbleibenden Abstand zur Platte sichergestellt. Nach Bestrahlung wurden die behandelten Zellen unverzüglich in einen Inkubator zurück gebracht, um unerwünschtes Auskühlen der Kultur zu Verhindern.

3.3.11 Kristallviolett-Assay

Effekte auf vitale Zellen können anhand eines Kristallviolett-Assays quantifiziert werden. Dieser Assay dient zur Proliferations- und Viabilitätsmessung nach einer bestimmten Zeit und/oder Behandlung. Der Assay basiert auf dem Anfärben von lebenden Zellen, die an Zellkulturtestplatten adhären. Da die lebenden adhären Zellen den Farbstoff Kristallviolett aufnehmen, korreliert die Stärke der Färbung mit der Anzahl vitaler Zellen, die im jeweiligen Well verbleiben. Zu dem gewünschten Zeitpunkt wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 1% Glutaraldehyd in PBS für 15 min fixiert. Danach wurden sie für 25 min 0,1% Kristallviolett gefärbt. Die Zellen wurden nach dem Auswaschen des nicht aufgenommen Farbstoffes und dem Trocknen der Zellkulturplatte mit 50 µL Triton X-100 (0,2%) in Wasser versetzt. Das Triton X-100 schließt die Zellen auf und der aufgenommene Farbstoff löst sich im Wasser. Die in einem ELISA reader gemessene absorbierte Lichtmenge bei der Wellenlänge 540 nm lässt Rückschlüsse auf die Anzahl der Zellen zu.

3.3.12 Metabolischer Assay mit WST-1

Der metabolische Assay basiert auf der Umsetzung des water soluble tetrazolium salt (WST-1) durch mitochondriale Dehydrogenasen. Dadurch wird das Absorptionsverhalten des Farbstoffes verändert. So wird die metabolische Aktivität der Zellen gemessen. Indirekt lässt dieser Assay Rückschlüsse über das Zellüberleben und die Proliferation zu [167]. Indirekt

lässt dieser Assay Rückschlüsse über das Zellüberleben und die Proliferation zu. Der WST-1-Assay wurde den Anweisungen des Herstellers entsprechend durchgeführt. Die Zellen wurden je nach Experimentaufbau vorbereitet, gegebenenfalls bestrahlt und unterschiedlich lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µL WST-1-Lsg. (1:3 verdünnt) pro Well direkt in das Zellkulturmedium pipettiert. Nach einer 75-minütigen Inkubation bei 37°C konnte die Reduktion von WST-1 zu Formazan abhängig von der Menge aktiver mitochondrialer Dehydrogenase in einem ELISA Reader bei 450 nm, als Kontrolle 690 nm, gemessen werden. Es ist möglich den Kristallviolett-Assay mit dem WST-1 Assay zu verbinden, indem vor dem Waschschriff und vor der Fixierung des Kristallviolett-Assays der WST-1 Farbstoff in das Zellmedium gegeben und gemessen wird.

3.3.13 Koloniebildungs-Assay

Der Koloniebildungs-Assay bildet das Überleben von Zellen und die Proliferation nach Behandlung mit Strahlung, Chemotherapie oder pharmakologischen Wirkstoffen ab und stellt somit einen klinisch relevanten Endpunkt dar [93]. Exponentiell wachsende Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Zunächst wurde in einem Test-Set die nötige Zellzahl für die Aussaat bestimmt. Optimaler Weise wurde die Aussaat so an die Zelllinie und die Behandlung angepasst, dass sich 30 bis 60 Kolonien pro Well bilden konnten. Darauf basierend variierte die Aussaat pro Well zwischen 200 und 800 Zellen ohne Bestrahlung bis hin zu 35.000 Zellen bei 10 Gy. Für einen Versuch wurden pro Zelllinie und Behandlung zwei unterschiedliche Verdünnungen ausgesucht und in jeweils drei Wells ausgesät. Diese sechs Werte wurden auf ihre jeweilige ausgesäte Zellzahl normiert und dann gemittelt. Abhängig vom Experimentablauf konnten die Zellen vor oder nach dem Plattieren behandelt werden. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bis zu elf Tage inkubiert. Zur Bestimmung der Koloniebildung wurden die Zellen in 3.7% Formaldehyd und 70% Ethanol fixiert und anschließend mit 0.05% Coomassie blue gefärbt. Ab 50 Zellen pro Kolonie wurde diese als solche gezählt.

Die Effizienz der Plattierung (plating efficiency, PE) wurde anhand der unbehandelten Kontrollen ermittelt.

$$PE = \frac{\text{Anzahl gebildeter Kolonien}}{\text{Anzahl plattierter Zellen}}$$

Die Überlebensrate bzw. der Anteil der zur Teilung fähigen Zellen (surviving fraction, SF) entsprach der Anzahl gebildeter Kolonien nach der Behandlung, normiert auf die PE der jeweiligen Zelllinie bzw. Behandlung:

$$SF = \frac{\text{Anzahl gebildeter Kolonien nach Behandlung}}{\text{Anzahl plattierter Zellen} \times \text{PE}}$$

3.3.14 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine laserbasierte Methode zur Analyse und Sortierung von Zellen anhand verschiedener chemischer und physikalischer Eigenschaften, wie Größe, Form, Zelltyp, Oberflächenrezeptoren oder Färbung [56]. Dabei wird eine Zellsuspension in eine Messkammer eingesogen, durch die die Zellen einzeln und hintereinander an einem Laserlichtstrahl oder einer elektrischen Spannung vorbeifließen. Da die Zelle selber ein optisches Signal emittiert, entsteht je nach Eigenschaft der Zelle unterschiedliches Streulicht, das von dem Gerät detektiert wird. Hierbei können in einer FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) Fluoreszenz-markierte Zellen analysiert und sortiert werden. Alle nachfolgend beschriebenen Verfahren zur durchflusszytometrisch-basierten Analyse wurden mit Hilfe eines FACSCalibur Durchflusszytometers und der Cell Quest Software durchgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit dem Programm Flowing ausgewertet.

Für die färbungsbasierten Analysen wurden die Zellen auf dieselbe Weise vorbereitet. Zuerst wurde das Medium von der Zellkultur in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen. Der Waschpuffer wurde ebenfalls in das jeweilige FACS Röhrchen überführt. So wurden auch die avitalen Zellen für die Analyse hinzugezogen. Dann wurden die Zellen mit 0,5 mL TE-Lösung in 6-Well-Platten für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Das Trypsinieren wurde darauf mit dem Inhalt des jeweiligen FACS-Röhrchens abgestoppt. Die FACS-Röhrchen wurden 6 min mit 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde abhängig vom folgenden Experiment weiterverarbeitet.

3.3.14.1 Kontrolle der eGFP-positiven Zellen

Die Stabilität und Quantität der durchgeführten Transduktion wurde nach dem Auftauen der Akt1-eGFP-exprimierenden Zellen getestet. Die Zellen wurden hierzu drei Wochen ohne Selektionsantibiotika in Kultur gehalten und mit Hilfe eines FACSCalibur Durchflusszytometers im Kanal FL-1 bei 488 nm nachgewiesen.

3.3.14.2 Zelltodanalyse (Exclusion-PI-Färbung)

Die Exclusion-PI-Färbung dient der Analyse avitaler Zellen. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) dringt bei intakter Membran der vitalen Zellen nicht ein und kann die DNA von gesunden Zellen nicht färben [155]. So können bei der Durchflusszytometrie mit dieser Zellsuspension avitale Zellen, die eine starke Floreszenz-Färbung aufweisen, von vitalen Zellen unterschieden mit werden.

Für die Zelltodanalyse wurden 200 μ L PI-Lösung zum Pellet hinzugefügt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Messung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und im FL-3 Kanal mit einem 561 nm-Laser gemessen. Mit Hilfe eines weit gesetzten Gates wurden lediglich kleine Zelltrümmer (Debris) von der Messung ausgeschlossen. In diesem Gate wurden für jede Probe 50.000 Zellen bzw. Events gemessen.

3.3.14.3 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials (TMRE-Färbung)

Eine weitere Färbung, die bei der Durchflusszytometrie zur Anwendung kommt, ist die TMRE-Färbung (Tetramethyl-Rhodaminethylester). Sie dient zur Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Bei gesunden Zellen wird ein negatives Membranpotential in den Mitochondrien aufrechterhalten [153], während es bei apoptotischen Zellen zu einem Abfall des $\Delta\Psi_m$ kommt. Auf Grund dieses Ladungsgradienten lagert sich der kationischen Farbstoff in der inneren mitochondrialen Membran ein. Depolarisierte oder inaktive Mitochondrien besitzen ein verringertes Membranpotential und nehmen daher messbar weniger TMRE auf. [190]

Die durchflusszytometrische Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurde unmittelbar nach der Färbung des Zellpellets durchgeführt. Sie erfolgte durch Zugabe von 200 μ L TMRE-Lösung und 30-minütiger Inkubation der Probe bei 37°C. Eine Behandlung der Zellen mit 1 μ M Carbonylcyanid 3-Chlorphenylhydrazon (CCCP, Sigma -Aldrich) wurde als positive Kontrolle verwendet. Der charakteristische Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ wurde im FL-2 Kanal mit 488 nm unter Verwendung eines FACSCalibur Durchflusszytometers nachgewiesen.

3.3.14.4 Apoptose- und Zellzyklusanalyse (Nicoletti-Färbung)

Mit der Nicoletti-Färbung ist es möglich die DNA-Menge der Zellen zu analysieren, was Rückschlüsse auf die Phase des Zellzyklus zulässt. Auch kann der Anteil apoptotischer Zellen in Erfahrung gebracht werden, da diese durch fragmentierte DNA gekennzeichnet sind. Die Nicoletti-Färbung beeinflusst die Integrität der Zelle, indem das enthaltene Triton X-100 und

der hypotone Puffer die Membrandurchlässigkeit für den PI-Farbstoff erhöht [155]. Gesunde Zellen befinden sich in der G₀/G₁-Phase, während Zellen, die kurz vor der Teilung (M-Phase) stehen, sich in der G₂-Phase befinden. Zwischen diesen Abschnitten des Zellzyklus findet in der S-Phase die DNA-Verdopplung im Zellkern statt. Bei apoptotischen Zellen akkumuliert fragmentierte DNA, die als ein sub-G₁-Peak im Histogramm zu erkennen ist.

Die fragmentierte DNA der putativ apoptotischen Zellen (subG_{0/1} Fraktion) wurde nach Zugabe von 200 µL Nicoletti-Lösung bestimmt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln konnten die Messung im FL-3 Kanal mit einem 561 nm-Laser durchgeführt werden.

3.3.15 Fluoreszenzmikroskopie und Immunfluoreszenz

Zur Analyse der Zellmorphologie, Lokalisation von Proteinen bis hin zu DNA-Reparatur Assays wurde ein Zeiss Axiovert 200-Fluoreszenzmikroskop und ApoTome für optische 2D-Schnitte verwendet. [191]. Die Aufnahmen der Mikroskopbilder wurden mit Hilfe einer AxioCam MRm-Kamera und der ZEN2-Software durchgeführt. Zusätzliche Auswertungs- und Bildbearbeitungssoftware wurde je nach Experiment genutzt und im jeweiligen Abschnitt aufgeführt.

Das Verfahren zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen auf sterilen Deckgläschen war bei allen Methoden gleich. Zunächst wurden runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 15 mm autoklaviert und 15 min in einem Becherglas mit UV-Licht sterilisiert. Die sterilen Deckgläschen wurden unter einer Sterilbank in 12-Well Zellkulturtestplatten gelegt. Für eine bessere Adhäsion der Zellen an der Glasoberfläche wurden diese zunächst mit 500 µL Kollagen A (20 µg/mL in DPBS) pro Well und Deckgläschen für zwei Stunden bei 37°C beschichtet. Nach dem Entfernen der Kollagen A-Lösung wurden etwa 50.000 Zellen in 1 mL Medium pro Well ausgesät und über Nacht im Zellkulturinkubator inkubiert. Die Zellen wurden darauf je nach Experiment behandelt und/oder länger inkubiert. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS für 10 bis 15 min mit 1 mL Fix/Perm-Lösung. Die Reaktion wurde durch einmaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte je nach Experiment und wird im jeweiligen Abschnitt erläutert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Zeiss Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome (Transmissionsgitter VH) bei 63-facher Vergrößerung (1.40 M27 Öl-Objektiv). Als Lichtquelle diente ein Colibri LED-Belichtungssystem (LEDs: 365 nm, 488 nm, 555 nm und 625 nm) kombiniert mit vier Nanowellen-spezifischen Filtern (49 DAPI, 38 HE, 43HE, 78 HE ms). Als Immersionsöl wurde Immersol 518F verwendet. Die Bilder wurden als 16-Bit Zeiss Vision Bilddateien ohne weitere Bearbeitung gespeichert.

3.3.15.1 Direkte Fluoreszenzfärbung mit Phalloidin-TRITC/Hoechst

Für die Analyse der Zellmorphologie und Lokalisation der eGFP-Proteine in der Zelle wurde die Phalloidin-TRITC/Hoechst-Färbung verwendet. Phalloidin bindet direkt an Aktinfilamente. Diese werden durch den kovalent-gebundenen Fluoreszenzfarbstoff TRITC bei einer Anregung mit 555 nm als dünne, rote Fäden sichtbar. Die Färbung von Aktinfilamenten ist eine klassische Färbung um den gesamten Zellkörper zu identifizieren. Der Nukleus wird hierbei auf Grund der Tatsache, dass er kein Aktin beinhaltet, ausgespart. Eine direkte Färbung der DNA und damit als Kern-Marker genutzte Farbstoff stellt Hoechst33342 dar. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert fest in die DNA und lässt sie so bei einer Anregung von 365 nm blau leuchten. [122]

Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen im gleichen Ansatz mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in PBS (500 µL pro Well) für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler gefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen aus den Zellkulturtestplatten entfernt, leicht getrocknet und mit den Zellen nach unten vorsichtig auf einen Objektträger gelegt. Auf diesen war zuvor ein Tropfen des DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium gegeben. Die Objektträger wurden 48 h im Dunkeln bei 4°C getrocknet bzw. für mehrere Wochen gelagert werden. Innerhalb dieser Zeit konnten die Zellen ohne Verblässen der Fluoreszenzfärbung mikroskopiert werden.

3.3.15.2 Immunfluoreszenzfärbung

In dieser Arbeit wurden Immunfluoreszenz-basierte Assays genutzt, um die Lokalisation von Proteinen und die DNA-Reparatur-Kinetiken in den verschiedenen Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen zu vergleichen. Die Immunfluoreszenz bietet die Möglichkeit fluoreszenzmarkierte Protein oder Phospho-Protein unter Verwendung eines Antikörpersystems und Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Ähnlich der Western Blot Methode (vgl. 3.4.5 Western Blot S.77) werden Primärantikörper zum Aufspüren der Proteine genutzt und durch einen Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Auch besteht die Möglichkeit direkt markierte Primärantikörper einzusetzen. [57, 85, 112, 134, 159, 168, 176]

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen wie zuvor beschrieben fixiert und permeabilisiert. Um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern und so Hintergrundsignale zu reduzieren, wurden die Proben über Nacht mit je 1 mL GOAT-Puffer pro Well geblockt. Je nach Primärantikörper wurden Verdünnungen in GOAT-Puffer angesetzt (vgl. 3.1.9 Antikörper S.48), hierbei war es auch möglich Antikörper aus verschiedenen Wirtsspezies zu kombinieren. Die Antikörper-Lösung wurde tropfenweise

(30 µL) auf Parafilm gegeben und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf die Tropfen gelegt. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT, wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach oben zurück in ihr jeweiliges Well gelegt und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die angesetzten Sekundärantikörper wurden anschließend die Zellen gegeben und für eine Stunde bei RT und 35 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Zellen bei Bedarf noch direkt gefärbt werden (vgl. 3.3.15.1 Direkte Fluoreszenzfärbung mit Phalloidin-TRITC/Hoechst S.71) und anschließend in DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium bei 4°C für 48 h im Dunkeln auf Objektträgern getrocknet.

3.3.15.3 DNA-Reparatur-Untersuchungen mit Hilfe des Focinators

Im Verlauf der Antwort auf DNA-Schäden und deren Reparatur kommt es zur Phosphorylierung und/oder Akkumulation verschiedenster beteiligter Proteine z.B. γ -H3.AX und RAD51. Diese können unter Verwendung spezifischer Antikörper markiert werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist es so möglich indirekt DNA-Schäden zu beobachten, da diese an der DNA-Reparatur und/oder der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligten Proteine oder ihre phosphorylierten Varianten vermehrt an den Stellen des Schadens auftreten. Das γ -H3.AX-Assay nutzt aus, dass unmittelbar nach der Entstehung von DSB ATM und DNA-PKcs aktiviert werden, diese phosphorylieren wenige Minuten nach dem Eintreten des Schadens die Histon-Variante H3.AX am Serin139 [66, 208]. Die Akkumulation der phosphorylierten H3.AX Moleküle (Focus, Foci) erreicht typischerweise 30 min nach der Entstehung von DSB ein Maximum in ihrer Anzahl [175]. Die Anzahl der DSB und somit der Foci ist abhängig von der applizierten Strahlendosis, pro Gy werden ca. 15 Foci pro Zellkern verursacht. Diese Zahl variiert je nach Stärke der Färbung, Mikroskopbeschaffenheit, Kameraauflösung und Auswerteverfahren. Die aktuelle Literatur geht von ca. 35 Strangbrüchen pro Gy aus. [8, 141, 159, 171, 179, 194, 197]

Aufgrund des proportionalen Verhältnisses zwischen der Anzahl an DNA-Brüchen und γ -H3.AX-Foci bietet sich eine indirekte Möglichkeit, die Kinetik der Reparatur von durch ionisierende Strahlen verursachten DSB zu beurteilen [159, 171, 194]. Ähnliches gilt bei der Bildung von RAD51 Foci im Laufe der homologen Rekombination. Hier Akkumulieren sich RAD51-Proteine an den Schadstellen zu Foci und können ebenfalls ausgezählt werden. Da es sich bei diesem Assay um eine reine Akkumulation handelt ohne Phosphorylierung des Proteins vor Ort, ist der Hintergrund bei einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem RAD51-Antikörper deutlich höher und daher schwieriger automatisiert ausgewertet zu werden. [4, 170]

Das γ -H3.AX-Assay wurde mit Hilfe eines Alexa Fluor 647-markierten Primärantikörpers durchgeführt. Für die Reparaturkinetik-Auswertung war es nötig die bestrahlten Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Behandlung zu fixieren. Die Zeitpunkte variierten je nach Experiment zwischen 1 min bis hin zu 24 und 48 h nach Bestrahlung. Eine Dosis von 3 Gy erwies sich für die genutzten Zellen als besonders günstig und wurde in fast allen Immunfluoreszenz-basierten Reparatur-Experimenten genutzt. Alle Experimente mit 3 Gy beinhalteten eine 0 Gy- und 24 h-Kontrolle, sowie einen 30 min Referenzwert für die gebildeten Foci-Maxima. Im Falle von Langzeit-Assays (Experiment mit 24 und 48 h) wurden auch 10 Gy genutzt. Die Verarbeitung der Proben inklusive der Färbung wurde wie im Abschnitt zuvor beschrieben durchgeführt. Für die Auswertung mit Hilfe des Focinators wurde in jedem Assay eine direkte DNA-Färbung mit Hoechst33342 durchzuführen, um die Identifizierung der Kernflächen zu ermöglichen.

3.3.15.4 Der Focinator - Programmierung und Foci-Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Evaluation von DNA-Schäden, bzw. Protein-Foci, nach Bestrahlung ein Programm entwickelt: Der Focinator basiert auf einem ImageJ Makro, das selbstständige Bilder mit bis zu vier Fluoreszenzkanälen auswerten kann. Mit Hilfe der in ImageJ beinhalteten Algorithmen markiert das Makro gefärbte Zellkerne und überträgt die so erstellten Masken in die Bilder der anderen Kanäle. In diesen Bereichen wird dann unter Berücksichtigung von Parametern wie Hintergrundintensität, Kerngröße, Kernform und Foci-Intensität für jeweils jeden Kanal eine Zählung der Intensitätsmaxima durchgeführt. Diese Werte werden unter Einberechnung der Kernfläche in eine Tabellendatei exportiert. Um eine weiterreichender Automation des Programmes zu erreichen, wurde das ImageJ-Skript mit einem auf der Programmiersprache R geschriebenen Programm erweitert. Dieses R-Skript ermöglicht die automatische Auswertung mehrerer Bilddateien in unterschiedlichen Ordnerstrukturen, ohne dass der Experimentator Bilder oder Unterordner selbst öffnen muss. Zusätzlich sammelt das Programm alle Werte, gibt ihnen Namen basierend auf der Ordnerstruktur und exportiert eine Zusammenfassung der Mittelwerte einzelner Unterordner. [157]

3.3.15.5 Comet Assay

Der Comet Assay ist eine Methode zum Nachweis von direktem Schaden an der DNA [159]. Er basiert auf dem Prinzip der DNA-Gelelektrophorese. Die in Agarose fixierten Zellkerne werden entweder zunächst mit alkalischer oder neutraler Lyse aufgeschlossen. Die DNA kann

3 Material und Methoden

nach der Lyse aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste aus den permeabilisierten Kernen zur Anode wandern. Die so entstandenen DNA-“Kometen“ werden im Anschluss gefärbt. Abhängig vom Grad der Beschädigung der DNA, z.B. durch IR, tritt mehr DNA aus den Kernen aus. Als Resultat sind die Schweife der Kometen länger, da die DNA fragmentierter vorliegt bzw. im Umkehrschluss zum Zeitpunkt der Fixierung der Zelle weniger Reparatur der Schäden stattgefunden hat. Werden die Zellen und Kerne mittels neutraler Lyse aufgeschlossen, tragen hauptsächlich Doppelstrangbrüche zur Wandergeschwindigkeit der beschädigten DNA bei.

Von der zu testenden Zelllinie wurden 200.000 Zellen pro 3 mL in DMEM10% in einer 6-Well-Platte ausgesät und bei 37°C für 24 h bei 5% CO₂ inkubiert. Pro Zelllinie und Zeitpunkt wurde ein Objektträger mit 1%iger, 70°C warmer Agarose-Lösung in destilliertem Wasser beschichtet. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet. Um ausreichend Doppelstrangbrüche für die Elektrophorese zu erzeugen wurden die Zellen mit 40 Gy bestrahlt und anschließend zum jeweiligen Zeitpunkt suspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 200.000 Zellen abzentrifugiert (5 min 1500 rpm). Die Pellets wurden in 120 µL einprozentiger 2-Hydroxyethylagarose-Lösung mit einer niedrigen Gelierungs-Temperatur in A. dest bei 37°C gegeben und auf die beschichteten 37°C vorgewärmten Objektträger pipettiert. Danach wurden die Objektträger umgehend mit 24x60 mm-Deckgläsern bedeckt und bei 4°C gelagert. Nach 10 min war die Agarose vollständig geliert und die Deckgläser wurden vorsichtig entfernt. Die Objektträger wurden für 3 Stunden bei 37°C in N1-Puffer (Neutrale Lyse) getaucht. Darauf erfolgte der Abbruch der Lyse für 15 min bei RT in N2-Puffer. Die anschließende Elektrophorese erfolgte ebenfalls in N2-Puffer bei 15 V (0.6 V/cm, 5 mA) für exakt 25 min gelegt. Im Anschluss wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer entfernt und für 10 min in 100% Ethanol getaucht. Die Proben wurden darauf eine Stunde bei RT getrocknet. Die DNA-Färbung erfolgte mit 60 µL Propidiumiodid (50 µg/mL, in A. dest). Der Farbstoff wurde direkt auf die trockene Agarose pipettiert und mit einem 24x60 mm Deckgläschen bedeckt. Pro Zeitpunkt und Zelllinie wurden Bilder von etwa 50 Zellkernen mit einem Leica-Fluoreszenzmikroskop (488 nm) aufgenommen. Die nachfolgende Evaluation der Zellkerne und ihrer Schweife auf Intensität, DNA-Gehalt, Schweiflänge und Schweifmoment wurde mit OpenComent und ImageJ durchgeführt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Lysaten ist eine essentielle Methode in der Proteinbiochemie und Zellbiologie. Das Lysieren von Zellen ist Grundlage der Proteinaufreinigung und ist Bestandteil der Probenvorbereitung für Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (vgl. 3.4.4 SDS-PAGE S.76) und Western Blot (vgl. 3.4.5 Western Blot S.77). Lysate können mit Hilfe dieser Methoden wertvolle Ergebnisse zu Proteinexpression, Proteinabbau und Phosphorylierung von Proteinen liefern. Zusätzlich können sie so genutzt werden, um eine Momentaufnahme der zellulären Proteine nach Behandlung und zu verschiedenen Zeitpunkten zu veranschaulichen.

Je nach Experimentaufbau wurden 200.000 Zellen in 2 mL DMEM10% in 6-Well-Zellkulturtestplatte oder eine Millionen Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale in 10 mL DMEM10% ausgesät. Nach Behandlung und jeweiligem Zeitpunkt wurden die Zellen suspendiert und nach einmaligem Waschen mit PBS gezählt und pelletiert. Pro 200.000 Zellen wurden 100 µL Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis lysiert. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C wurde der proteinhaltige Überstand in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Darauf konnte die Konzentration der Proteinlösung gemessen werden (vgl. 3.4.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford) und mit Lysepuffer auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. Die Probe wurde mit CST-Puffer (4-fach)/β-Mercaptoethanol (1000 µL/100 µL) bei 95°C für 10 min aufgeköcht und dann bei -20°C gelagert. Für eine längere Lagerungszeit wurden die Lysate bei -80°C eingefroren.

3.4.2 Zellyse mittels Ultraschall-Homogenisation

Die Herstellung von Zelllysaten unter alleiniger Verwendung des Lyse-Puffers zeigt je nach Zelllinie einen nicht hinreichenden Aufschluss der Zellkerne. Die finale Zentrifugation der Lyse führt daher zu einem Teilverlust der Kernproteine. Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der in den Lysaten enthaltenen DNA-Reparaturproteine wurden die Zellen im Lyse-Puffer zusätzlich mit einem Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.4.1 Herstellung von Zelllysaten (S.75) behandelt. Vor der Proteinkonzentrationsbestimmung und der Zugabe des CST-Puffers wurde die Zellsuspension in ein 2,0 mL-Reaktionsgefäß gegeben und bei 50% Leistung 6 mal 6 s mit einem Ultraschallwandler UW 2070 mit einer Mikrospritze MS 72 lysiert. Zwischen den

Zyklen erfolgten jeweils 6 s Pause auf Eis. Die Effizienz des Aufschlusses konnte unter dem Lichtmikroskop überprüft werden.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,01 bis 0,06 mM. Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) wird die Proteinlösung mit Commassie-Brilliant-Blau G-250 versetzt [29]. Dieser Farbstoff bildet in sauren Lösungen Komplexe mit den unpolaren und kationischen Seitenketten der Aminosäuren. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff deprotoniert, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm im ungebundenen Zustand hin zu 595 nm verschiebt [46]. Diese Verschiebung der Absorption kann photometrisch analysiert werden. Im Vergleich zu einer bekannten BSA Konzentrationsreihe kann die Proteinkonzentration der Probe anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet werden.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Die Konzentrationsbestimmung in dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.4 SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese) können Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die relative Beweglichkeit der Proteine innerhalb der Polyacrylamid-Gelmatrix ist hierbei umgekehrt proportional zur molekularen Masse [118]. Durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS und des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, und die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Proteine aufgehoben. Das Anlagern des SDS an die Proteine denaturiert diese und lädt ihre Oberflächen negativ. So ermöglicht das Detergenz, dass die Proteine während der Elektrophorese durch das SDS-Gel Richtung Anode wandern. Größere Proteine bewegen sich während dieses Prozesses langsamer durch das Geflecht aus Polyacryl, was zu der Auftrennung der Proteine führt. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem 6% Sammelgel und einem Trenngel, dessen Prozentgehalt von der Größe der zu trennenden Proteine abhing (10 bis 15% Polyacrylamid). Diese Zusammensetzung des Sammelgels ist Tab 3.4.4-2 zu entnehmen.

3 Material und Methoden

Zunächst wurde das Trenngel angesetzt nach Tab 3.4.4-1, in eine vorbereitete Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der durch APS und TEMED initialisierten, vollständigen Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Mit Hilfe eines Taschenkamms wurden die Probestaschen im Sammelgel ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Gellaufkammern zusammengesetzt und mit Laufpuffer (1-fach) gefüllt. Darauf konnten die Kämme entfernt und die 20 bis 30 μL pro Probe und Tasche aufgetragen werden. Als Molekulargewichtsstandard wurden 3 bis 5 μL des Page Rulers Prestained genutzt. Die Elektrophorese wurde darauf bei 35 V über Nacht durchgeführt.

Tab 3.4.4-1 Zusammensetzung SDS-Trenngel

| 2 Trenn-Gele | 12% |
|------------------|-------------------|
| Trennpuffer | 7,5 mL |
| Wasser | 10,5 mL |
| Acrylamid Gel 30 | 12 mL |
| APS | 150 μL |
| TEMED | 15 μL |
| 20% SDS | 150 μL |

Tab 3.4.4-2 Zusammensetzung SDS-Sammelgel

| Sammelgel | 6% |
|------------------|-------------------|
| Sammelpuffer | 0,875 mL |
| Wasser | 1,875 mL |
| Acrylamid Gel 30 | 0,75 mL |
| APS | 35 μL |
| TEMED | 3,5 μL |

3.4.5 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Übertragen von Proteinen aus SDS-Gelen auf eine Trägermembran aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) oder Nitrozellulose. In dieser Arbeit wurde der Transfer in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer durchgeführt (Wet Blotting). Der Transfer auf die Oberfläche einer Membran erlaubt die Detektion von Proteinen und ihren Modifikationen wie Phosphorylierung mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Hierzu wird nach dem Transfer die Membran zunächst mit 5% Milchpulver in TBS-T geblockt. Dies verhindert eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membranoberfläche und senkt so die Intensität des Hintergrundsignals. Um Proteine detektieren zu können, werden sie zunächst mit einem passenden Primärantikörper beladen. Dieser in einem bekannten Wirt erzeugte (z.B. Maus oder Kaninchen) Antikörper kann mit Hilfe eines Sekundärantikörpers gegen die Immunglobuline der Erzeugerspezies markiert werden. Die Detektion der Proteine erfolgte daraufhin über eine an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase. Dieses Enzym erzeugt durch Umsetzung eines Substrates (Enhanced Chemiluminescence, ECL) Chemolumineszenz, welche mit Hilfe einer empfindlichen Kamera oder eines Röntgenfilms detektiert werden kann. [23, 217]

Die Proteinproben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde aus den Glasplatten entfernt und luftblasenfrei auf eine PVDF-Membran gelegt. Ober- und unterhalb

wurde der Aufbau um jeweils drei Lagen mit Transferpuffer (1-fach) getränktem Whatman-Papier ergänzt und zwischen zwei Schwämmen und Haltegittern in eine Laufkammer gestellt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer (1-fach) gefüllt und der Transfer bei 1 A für 1,5 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran 60 min bei RT in Blockierpuffer geschwenkt. Nach einmaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper in Antikörperpuffer (vgl. 3.1.9 Antikörper S.48) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T (1-fach) gewaschen und darauf für 1 h bei RT mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T (1-fach) konnte die Chemilumineszenz mit Hilfe eines FUSION Solo in einem 16-bit Graustufenbild aufgenommen werden. Als Substrat für die Peroxidasereaktion wurde das ECL Reagenz PRIME benutzt. Im Falle von sehr schwachen Signalen wurde das ECL Reagenz SELECT benutzt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Fusion Software und ImageJ exportiert und densitometrisch ausgewertet.

3.4.6 DNA-PKcs und Akt1 Kinase-Assay

Um eindeutige Ergebnisse bezüglich der Interaktion der Kinasen Akt1 und DNA-PKcs zu erlangen, wurde ein *in vitro* Kinase-Assay etabliert. Insbesondere die Hierarchie der Phosphorylierung der beiden Proteine stand hierbei im Fokus.

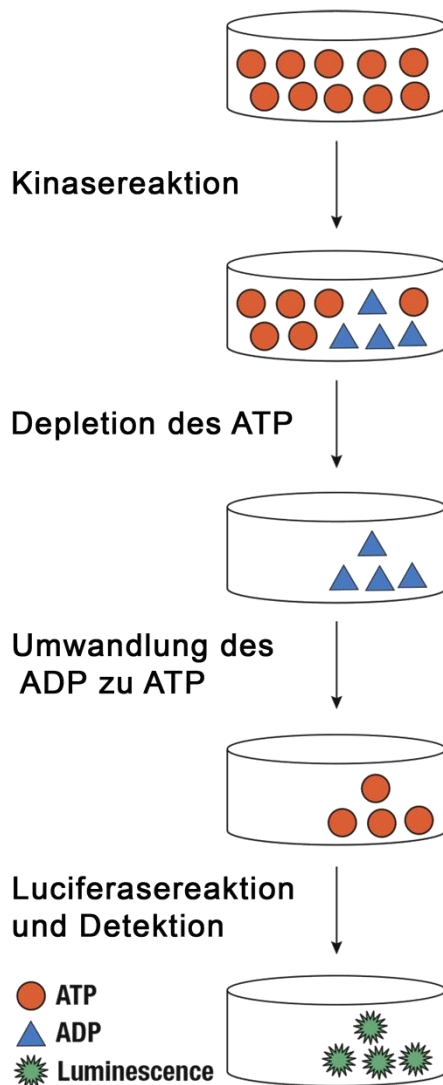


Abb. 3.4.6-1 Schematischer Ablauf des Kinase Assays für DNA-PKcs und Akt1
Der schematische Ablauf des Kinase-Assays für DNA-PKcs und Akt1. Nach der Kinasereaktion wurde das verbliebene ATP entfernt und das entstandene ADP zu ATP umgewandelt. Dieses ATP liefert die Energie für die detektierbare Luciferasereaktion. (Promega)

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll kombiniert den ADP-Glo™ Kinase-Assay und das DNA-PK Kinase Enzyme System Kit der Firma Promega, in Abb. 3.4.6-1 dargestellt. Die ADP-Glo™ Kit ermöglicht die Messung von Kinaseaktivität durch Quantifizierung der verbrauchten Menge des für die Kinasereaktion benötigten ATPs. Im Laufe der Phosphorylierung eines Substrates wird ein Phosphatrest auf ein spezifisches Zielsubstrat (z.B. ein Peptid oder Protein) übertragen. Hierbei entstehen das phosphorylierte Substrat und ein ADP. Das ADP-Glo™ Kinase-Assay detektiert dieses umgesetzte ATP, indem zunächst verbleibendes ATP mittels des ADP-Glo-Reagenz (Depletionsschritt) entfernt wird. Im nächsten Schritt erfolgte die Umwandlung des erzeugten ADP zu ATP. Das erzeugte ATP treibt im folgenden Schritt eine Luciferasereaktion an. Die so erzeugte Lumineszenz kann in einem ELISA detektiert werden. Die in relative light units (RLU) gemessene Lichtmenge korreliert hierbei mit der Menge des umgesetzten ATPs und daher mit der Fähigkeit einer Kinase ein Substrat zu phosphorylieren.

Der Kinase-Assay wurde nach Herstellerangaben in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Während des Versuchs wurden alle Reagenzien und Geräten vorgekühlt und stets kühl gehalten. Die Ansätze setzten sich aus 25 µL Proteinlösung, 25 µL ADP-Glo™-Reagenz und 50 µL Kinase-Detektions-Reagenz zusammen. Die verwendete humane DNA-PK und das als Positivkontrolle verwendete DNA-PKcs-Substrat waren im DNA-PK Kinase Enzyme System Kit enthalten. Das GSK-3β Peptidstück, das als Positivkontrolle für die Akt1-

3.5 Tierexperimentelle Verfahren

3.5.1 Tierhaltung

Alle Tierexperimentellen Arbeiten wurden von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Az. 84-02.04.2014.A244, TSG G1424/14) genehmigt. Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Essen (ZTL) gezüchtet. Es wurden männliche immundefiziente Nachtmäuse (NMRI-nu/nu) verwendet. Die Tiere wurden in separat belüfteten Käfigen (IVC) bei einer Raumtemperatur von 20-22°C mit einem 12 h Licht/Dunkel-Zyklus gehalten. Nahrung und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Haltung und Tötung der Mäuse erfolgte nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for Laboratory Animal Science).

3.5.2 Transplantation von Akt1-Mutanten exprimierenden Zellen

Das Transplantieren von Zellen und die Initiierung von Tumorwachstum stellt eine weitverbreitete Methode dar. Im Gegensatz zu der Zellkultur bietet diese Methode ein „natürliches“ Tumormilieu und verschiedene Einflüsse wie dreidimensionale Organisation der Zellen, immunsystemische Interaktionen, Angiogenese und damit verbundene Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie Veränderungen in der Antwort auf Behandlung. Die im Tiermodell durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse sind deutlich näher an den Bedingungen, wie sie bei Patienten zu finden sind.

Um Mäusen subkutan Zellen im Bereich des Hinterbeins oder Flanke zu transplantieren, mussten die Zellen zunächst suspendiert und gezählt werden. Die zu injizierende Suspension wurde auf 10 Millionen Zellen pro Milliliter DPBS eingestellt. Zur Erleichterung der Injektion und der Messung am Hinterbein wurde ein kleiner Bereich des Beins zunächst rasiert. Jeder Maus wurden subkutan 50 µL in das Hinterbein oder 100 µL in die Flanke injiziert. Pro Zelllinie wurden 5 bis 10 Tiere verwendet, wobei die C57BL/6 Mäuse für die Injektion im Hinterbein und die NMRI-NU Mäuse für die Flankeninjektion genutzt wurden.

3.5.3 Messungen des Tumorwachstums

Die Messung der Tumore erfolgte alle zwei bis drei Tage und am Tag der Entnahme. Es wurden die Breiten und Längen der Tumore mit Hilfe einer digitalen Schieblehre bestimmt. Dies geschah nach manueller Fixierung der Maus und leichtem Strecken des Hinterbeins. Bei

der Injektion von Zellen in die Flanke der NMRI-NU Mäuse reichte eine leichte Fixierung auf dem Gitter des Käfigs.

3.5.4 Vorbereitung von Tumoren für histologische Färbungen

Die Entnahme gewachsener Tumore stellt den finalen Schritt des Tumorwachstumsexperiments dar. Dies ermöglicht weitere Untersuchungen des neoplastischen Gewebes. So können Gewebeschnitte angefertigt und gefärbt werden, um z.B. Veränderungen der Struktur zu erforschen. Auch kann aus entnommenen Tumoren Protein für Western Blots gewonnen werden.

Die Mäuse wurden unter einem Abzug in einer mit Isoflurandampf gefüllten Glocke betäubt, getötet und direkt präpariert. Der freipräparierte Tumor wurde entnommen und von Binde- und Fettgewebe gereinigt. Nach dem Wiegen und Vermessen des Tumors wurde ein Teil über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert, der Zweite in flüssigem Stickstoff eingefroren und für weitere Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Einbettung der in 4% Paraformaldehyd fixierten Tumore erfolgte mit einem Shandon Excelsior ES Paraffineinbettautomat und das Ausbetten mit Hilfe eines Shandon HistoCentre 2 im Institut für Anatomie (Prof. Dr. Wennemuth, Universitätsklinikum Essen). Von den eingebetteten Tumoren wurden mit Hilfe eines Leica RM2235 Rotationsmikrotoms 6 µm dünne Schnitte erstellt und diese auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen.

3.5.5 Hämatoxylin/Eosin-Färbung histologischer Schnitte

Die Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung dient der Färbung von feingeweblichen Schnitten. Diese Färbung ermöglicht es Gewebestrukturen zu verdeutlichen und mit Hilfe eines Lichtmikroskops zu untersuchen. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff. In seiner oxidierten Form färbt dieser alle sauren Strukturen in Geweben durch anheben des pH-Wertes blau. Hierzu zählen DNA, und Ribosomen bzw. das raue endoplasmatische Retikulum. Zusätzlich färbt Eosin, ein saurer synthetischer Farbstoff, basische Teile des Gewebes, wie Kollagen, Mitochondrien, Zellplasmaproteine und das glatte endoplasmatische Retikulum, rot. In dieser Arbeit wurde die HE-Färbung für die Färbung von Tumorschnitten genutzt, um die strukturelle Veränderung des Gewebes auf Grund der Expression verschiedener Akt1-Mutant zu identifizieren. [78]

Für die Färbung der Schnitte mussten diese zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Dies erfolgte durch zweimaliges Tauchen der Schnitte in Xylol für 5 min. Nach der Entfernung des Xylols wurden die Schnitte mit Hilfe einer Alkoholreihe (100% Ethanol und

96% Ethanol, bis hin zu 70% Ethanol für jeweils 5 min) rehydriert. Es folgte eine Wässerung für 5 min in A. dest. Die so vorbereiteten Gewebeschnitte konnten darauf mit der Hämalaun-Lösung für 5 min gefärbt werden. Das Bläuen der Probe erfolgte unter fließendem Leitungswasser für 5-10 min. Es folgte die Färbung mit Eosin G-Lösung für 3 bis 6 min und das Auswaschen des überflüssigen Farbstoffes mit A. dest. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit 96% Ethanol, 100% Ethanol und zweimal mit Xylol für je 5 min entwässert. Die Proben konnten darauf mit Roti®-Histokitt II eingedeckt werden. Bilder der Schnitte wurden mit einem DM IRB Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica und einer AxioCam MRc Mikroskop Kamera in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.6 Statistische Auswertung

Abgesehen von den Maßnahmen zur Etablierung der Zelllinien und den Mausexperimenten wurden alle Versuche in drei unabhängigen Ansätzen an verschiedenen Tagen durchgeführt. Diese Vorgehensweise sollte mögliche Fehlerquellen ausschließen und sicherstellen, dass alle Ergebnisse verlässlich und reproduzierbar waren. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit GraphPad Prism 5.01 durchgeführt, einer Software zur statistischen Analyse und graphischen Auswertung von Daten. Die Werte stellen Mittelwerte mit dem Standardfehler (standard error of the mean, SEM standard deviation (SD)) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Die Signifikanz metrischer Variablen wurden anhand des ungepaarten Students t-test oder einer Two-Way ANOVA (analysis of variance) berechnet. Ergebnisse im Zeitverlauf wurden mit einer repeated measures ANOVA analysiert. Als posthoc- Korrektur wurde die Bonferroni- Methode verwendet. Es wurden eine Konfidenzintervall von 95% festgelegt und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, somit wurden P- Werte $\leq 0,05$ als signifikant, $<0,01$ als hoch signifikant und $<0,001$ stark signifikant angesehen. Der Grad der Signifikanz wurde in den Abbildungen mit Sternen (*) gekennzeichnet: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ und *** $p<0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Mutationen des PI3K/Akt-Signalwegs in aktuellen Studien

Der PI3K/Akt-Signalweg ist einer der am häufigsten deregulierten Signalwege in malignen Neoplasien. Überwiegend handelt es sich bei den Veränderungen um Mutationen von *PI3KCA* und *PTEN*. Um einen Einblick in die relative Bedeutung einer Deregulation oder einer Mutation von Akt1 zu erhalten, wurde mit Hilfe von Datenbankanalysen die Häufigkeit des Auftretens, die Art und die Gewebespezifität von Mutationen im PI3K-Signalweg durchgeführt. Den Analysen liegen die Informationen der COSMIC-Datenbank (Catalogue of somatic mutations in cancer) zu Grunde. Die aus dieser Datenbank gewonnenen Sequenzen verschiedener Tumorproben wurden hinsichtlich potentieller Veränderungen der Gene *PI3KCA*, *PTEN* und *AKT1* evaluiert. Die Daten basieren auf den hinterlegten Tumorproben zum Zeitpunkt des Zugriffs auf die jeweiligen Daten am 14. November 2015. Da täglich neue Daten hinzugefügt werden kann die Gesamtzahl der Proben im Verlauf der Zeit variieren. Ohne putative Generationseffekte des Patientenkollektivs bleiben die prozentualen Werte von dieser Tatsache weitestgehend unberührt.

In der Analyse der COSMIC Datenbank wurden 687 verschiedene Mutationen des *PI3KCA* gefunden. Dabei trugen 8802 der 79.217 getesteten Gewebeproben eine Mutation im *PI3KCA*. Das entspricht einer Gesamtmutationsfrequenz von 11,1%. Hierbei wurden alle Gewebeproben mit nicht näher definierten Mutationen entfernt. Dies beinhaltete auch „stille“ Mutationen, die keine Alteration der Peptid-Sequenz herbeiführen. Die Filterung der Gewebeproben führte zu 93% somatischen Veränderungen (8214) und 588 unbekanntem Mutationen, die teilweise einmalig auftraten. Die weitaus am häufigsten auftretenden Mutationen betrafen die Aminosäuren E542, E545 sowie H1047.

In der folgenden Abbildung (A, Abb. 4.1-1) ist die Häufigkeit von somatischen *PI3KCA*-Mutationen in dem jeweiligen Tumorgewebe abgebildet. Die *PI3KCA*-Mutation ist in verschiedensten Tumoren zu finden. Gezeigt ist das Verhältnis somatischer *PI3KCA*-Mutationen zu der in der Datenbank hinterlegten Gesamtanzahl an Proben des jeweiligen Gewebetyps.

4 Ergebnisse

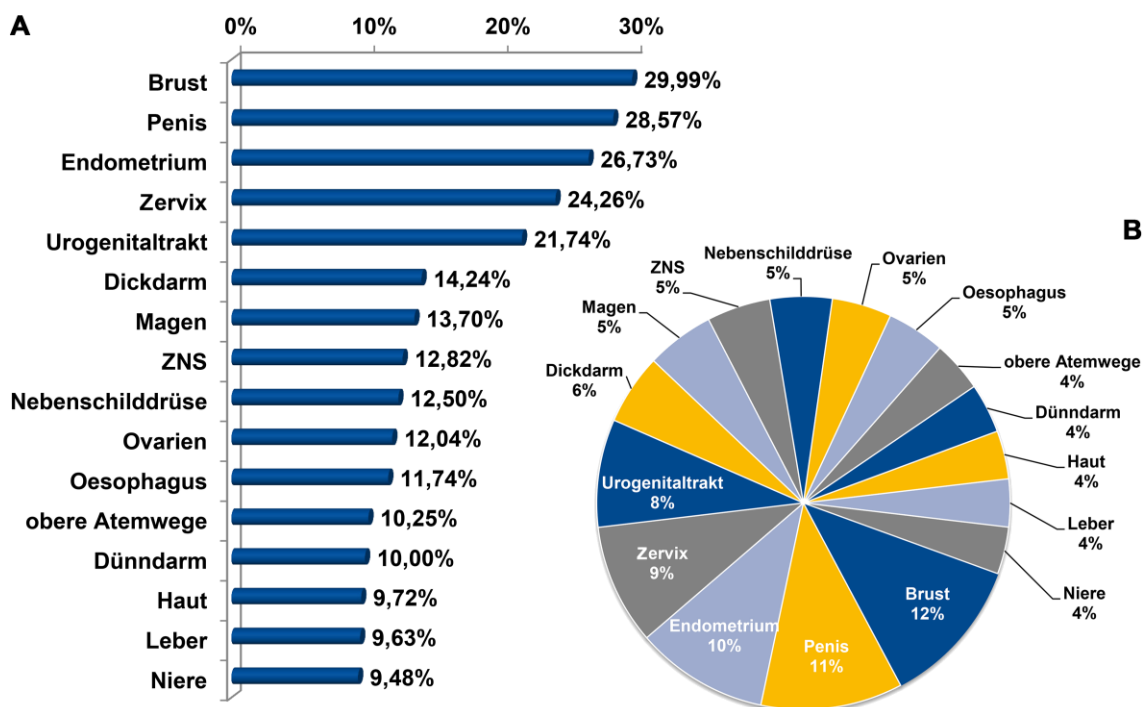


Abb. 4.1-1 Analyse der somatischen *PI3KCA*-Mutationen mittels COSMIC-Datenbank

In die Datenbankanalyse wurden 79.217 Tumorgewebeproben eingeschlossen. Die Gewebeproben wurden hinsichtlich Mutationshäufigkeit, Mutationsart, dem somatisch aktiven Effekt, Lokalisation und Gewebeart sortiert.

(A) Die Abbildung zeigt die Häufigkeit somatischer *PI3KCA*-Mutationen im jeweiligen Tumorgewebe. Es handelt sich um das Verhältnis somatischer *PI3KCA*-Mutationen zu der in der Datenbank hinterlegten Anzahl an Tumortypen des jeweiligen Gewebetyps. Eingeschlossen in die Analyse sind die 16 häufigsten Lokalisationen der *PI3KCA*-Mutationen.

(B) Die Abbildung zeigt die Verteilung somatischer *PI3KCA*-Mutationen aufgeschlüsselt nach Auftreten im analysierten Gewebe. Diese ist normiert auf die in der Datenbank hinterlegten Tumortypen der zugehörigen Gewebeart.

Demnach tritt eine *PI3KCA*-Mutation in den in der Datenbank hinterlegten Proben mit 29,9% am häufigsten in der Brust auf. Hier waren 3241 somatische Mutationen in 10.807 Brusttumorgewebeproben zu finden. Folgend mit geringerer Häufigkeit sind die Tumore am Penis mit 28,6%, Endometrium mit 26,7%, Zervix mit 24,3% und Urogenitaltrakt mit 21,5%. Abbildung B zeigt die Häufigkeit des Auftretens der Mutation im jeweiligen Gewebe unter allen *PI3KCA*-Veränderungen. Abbildung B (Abb. 4.1-1) zeigt die Häufigkeit des Auftretens der Mutation in dem jeweiligen Gewebe unter allen *PI3KCA*-Mutationen. Es ist zu erkennen, dass Brust, Penis und Endometrium mit mindestens 10% die häufigsten Lokalisationen dieser Mutationen sind. Die Wahrscheinlichkeit, eine somatische Mutation des *PI3KCA* zu finden, ist also in diesen Tumoren besonders hoch und kann als prädiktiver Faktor erachtet werden. Abgesehen hiervon zeigte sich eine relativ konstante Verteilung in anderen Geweben mit 4 bis 5% Häufigkeit des Auftretens im Dickdarm, Magen, ZNS, Nebenschilddrüsen, Ovarien,

4 Ergebnisse

Oesophagus, oberen Atemwegen, Dünndarm, Haut, Leber sowie Nieren. Ebenso traten die Tumoren in absteigender Häufigkeit in den Weichteilen, Speicheldrüsen, der Vulva, Prostata, Gallenblase, dem Peritoneum, Pankreas und der Lunge auf.

In der Analyse von 51.075 Tumoren bezüglich Veränderungen an *PTEN* fielen 1368 verschiedene Mutationstypen bei 3551 *PTEN*-Mutationen auf. Das entspricht einer Genmutationsfrequenz von 7%. Hiervon waren 2960 Mutationen somatisch relevant.

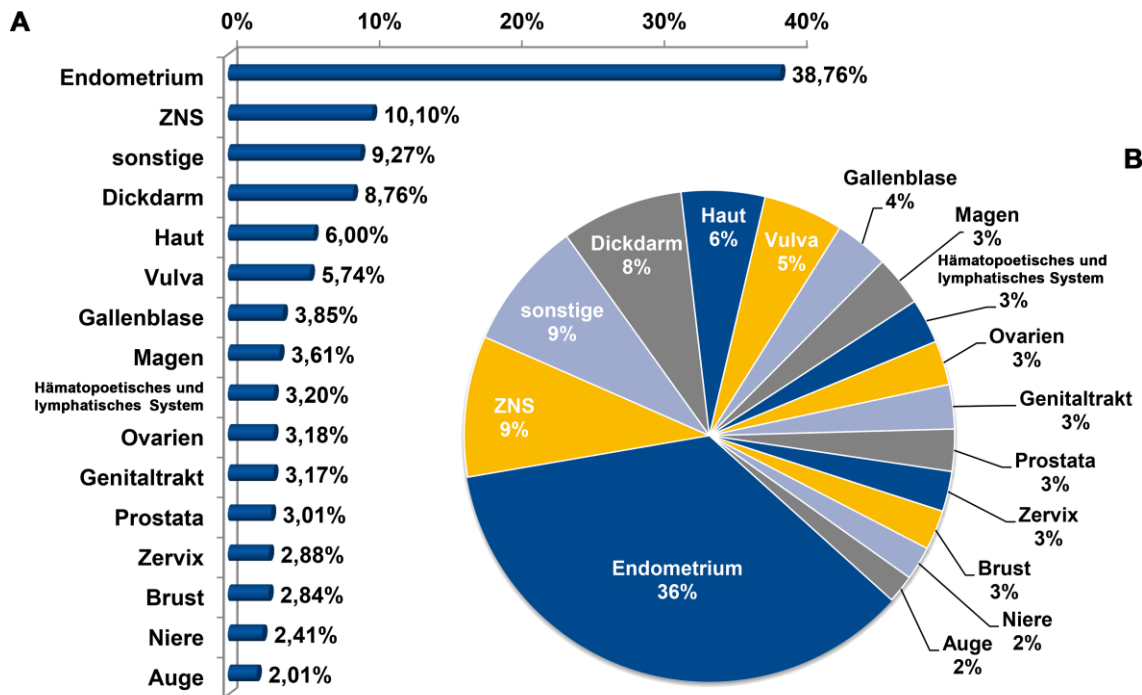


Abb. 4.1-2 Analyse der somatischen *PTEN*-Mutationen mittels COSMIC-Datenbank

In die Datenbankanalyse wurden 51.075 Tumorgewebeprouben eingeschlossen. Die Gewebeprouben wurden anhand Mutationshäufigkeit, Mutationsart, somatisch aktivem Effekt, Lokalisation und Gewebeart sortiert.

(A) Die Abbildung zeigt die Häufigkeit somatischer *PTEN*-Mutationen im jeweiligen Tumorgewebe. Es handelt sich um das Verhältnis somatischer *PTEN*-Mutationen zu der in der Datenbank hinterlegten Anzahl an Tumorprouben der zugehörigen Gewebeart. Eingeschlossen in die Analyse sind die 16 häufigsten Lokalisationen.

(B) Die Abbildung zeigt die Verteilung somatischer *PTEN*-Mutationen aufgeschlüsselt nach Auftreten im analysierten Gewebe. Diese ist normiert auf die in der Datenbank hinterlegten Tumorprouben der zugehörigen Gewebeart.

Bei der Analyse fiel im Gegensatz zur Auswertung von *PI3KCA* und *AKT1* auf, dass vergleichsweise viele Mutationen zu einer Leserahmenverschiebung führen. *PTEN* wies 1035 dieser Mutationen auf. Im Gegensatz hierzu wurden nur 39 bei *PI3KCA* und keine Mutation dieser Art bei *AKT1* gefunden. Dies rührt von der Tatsache her, dass die einfachste und potentiell gefährlichste Variante des *PTEN* ein nicht funktionsfähiges Protein darstellt.

4 Ergebnisse

Ebenso wie die Mutation von *PI3KCA* treten Mutationen von *PTEN* in verschiedensten Gewebearten auf.

Betrachtet man die Häufigkeit von somatischen *PTEN*-Mutationen im jeweiligen Tumorgewebe in der Abbildung (A, Abb. 4.1 2), fällt auf, dass *PTEN* mit 38,8% den größten Anteil an Mutationen in Endometrium-Karzinomen hatte. Das bedeutet, dass von 2975 getesteten Gewebeproben 1153 Proben eine Mutation des *PTEN* aufwiesen. Im Gegensatz zu dem Gewebe, das am zweithäufigsten die Mutation trug, dem zentralen Nervensystem, mit nur 571 *PTEN*-Mutationen bei 5652 hinterlegten ZNS-Proben (10,1%).

Nicht näher bezeichnete sonstige Gewebe hatten ebenso einen hohen Anteil der gesuchten Mutation mit 9,3%, der Dickdarm mit 8,8% und die Haut mit 6,0%. Die restlichen Gewebe hatten eine Häufigkeit von unter 6% somatischer *PTEN*-Mutationen in dem jeweiligen Tumorgewebe. Keine somatische Mutation des *PTEN* war in Nebenschilddrüse, Penis, Peritoneum, Hirnanhangsdrüse, Plazenta, Pleura, Dünndarm, Testes, Thymus und Vagina gefunden worden. Die Abbildung 4.1-2, B spiegelt die Werte der Häufigkeit von somatischen *PI3KCA*-Mutationen in der anteiligen Häufigkeit des Auftretens der Mutation in dem jeweiligen Gewebe unter allen *PI3KCA*-Mutationen wider. Hier sind vergleichbare Tendenzen zu erkennen.

Zur Untersuchung der *AKT1*-Mutationen wurden zuerst unter 46.185 eingetragenen Gewebeproben die verschiedenen Mutationen analysiert. Dabei fiel auf, dass die meisten Mutationen auf die *AKT1*-G49A-Mutation zurückgingen. Diese Mutation führt zu einer Substitution der Glutaminsäure17 zu einem Lysin (E17K, im weiteren Verlauf wird der Peptidaustausch des Akt1-Proteins genannt: Akt1-E17K). Andere bekannte oder in dieser Arbeit untersuchte Mutationen waren in der Auflistung nicht enthalten, weswegen nur die somatisch relevante Akt1-E17K-Mutation weitergehend analysiert wurde. In der COSMIC-Datenbankanalyse wurden unter 46.185 Gewebeproben 553 mit einer *AKT1*-Mutation gefunden. Es wurden 88 unterschiedliche Mutationen gefunden. Von 553 Akt1-Mutationen hatten 450 Proben eine Akt1-E17K-Mutation, dies entspricht 81,3%. Die zweithäufigste hinterlegte Mutation und alle darauffolgenden wiesen unter 1% Anteil der somatischen Akt1-Mutationen auf. Insgesamt hatte Akt1-E17K daher einen Anteil von 1% unter allen Tumorgewebeproben der COSMIC-Datenbank.

4 Ergebnisse

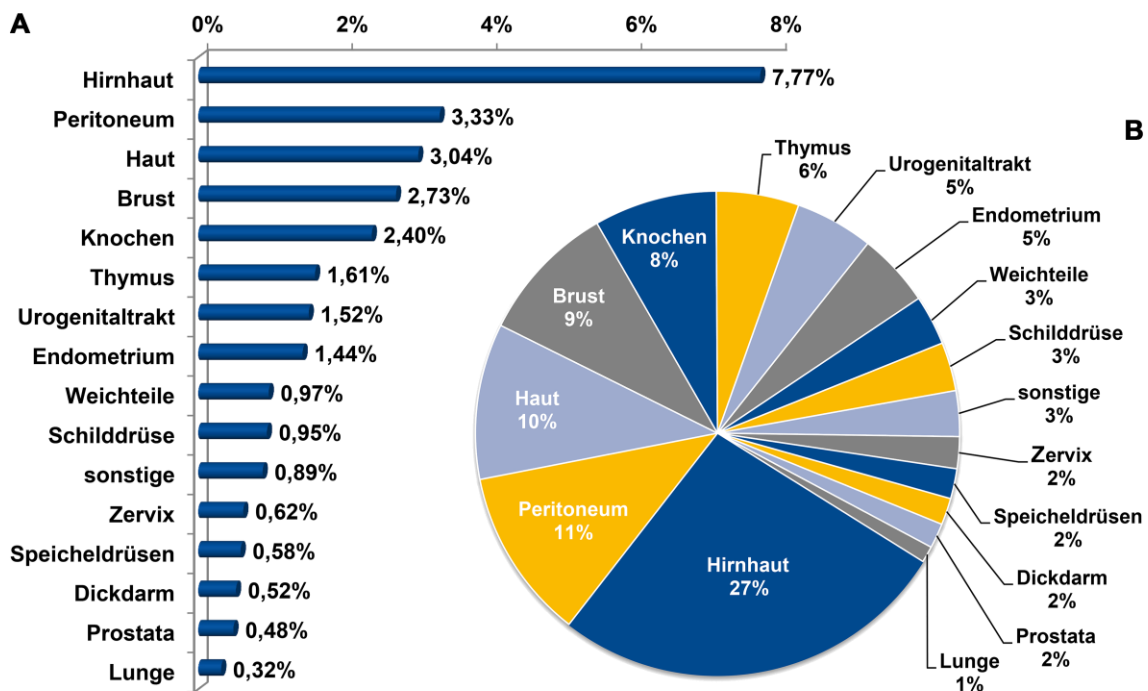


Abb. 4.1-3 Analyse der somatischen Akt1-E17K-Mutationen mittels COSMIC-Datenbank

Für die Datenbankanalyse wurden 46.185 Tumorgewebeproben eingeschlossen. Die Gewebeproben wurden anhand Mutationshäufigkeit, Mutationsart, somatisch aktivem Effekt, Lokalisation und Gewebeart sortiert.

(A) Die Abbildung zeigt die Häufigkeit somatischer Akt1-E17K-Mutationen in dem jeweiligen Tumorgewebe. Es handelt sich um das Verhältnis somatischer Akt1-E17K-Mutationen zu der in der Datenbank hinterlegten Anzahl an Tumorproben der zugehörigen Gewebeart. Eingeschlossen in die Analyse sind die 16 häufigsten Lokalisationen.

(B) Die Abbildung zeigt die Verteilung somatischer Akt1-E17K-Mutationen aufgeschlüsselt nach Auftreten im analysierten Gewebe. Diese ist normiert auf die in der Datenbank hinterlegten Tumorproben der zugehörigen Gewebeart.

Hierbei fanden sich, wie in Abb. 4.1-3, A dargestellt, besonders viele Akt1-E17K-Mutationen bei Tumoren der Hirnhäute mit 7,7% aller sequenzierten Hirnhautproben. Ebenso zu einem relevanten Anteil vorkommende Tumorlokalisationen waren Peritoneum, Haut, Brust, Knochen, Thymus, Urogenitaltrakt und Endometrium. Die restlichen Tumorgewebe erreichten lediglich eine Mutationshäufigkeit unter 1%. Bei der Analyse aller Akt1-E17K-Mutationen in Abb. 4.1-3 B fällt auf, dass die Gewebeproben aus Hirnhaut, Peritoneum, Haut, Brust, Knochen und Thymus den größten Anteil mit über 70% aller Akt1-E17K-Mutationen ausmachen.

Insgesamt bestätigten die Datenbankanalysen die Häufigkeit von Veränderungen im PI3K/Akt-Signalweg in Patienten mit malignen Tumoren und die Bedeutung einer deregulierten Aktivität von Akt.

Das Ergebnis der *PI3KCA*-Mutationanalyse zeigte, dass *PI3KCA*-Tumoren mit einer hohen Genmutationsfrequenz auftraten und in vielen verschiedenen Gewebearten auftreten können.

Insbesondere machte diese Mutation einen großen Anteil an Mutationen in Brusttumoren aus. Insgesamt war diese Gruppe der Mutationen mit höchsten Anteilen in Tumoren sekundärer und primärer Geschlechtsorgane zu finden sowie im Urogenital- und Gastrointestinaltrakt.

Im Gegensatz zu der *PI3KCA*-Mutation trat die *PTEN*-Mutation seltener auf und war wesentlich häufiger durch eine Leserahmenverschiebung verursacht. Des Weiteren war die Lokalisation breiter gestreut, bezog sich jedoch auf weniger unterschiedliche Gewebearten. Besonders auffällig ist das mit Abstand häufigste Auftreten im Endometrium und darauffolgend im ZNS.

AKT1 hatte mit einer Gesamtmutationsfrequenz von 1,1% ein weitaus niedrigeres Auftreten bei Tumoren als *PI3K* und *PTEN*. Jedoch entfiel hierbei ein Großteil (81,3%) aller *AKT1*-Mutationen auf die Akt1-E17K-Mutation.

Hierbei fanden sich besonders viele Akt1-E17K-Mutationen bei Tumoren von Hirnhaut, Peritoneum, Haut, Brust, Knochen, Thymus, Urogenitaltrakt und Endometrium. Diese Mutation tritt somit lokalisierter auf als *PTEN*-und *PI3KCA*-Mutationen.

4.2 Generierung von Akt1-Mutanten exprimierenden Zellen

4.2.1 Mutagenese der Akt1-Mutanten und Klonierung in retrovirale Verpackungsplasmide (pBEC)

Zu Beginn dieses Promotionsprojektes wurden basierend auf bereits vorhandenen humanen *AKT1*-Konstrukten verschiedene Mutanten des Akt1-Proteins erzeugt. Hierzu wurden mehrere PCR-basierte Mutagenesen des Ausgangsplasmids pBABE-Akt1-WT-eGFP mit unterschiedlichen Mutagenese-Primern durchgeführt. Die so mutierten Plasmide wurden in *E. coli* NovaBlue-Bakterienzellen Hitzeschock-transformiert und positive Klone mit Hilfe von Agar-Ampicillin-Selektionsplatten selektiert. Von jedem Konstrukt wurde mittels Minipräparation die Plasmid-DNA gewonnen. Mit diesen Plasmiden wurde jeweils eine Kontrollrestriktion, Abb. 4.2.1-1, A als Nachweis der gewünschten Genfragmente durchgeführt. Für diese Restriktion wurden die ursprünglichen Restriktionsendonukleasen genutzt, die für das Erstellen des pBABE-AKT1-WT-eGFP Plasmids verwendet wurden (*EcoRI*, *BamHI* und *SallI*). Anschließend wurde eine Sequenzierung der putativ positiven Klone durchgeführt, um die *AKT1*-Varianten auf ihre jeweilige gewünschte Mutation zu untersuchen. Wie in Abb. 4.2.1-1, B gezeigt, konnten erfolgreich alle gewünschten Mutanten erstellt werden.

4 Ergebnisse

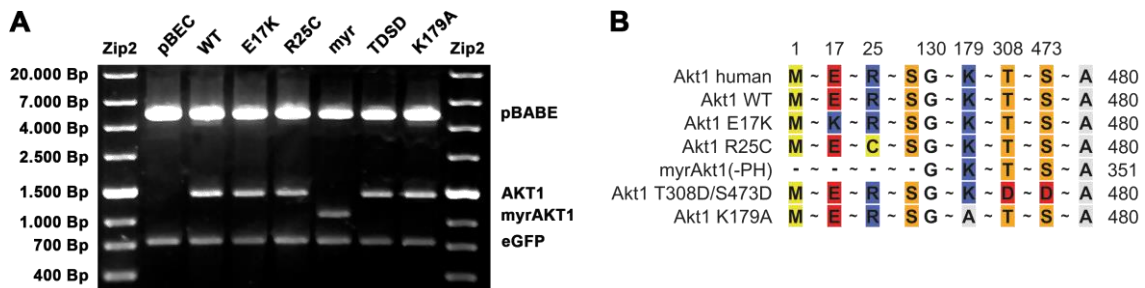


Abb. 4.2.1-1 Mutagenese und Sequenzierung der pBABE-AKT1-XX-eGFP Plasmide

Die Abbildung A zeigt die Kontrollrestriktion der ausgewählten Klone. Für die Restriktion wurden die für die Klonierung genutzten Nukleasen *Bam*HI, *Eco*RI und *Sal*I benutzt, um 1 µg der Plasmid-DNA zu schneiden. Das Agarosegel dieser Ansätze zeigt Banden in den Größen der Genabschnitte *EGFP* (ca. 720 Bp), *myrAKT1* (ca. 1000 Bp), *AKT1* (ca. 1400 Bp) und des Transferplasmids pBABE (ca. 5000 Bp). Die mit Hilfe der Kontrollrestriktion gefundenen putativ positiven Klone wurden sequenziert und die DNA-Sequenzen in Aminosäuren übersetzt. Abbildung B zeigt diese Sequenzen im Vergleich zur Peptidsequenz des humanen Akt1, wobei die Positionen der Aminosäuren in der jeweiligen Akt1-Variante nummeriert sind. Die ausgeblendeten Teile des Vergleichs (~) waren identisch. Mit einem Spiegelstrich markierte Position stellen Deletionen dar. Diese traten nur bei dem *myr(-PH)AKT1*-Konstrukt auf, da in diesem Fall die Deletion der N-terminalen PH-Domäne mittels PCR stattfand.

Bei den verwendeten Akt1-Varianten handelte es sich um die Wildtypform des Akt1, konstitutiv aktive Akt1-Varianten und dominant negative Akt1-Formen. Folgende Tabelle listet diese mit ihren postulierten Effekten auf die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften des veränderten Proteins auf (vgl. Tab 4.2.1-1).

Tab 4.2.1-1 Erzeugte Akt1-Mutanten

| Kurzname | Postulierter Effekt und Verwendung |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| pBEC | Expression von eGFP, Leervektor-Kontrolle |
| WT | Wildtyp- Überexpressionskontrolle |
| E17K | Erhöhte PIP ₃ Koordination, erhöhte Phosphorylierung, dominant aktiv |
| R25C | Gehinderte PIP ₃ Koordination, verringerte Phosphorylierung, dominant negativ |
| K179A | Gehinderte ATP-Bindung, konstitutiv inaktiv |
| myr(-PH)Akt1 | Myristoyliert Form ohne PH-Domäne (direkter Membrananker), dominant aktiv |
| T308D/S473D | Nachahmung der Phosphorylierung, konstitutiv aktiv |

Die so erstellten Mutationen-tragenden Konstrukte wurden durch retrovirale Transduktion in der murinen Prostatakrebs-Zelllinie TRAMP-C1 (TrC1) und in murinen embryonalen Fibroblasten mit einem vollen Akt1 Knock-out (MEF ^{-/-}) etabliert.

Die retrovirale Transduktion ermöglicht die Integration von Gen-Konstrukten in das Genom der Zielzelllinien. Zusätzlich zu der Akt1-eGFP-Variante wurde eine Puromycin-Resistenzkassette eingefügt. Diese ermöglichte die Selektion der erfolgreich transduzierten

4 Ergebnisse

Zellen. Die Selektion gewährleistete eine Zellpopulation in der nahezu alle Zellen das gewünschte Protein exprimierten. Unter Selektionsdruck wurden diese Zellen expandiert und darauf mittels FACS anhand ihrer eGFP Fluoreszenz sortiert.

4.2.2 Fluoreszenz-basiertes Sortieren der TrC1

Zellen mit deutlich erhöhter grüner Fluoreszenz wurden mit Hilfe eines strikten Sortierungs-Gate selektiert und unter sterilen Bedingungen in einem sterilen FACS-Röhrchen aufgefangen. Das Gate im Kanal der grünen Fluoreszenz wurde so eingestellt, dass nur Zellen in einem strikten Intensitätsbereich (100- bis 150-fache grüne Fluoreszenz-Intensität der nicht transduzierten Kontrollpopulation) wieder in Kultur genommen wurden. Dies gewährleistete neben dem Ausschluss von negativen und schwach positiven Zellen auch die Entfernung von Zellen mit höherer Expression der Akt1-eGFP Konstrukte. So wurden Populationen mit ähnlichem Expressionslevel erhalten und die Vergleichbarkeit der Zellen verbessert. Abb. 4.2.2-1 B zeigt die jeweilige Population der transduzierten TrC1 nach Sortierung. Die Proben wurden im Laufe des ersten Expandierens der Zellen entnommen und umgehend gemessen.

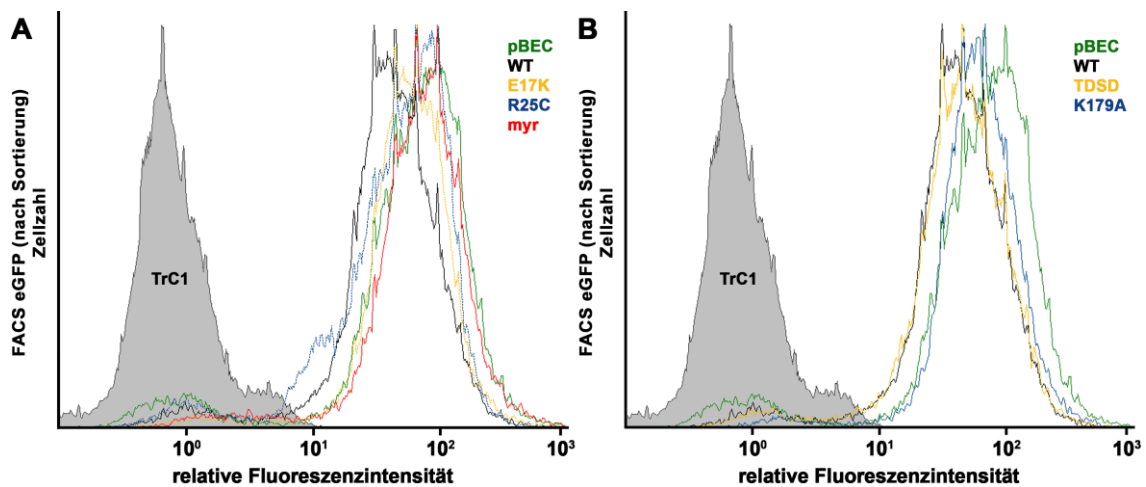


Abb. 4.2.2-1 Durchflusszytometrie der Akt1-eGFP-Expression in TrC1 unmittelbar nach Sortierung

Für die Durchflusszytometrie der Expression der Akt1-eGFP Varianten-exprimierenden TrC1 wurden, im Laufe des Passagierens, 200.000 suspendierte Zellen in 1 ml Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Durchflusszytometrie umfasste je Population 50.000 gesunde Zellen. Die Histogramme zeigen die Verteilung der 50.000 Zellen aufgetrennt nach Intensität auf der Abszisse und der Zellhäufigkeit auf der Ordinate. Die Messung wurde für die TrC1 PH-Domänen-Mutationen (A) und die Kinase-Domänen-Mutationen (B) mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer im Kanal FL-1 bei 488 nm durchgeführt. Als Kontrolle dienten die untransduzierten TrC1.

Um die Langzeitstabilität zu testen und diese für Langzeitexperimente, wie z.B. das Koloniebildungs-Assay oder Tierexperimente, garantieren zu können, wurde zusätzlich die

4 Ergebnisse

Entwicklung des Fluoreszenzgehaltes im Verlauf der Zeit mit einem FACSCalibur bestimmt. Die Zellen wurden hierzu vier Wochen ohne Selektionsantibiotika (Puromycin) in Kultur gehalten. Folgende Abbildung Abb. 4.2.2-2 A zeigt die durchflusszytometrische Analyse der grünen Fluoreszenz dieser Langzeitkulturen und Abb. 4.2.2-2 B die Entwicklung der Expression des Fusionsproteins Akt1-eGFP in den TrC1.

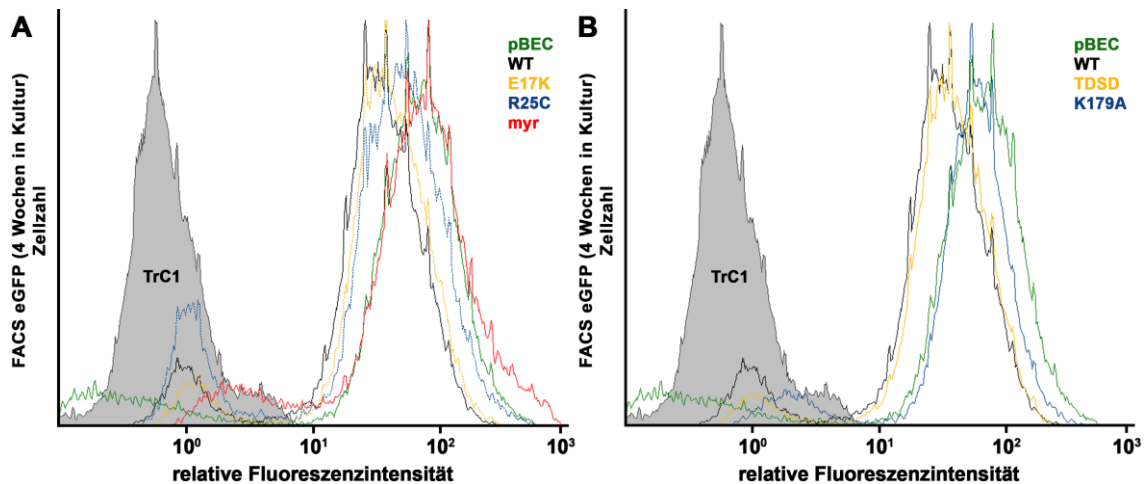


Abb. 4.2.2-2 Langzeitentwicklung der Akt1-eGFP-Expression in TrC1

Für die Durchflusszytometrie der Langzeitstabilität der Expression der Akt1-eGFP-Varianten-exprimierenden TrC1 wurden nach 4 Wochen, im Laufe des Passagierens, 200.000 suspendierte Zellen in 1 ml Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Durchflusszytometrie umfasste je Population 50.000 gesunde Zellen. Die Histogramme zeigen die Verteilung der 50.000 Zellen aufgetrennt nach Intensität auf der Abszisse und der Zellhäufigkeit auf der Ordinate. Die Messung wurde für die TrC1 PH-Domänen-Mutationen (A) und die Kinase-Domänen-Mutationen (B) mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer im Kanal FL-1 bei 488 nm durchgeführt. Als Kontrolle dienten die untransduzierten TrC1.

Alle Zelllinien zeigten trotz der langen Kultivierungszeit nur sehr kleine Populationen von Zellen, die keine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Von den in ihrer Akt1-eGFP-Expression-angepassten Zellen, wurden jeweils 40 Aliquote mit jeweils einer Millionen Zellen kryokonserviert. Diese Vorgehensweise garantierte während des gesamten Vorhabens eine verlässliche und konstante Vergleichbarkeit der Zelllinien bezüglich der Expression der Akt1-eGFP Varianten in jedem der durchgeführten Experimente.

4.2.3 Fluoreszenz-basiertes Sortieren der MEF $-/-$

Die in Abschnitt 4.2.2 beschriebene Verfahrensweise wurde für die Anpassung der Akt1-eGFP-Varianten-Expression in den MEF $-/-$ genutzt. Entsprechend zeigt Abbildung 4.2.3-1 die Durchflusszytometrie der erzeugten MEF $-/-$ Zelllinien direkt nach Sortierung.

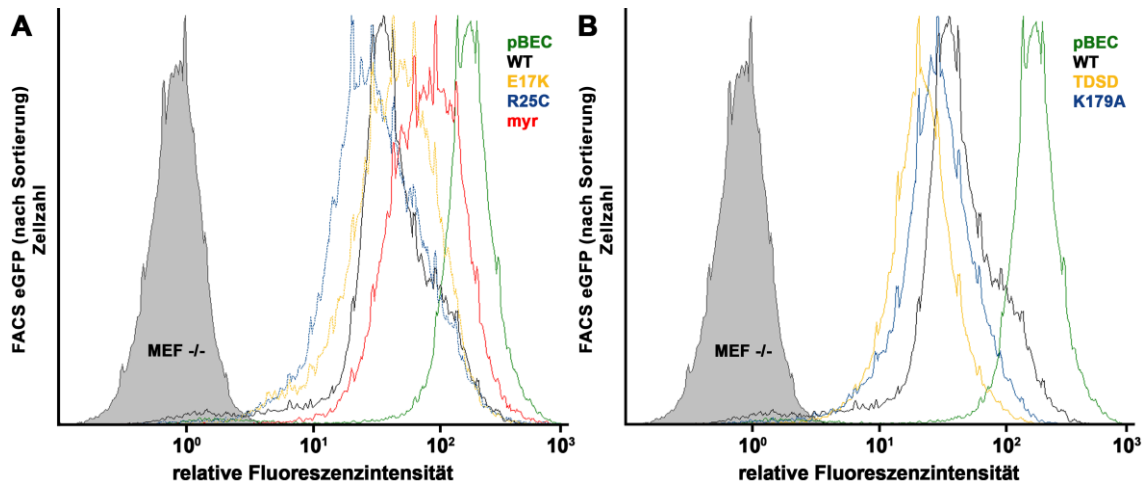


Abb. 4.2.3-1 Durchflusszytometrie der Akt1-eGFP-Expression in MEF $-/-$ unmittelbar nach Sortierung

Für die Durchflusszytometrie der Expression der Akt1-eGFPVarianten-exprimierenden MEF $-/-$ wurden, im Laufe des Passagierens, 200.000 suspendierte Zellen in 1 ml Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Durchflusszytometrie umfasste je Population 50.000 gesunde Zellen. Die Histogramme zeigen die Verteilung der 50.000 Zellen aufgetrennt nach Intensität auf der Abszisse und der Zellhäufigkeit auf der Ordinate. Die Messung wurde für die MEF $-/-$ PH-Domänen-Mutationen (A) und die Kinase-Domänen-Mutationen (B) mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer im Kanal FL-1 bei 488 nm durchgeführt. Als Kontrolle dienten die untransduzierten MEF $-/-$.

Auch mit den MEF $-/-$ wurde ein Test der Langzeitstabilität durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu vier Wochen ohne Selektionsantibiotika (Puromycin) in Kultur gehalten. Folgende Abbildung 4.2.3-2 zeigt die Durchflusszytometrie der grünen Fluoreszenz dieser Langzeitkulturen und damit die Entwicklung der Expression des Fusionsproteins Akt1-eGFP in den MEF $-/-$. Ähnlich der TrC1 zeigten alle MEF $-/-$ Zelllinien trotz langer Kultivierungszeit nur wenige Zellen ohne grüne Fluoreszenz. Allerdings wiesen alle Varianten außer pBEC eine leichte Abnahme der Expression auf. Dies äußerte sich in der Durchflusszytometrie durch eine leichte Verschiebung der Populationen in Richtung der nicht transfizierten Kontrolle. Daher wurden von den initial in ihrer Akt1-eGFP-Expression-angepassten Zellen jeweils 20 Aliquote mit jeweils einer Millionen Zellen kryo-konserviert. Diese Vorgehensweise garantierte während des gesamten Vorhabens eine verlässliche und konstante Vergleichbarkeit der Zelllinien in jedem der durchgeführten Experimente.

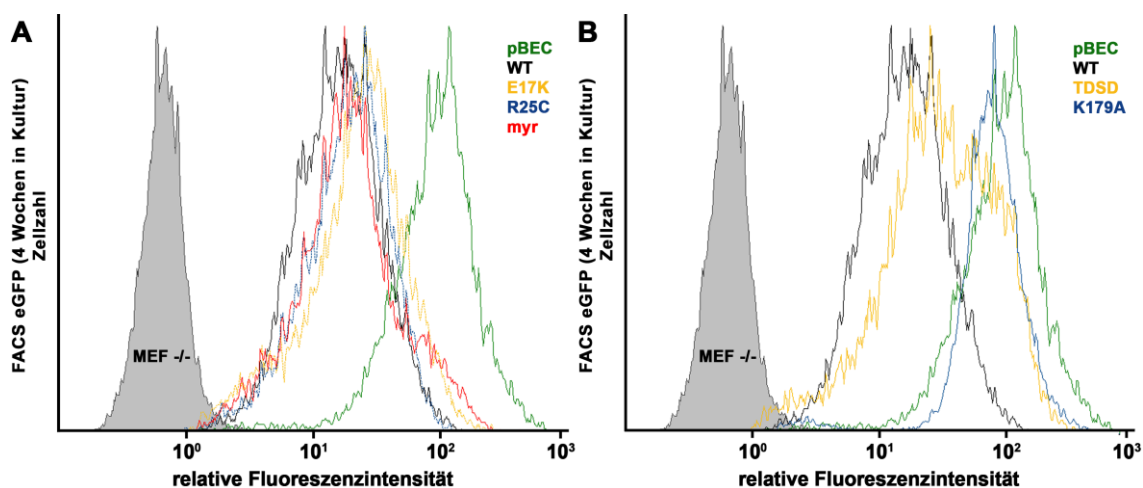


Abb. 4.2.3-2 Langzeitentwicklung der Akt1-eGFP-Expression in MEF -/-

Für die Durchflusszytometrie der Langzeitstabilität der Expression der Akt1-eGFP-Varianten-exprimierenden MEF -/- wurden nach 4 Wochen, im Laufe des Passagierens, 200.000 suspendierte Zellen in 1 ml Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Durchflusszytometrie umfasste je Population 50.000 gesunde Zellen. Die Histogramme zeigen die Verteilung der 50.000 Zellen aufgetrennt nach Intensität auf der Abszisse und der Zellhäufigkeit auf der Ordinate. Die Messung wurde für die TrC1 PH-Domänen-Mutationen (A) und die Kinase-Domänen-Mutationen (B) mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer im Kanal FL-1 bei 488 nm durchgeführt. Als Kontrolle dienten die untransduzierten TrC1.

4.3 Effekte der Expression von Akt1-Mutanten auf die Zellen

4.3.1 Expression und Phosphorylierung der Akt1-Mutanten

Neben der Messung der eGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie wurden zu Anfang der Charakterisierung der Akt1-Mutanten Zelllysate von diesen erstellt. Mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurde mit spezifischen Antikörpern die mutierten Proteine nachgewiesen. Zusätzlich wurde die relative Menge an phosphoryliertem T308 bzw. S473 nachgewiesen. Die folgende Abbildung zeigt die Lysate der 14 erstellten Zelllinien bei gleicher Anzahl an lysierten Zellen. Zu beachten ist, dass die Fusionsproteine auf Grund des zusätzlichen eGFP ein zum endogenen Akt um ca. 27 kDa erhöhtes Molekulargewicht aufweisen und daher langsamer durch das SDS-Gel migrieren. Dies ermöglicht die Unterscheidung der Fusionsproteine von dem murinen, endogenen Akt. Das endogene murine Akt1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa, wohingegen das eGFP-fusionierte humane Akt1 ca. 87 kDa groß war. Einen Sonderfall stellte das myr(-PH)Akt1-eGFP Protein dar, da es auf Grund der fehlenden PH-Domäne nur ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa aufwies. Abbildung 4.3.1-1 zeigt, dass die transduzierten und bezüglich ihres eGFP-Gehaltes selektierten TrC1 (A) und MEF -/- (B) tatsächlich einen gleichmäßigen Gehalt der überexprimierten Akt1-eGFP-Variante aufweisen. Außerdem wurde bei den Mutanten E17K

4 Ergebnisse

und myrAkt1 eine Erhöhung der initialen Phosphorylierung am T308 und S473 des künstlich eingefügten Proteins beobachtet.

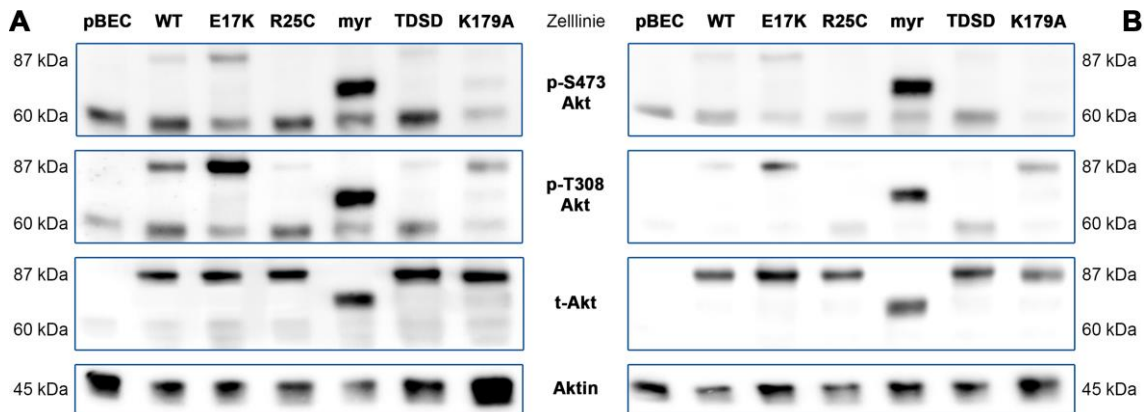


Abb. 4.3.1-1 Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen

Für die Western Blot-Analyse der Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen wurden pro Spur 20 µg Protein aus Vollzelllysaten der jeweiligen Zelllinie aufgetragen. Die Western Blot-Membranen wurden mit Antikörpern gegen Aktin als Ladekontrolle, Akt insgesamt (t-AKT) und die jeweiligen phosphorylierten Varianten am Threonin 308 (p-T308) und Serin 473 (p-S473) inkubiert. Dies wurde mit TrC1 (A) und MEF $-/-$ (B) durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde mit einem FUSION Solo aufgenommen und mit der Fusion Software in einem 16-bit Graustufenbild dargestellt.

4.3.2 Auswirkung der Akt1-Mutationen auf Proliferation und metabolische Aktivität

Zur Untersuchung der Effekte der Akt1-Mutationen in den Zielzellen wurden diese in Bezug auf ihre Zellviabilität, Proliferation und metabolische Aktivität im Zeitverlauf analysiert. Die Charakterisierung der Akt1-Mutanten wurde anhand von CASY Zählungen, WST-1- und KV-Assays durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich TrC1 WT konstitutiv aktive Akt1-Varianten oder dominant negative Akt1-Varianten in ihrer Zellproliferation mittels Zellzählung unterschieden.

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit werden im Folgenden die Mutanten in zwei verschiedenen Gruppen dargestellt, zum einem dem PH-Domänen-Set, das die Mutanten mit veränderter Rekrutierung an die Membran (E17K, R25C, myr) zusammenfasst, zum anderem dem Kinase-Set, das die Mutationen der Kinase-Domäne (TDS, K179A) umfasst. Beide Sets beinhalten die nur eGFP-exprimierende (pBEC) und die Akt1-WT-überexprimierende (WT) Kontrolle.

4 Ergebnisse

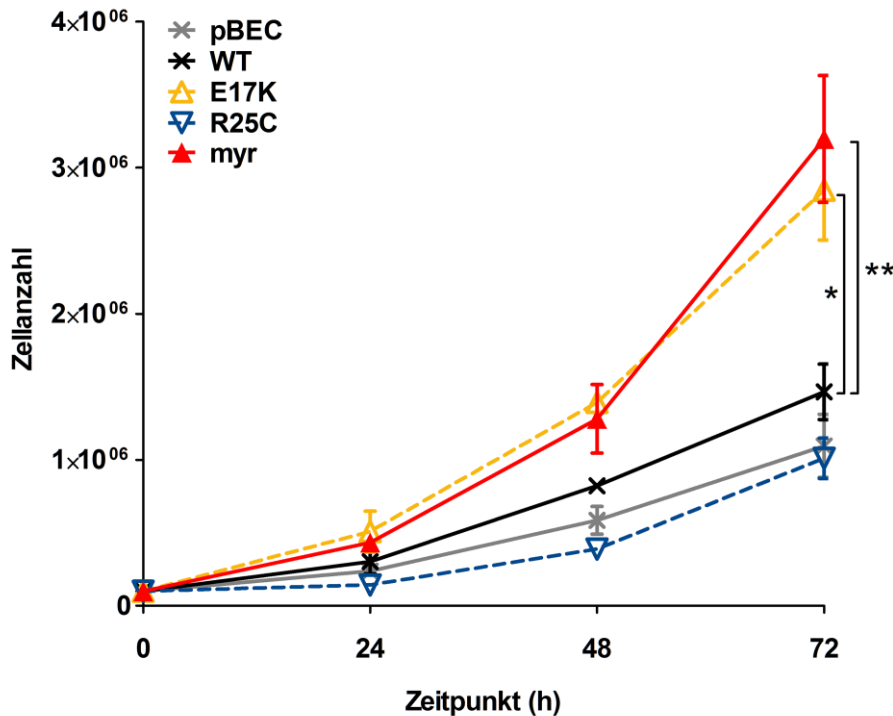


Abb. 4.3.2-1 Proliferation im Zeitverlauf des PH-Domänen-Sets in TrC1

Für die Proliferationsmessung wurden jeweils 100.000 Zellen auf einer 10 cm Kulturschale ausgesät. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle und TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Zellzahl der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Plattierung und Kultivierung unter Standardbedingungen in Suspension gebracht und mit einem CASY Zellzähler gezählt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wie in Abb. 4.3.2-1 gezeigt, unterschieden sich die im PH-Domänen-Set zusammengefassten Akt1-Varianten deutlich in ihrer Proliferationsrate. Dabei wurden TrC1 pBEC und TrC1 WT als Kontrollen verwendet. Beide zeigten bei 24, 48 und 72 h nach Aussaat eine stetig ansteigende Zellanzahl. Nach 72 h wies TrC1 WT gegenüber den TrC1 pBEC eine leicht erhöhte Zellzahl auf, was auf eine ähnliche Proliferationsrate hinweist. Die klassische, über Myristoylierung aktivierte Akt1-Variante (myr) mit direktem Membrananker zeigte dagegen im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant erhöhte Proliferation. Gleiches gilt für die TrC1 E17K. Beide Mutanten wiesen nach 3 Tagen im Vergleich zu TrC1 WT eine 3-fach erhöhte Zellzahl auf. Die Mutante TrC1 R25C, deren Membranbindung mutmaßlich negativ beeinträchtigt ist, wies zu allen gemessenen Zeitpunkten eine leicht geringere Zellzahl auf.

4 Ergebnisse

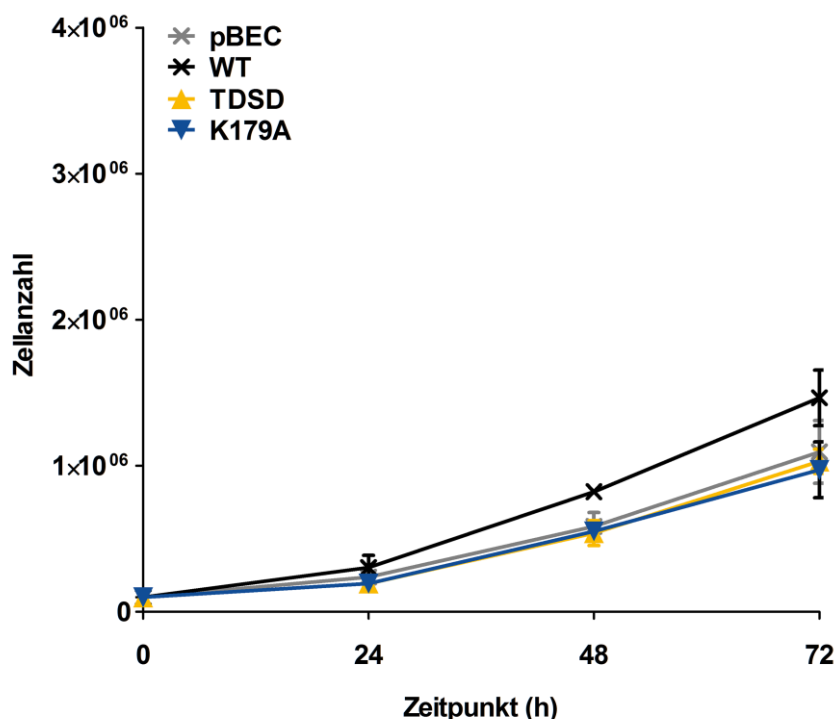


Abb. 4.3.2-2 Proliferationsmessung im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 Kinase-Domänen-Sets

Für die Proliferationsmessung wurden jeweils 100.000 Zellen auf einer 10 cm Kulturschale ausgesät. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle und TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Zellzahl der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 TDS und TrC1 K179A. Die Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Plattierung und Kultivierung unter Standardbedingungen in Suspension gebracht und mit einem CASY Zellzähler gezählt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bei dem Vergleich der Proliferationsraten der Kinase-Domänen Varianten waren ähnliche Verläufe zu allen Zeitpunkten zu erkennen. Hierbei hatte der TrC1 WT, zu allen Zeitpunkten, mit dem Höhepunkt bei 72 h, die höchste Zellzahl. Die postulierte aktive Variante zeigte keine erhöhten Zellzahlen im Vergleich zu der Kontrolle TrC1 WT. Die inhibierende Kinase-Domänen-Mutation TrC1 K179A zeigte eine leicht reduzierte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen. (vgl. 4.3.2-2)

Tab 4.3.2-1 Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien

| | TrC1 | pBEC | WT | E17K | R25C | myr | TDS | K179A |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|-----|------|-------|
| Verdopplungszeit (h) | 25,0 | 26,3 | 19,7 | 10,1 | 28,5 | 9,0 | 28,0 | 29,6 |

Anhand der Zellzählung wurden die Verdopplungszeiten berechnet. (vgl. Tab 4.3.2-1) Dies gibt an, wie lange die Zellen brauchten um sich einmal zu teilen. Die Verdopplungszeiten

4 Ergebnisse

zeigen Tendenzen, die den Zellzahlen im Verlauf der Zeit entsprechen. (vgl. Abb. 4.3.2-1 und 4.3.2-1 2)

Zur weiteren Charakterisierung der Akt1-Varianten wurde die Zellmenge der adhärenierten Zellen der verschiedenen Varianten durch ein Kristallviolett-Assay (KV-Assay) untersucht, das einen Hinweis auf die Zahl der lebenden Zellen gibt (Abb. 4.3.2-3).

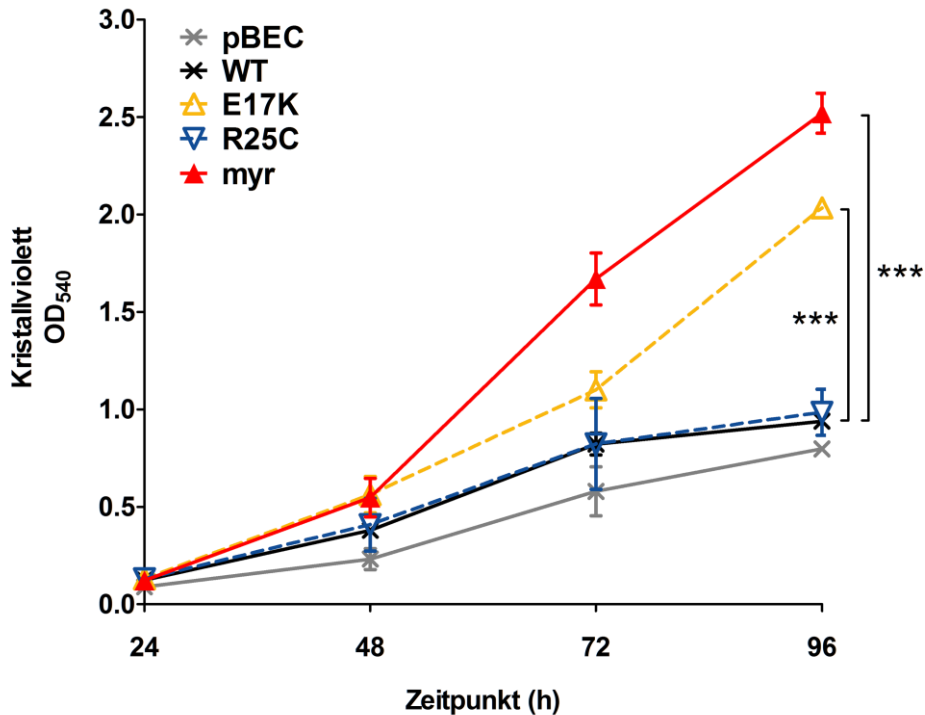


Abb. 4.3.2-3 KV-Assay im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 PH-Domänen-Sets

Für den KV-Assay wurden auf einer 96-Well Platte jeweils 2500 Zellen ausgesät. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Zellviabilität der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die adhärenierten Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Plattierung und Kultivierung unter Standardbedingungen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Der Farbstoff wurde nach dem Trocknen der Platten mit 50 μ L 0,2% Triton in A. dest pro Well aus den Zellen gelöst und die OD photometrisch in einem ELISA reader bei 540 nm bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse des KV-Assays die Ergebnisse der Zellzählung: Im Gesamtverlauf wiesen alle Varianten des PH-Domänen-Sets zu den Zeitpunkten eine stetigsteigende optische Dichte auf, die einer steigenden Zahl vitaler Zellen bei allen Zeitpunkten entspricht. (vgl. Abb. 4.3.2-3)

Ebenso wie bei der Zellzählung mittels CASY Cell Counter wiesen die beiden Kontrollzellen TrC1 pBEC und TrC1 WT sowie die TrC1 R25C parallele Verläufe mit Erreichen eines

4 Ergebnisse

Plateaus nach 72 h auf. Dagegen war insbesondere bei TrC1 myr, aber auch bei TrC1 E17K wiederum eine gegenüber den Kontrollen und TrC1 R25C signifikant erhöhte Proliferationsrate zu beobachten, die auch nach 72 h noch nicht in ein Plateau mündete.

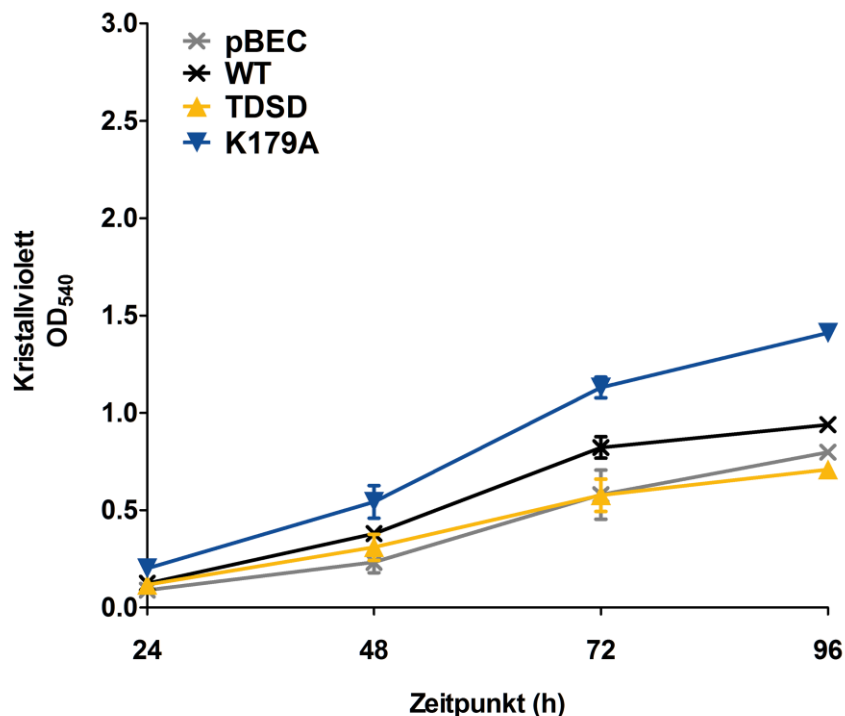


Abb. 4.3.2-4 KV-Assay im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 Kinase-Domänen-Sets

Für den KV-Assay wurden auf einer 96-Well Platte jeweils 2500 Zellen ausgesät. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Zellviabilität der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 TDS und TrC1 K179A. Die adhärenierten Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Plattierung und Kultivierung unter Standardbedingungen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Der Farbstoff wurde nach dem Trocknen der Platten mit 50 µL 0,2% Triton in A. dest pro Well aus den Zellen gelöst und die OD photometrisch in einem ELISA reader bei 540 nm bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Zur Bestätigung der gemessenen Zellzahl des Kinase-Domänen-Sets wurde der KV-Assay mit den Varianten TrC1 WT, TrC1 pBEC, TrC1 TDS, TrC1 K179A in Abb. 4.3.2-4 graphisch dargestellt

Die TrC1 TDS Mutante bot eine leichte Differenz der optischen Dichte im Vergleich zu der Kontrolle TrC1 WT. Bei 72 h hatte TrC1 TDS die niedrigsten Werte der optischen Dichte aller gemessener Konstrukte. TrC1 K179A zeigte im Vergleich der Kinase-Domänen Konstrukte eine leicht erhöhte Entwicklung der optischen Dichte. Insgesamt war zu erkennen, dass TrC1 myr sowie TrC1 E17K die höchsten Teilungsraten hatten, während TrC1 K179A,

4 Ergebnisse

TrC1 R25C und TrC1 TDSO sich kaum von den Kontrollen unterschieden. Die reine Überexpression von Akt1-eGFP führte zu einer insignifikanten Erhöhung der Proliferation. Um Unterschiede in der metabolischen Aktivität der verschiedenen Mutanten aufzudecken wurde ein WST-1- Assay vorgenommen.

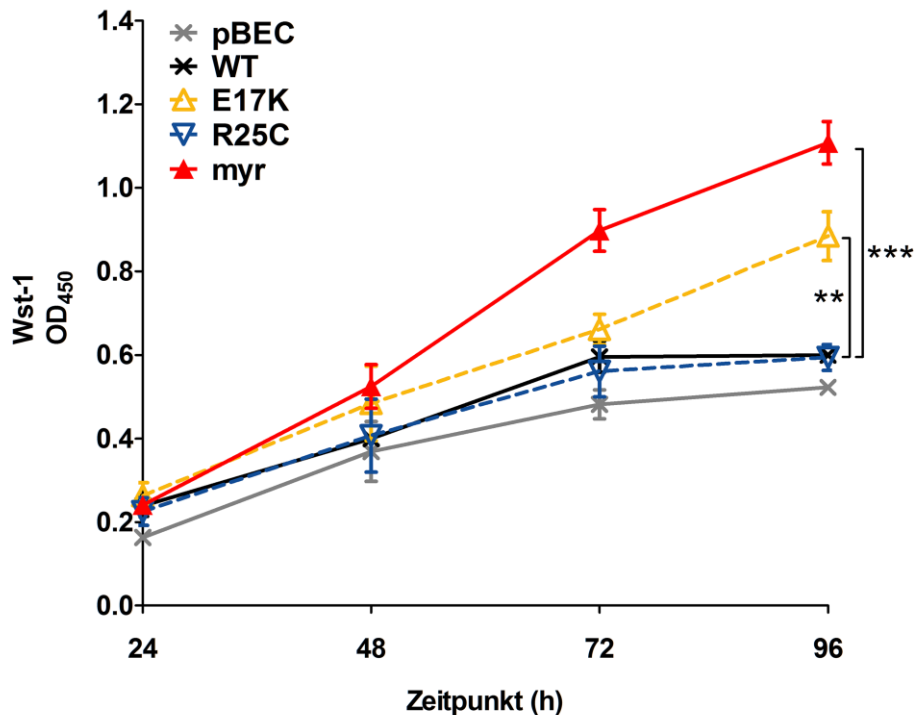


Abb. 4.3.2-5 Metabolischer Assay WST-1 im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 PH-Domänen-Sets

Für den WST-1-Assay wurden auf einer 96-Well Platte jeweils 2500 Zellen ausgesät. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die metabolische Aktivität der TrC1 WT mit den Werten der TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Plattierung mit 10 μ L WST-1-Lsg. pro Well versetzt. Nach 75-minütiger Inkubation bei Standardbedingungen wurde die Reduktion von WST-1 zu Formazan als OD photometrisch in einem ELISA reader bei 450 nm bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Die optische Dichte entspricht der Menge des umgesetzten Farbstoffes und lässt Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität und somit indirekt auf die Menge vitaler Zellen zu.

Im WST-1 Assay war für die PH-Domänen-Konstrukte im Verlauf ein Anstieg der optischen Dichte bei allen Konstrukten zu erkennen. (vgl. Abb. 4.3.2 5) Die TrC1 pBEC Mutante blieb diejenige mit dem geringsten metabolischen Umsatz. Die zweite Kontrolle, der TrC1 WT, verlief vergleichbar zu dem TrC1 pBEC. Bei der TrC1 WT Mutante steigerte sich die optische Dichte nach 72 h nicht weiter und blieb bei 96 h auf dem gleichen Niveau. Die TrC1

4 Ergebnisse

myr zeigte im Verlauf hochsignifikant die höchste metabolische Aktivität mit einer OD_{450} von 1,1 bei 96 h. Dementsprechend verhielt sich die TrC1 E17K Variante und wies ebenso ein signifikantes Maximum bei 96 h nach Plattierung im Vergleich zu TrC1 WT auf. Die metabolische Aktivität von TrC1 R25C hingegen wies keine signifikante Differenz zum Verlauf der beiden Kontrollen auf.

Das WST-1-Assay wurde ebenfalls mit den Varianten des Kinase-Domänen-Sets durchgeführt, zu sehen in Abb. 4.3.2-6. Hierbei war zu beobachten, dass die metabolische Aktivität der TrC1 K179A und der TrC1 TDSD Variante im Vergleich zu TrC1 WT leicht gehemmt war, was auf eine leicht verminderte Zahl an lebenden Zellen und somit einer verminderten Proliferation hindeutet. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Zellzählung und KV überein.

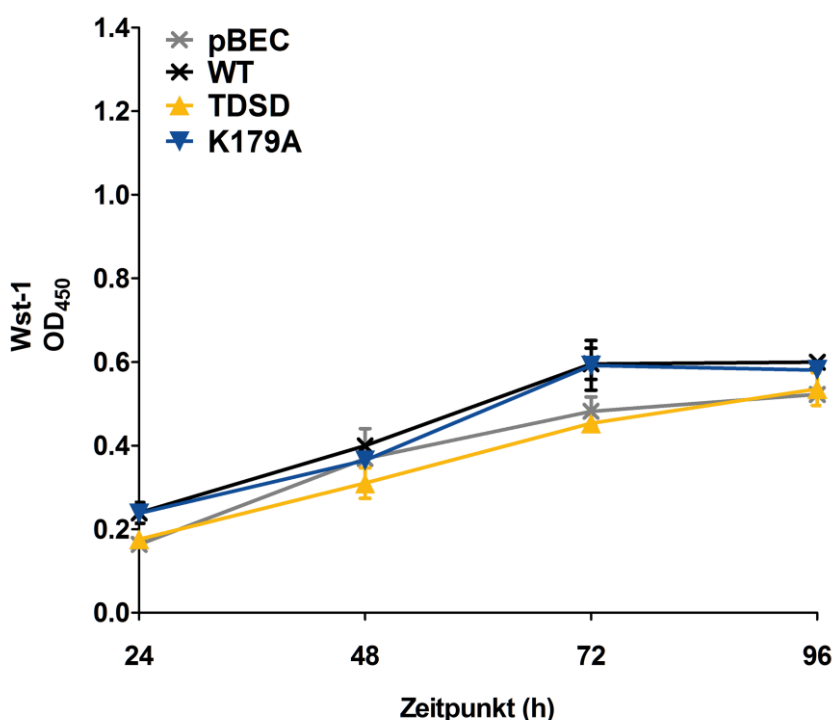


Abb. 4.3.2-6 Metabolischer Assay WST-1 im Zeitverlauf nach Aussaat des TrC1 Kinase-Domänen-Sets

Für den WST-1-Assay wurden jeweils 2000 Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte ausgesät. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die metabolische Aktivität der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 TDSD und TrC1 K179A. Die Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach Plattierung mit 10 μ L WST-1-Lsg. pro Well versetzt. Nach 75-minütiger Inkubation bei Standardbedingungen wurde die Reduktion von WST-1 zu Formazan als OD photometrisch in einem ELISA reader bei 450 nm bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

In der Zusammenfassung der Ergebnisse der indirekten Proliferationsmessung anhand des metabolischen Umsatzes, bestimmt mit dem WST-1-Assay, zeigte sich eine signifikant erhöhte metabolische Aktivität für TrC1 E17K und TrC1 myr, wohingegen TrC1 R25C nahezu unverändert zum TrC1 WT blieben. TrC1 TDSO sowie TrC1 K179A waren leicht gehemmt in ihrer metabolischen Aktivität.

Der Effekt der TrC1 TDSO Mutation, die als konstitutiv aktiv postuliert ist, resultierte in einer, zum endogenen Level unveränderten, zellulären Aktivierung.

Somit kann abschließend zusammengefasst werden, dass sowohl die Proliferation, Vitalität und metabolische Aktivität der verschiedenen Akt1-Konstrukte sich teilweise deutlich voneinander unterschieden. Dabei zeigten alle drei Untersuchungsmethoden bei TrC1 myr und TrC1 E17K eine gegenüber TrC1 WT Überexpressionskontrolle signifikant gesteigerte Zahl vitaler Zellen und somit gesteigerte Proliferation. Aktivierende Mutationen, welche die Bindung des Akt1 zur Zellmembran verstärken, beeinflussten die Proliferation am stärksten. Die als konstitutiv aktiviert postulierte Mutante TrC1 TDSO zeigte dagegen keine beschleunigte Zellteilung. Inaktivierende Mutanten hatten wenig bis keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

4.3.3 Tumorwachstum in Nacktmäusen

Um zu überprüfen, ob das veränderte Proliferationsverhalten der E17K-Mutante auch das Wachstumsverhalten von E17K-überexprimierenden Zellen *in vivo* verändert, wurden MEF ^{-/-} E17K und MEF Kontroll-Zellen (ctr) subkutan in die Flanke von immundefizienten Nacktmäusen injiziert. Das Wachstum wurde zwischen 5 und 40 Tagen beobachtet und quantifiziert. Beobachtet wurde, dass beide Zelltypen sich im Zeitverlauf unterschiedlich vermehren. Proliferierendes Gewebe war erst ab dem fünften Tag messbar.

Die Injektion beider Zelllinien führten an Tag fünf bis acht zu einem initialen Anschwellen der Injektionsstelle, um dann wiederum abzuklingen. (Abb. 4.3.3-1 A) Nach dieser Zeit hielt sich im Falle der MEF ctr die TumorgroÙe im Bereich von 5-10 mm³ konstant bis Tag 30. Von diesem Zeitpunkt an war ein vermehrtes Wachstum bis zu Tag 40 mit einer GröÙe von 150 mm³ zu erkennen. Hingegen konnten die TumorvergröÙerung im Falle der MEF ^{-/-} E17K bereits ab Tag 16 gemessen werden. Am Tag 27 nach Injektion erreichten diese bereits eine kritische GröÙe von ca. 200 mm³ und die Mäuse mussten euthanasiert werden. Gegenüber MEF ctr hatte MEF ^{-/-} E17K ein signifikant höheres Tumolvolumen bei den letzten beiden Messzeitpunkten. Im Anschluss wurden zur qualitativen Analyse der Gewebeveränderungen histologische Schnitte angefertigt und diese mit HE gefärbt. Alle sauren Strukturen in Geweben, wie DNA, Ribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum sind blau gefärbt.

4 Ergebnisse

Eosin färbt Kollagen, Mitochondrien, Zellplasmaproteine und das glatte endoplasmatische Retikulum rot. Die Abb. 4.3.3-1 B lässt eine geordnete Fibroblasten-artige Struktur der MEF ctr Tumore erkennen. Dagegen weist das Tumorgewebe der MEF $-/-$ E17K eine aufgehobene Struktur, höhere Zellzahl und dichteres Zellwachstum auf. (Abb. 4.3.3-1 C) Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Überexpression der klinisch relevanten Akt Mutation E17K ein transformierendes Ereignis in MEF $-/-$ darstellt und ein erhöhtes tumorähnliches Wachstum ermöglicht.

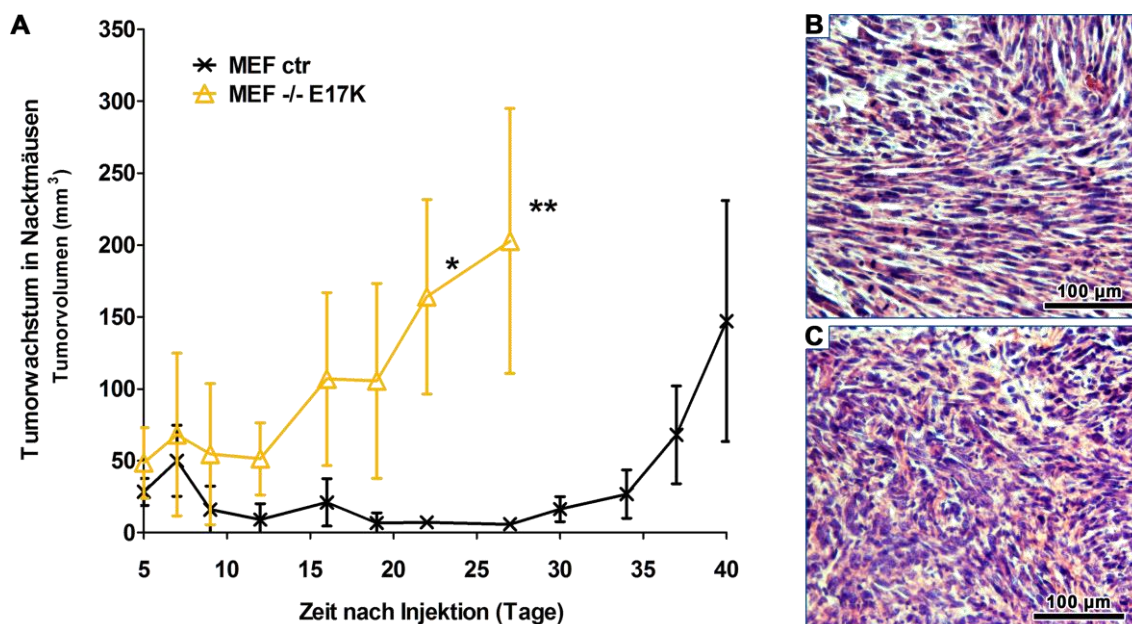


Abb. 4.3.3-1 Tumorwachstum in Nacktmäusen im Vergleich von MEF ctr und MEF $-/-$ E17K

Für das Tumorwachstum in Nacktmäusen wurden 2 Millionen Zellen in 100 μ L DMEM subkutan in die Flanke von jeweils sechs Mäusen injiziert und bis 40 Tage nach Injektion mit Hilfe einer digitalen Schieblehre bestimmt. Verglichen wurde das Wachstum der injizierten MEF ctr Zellen, die eine nicht transfizierte Kontrolle darstellen, und MEF $-/-$ E17K.

(A) Stellt den Verlauf des Tumorwachstums in mm³ nach Injektion der Zellen graphisch dar.

(B) Bildet einen histologischen Schnitt nach HE-Färbung der MEF ctr ab.

(C) Bildet einen histologischen Schnitt nach HE-Färbung der MEF $-/-$ E17K ab.

Das Tumorgewebe wurde über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert, eingebettet mit einem Shandon Excelsior ES Paraffineinbettautomat und das Ausbetten mit Hilfe eines Shandon HistoCentre 2 durchgeführt. Von den eingebetteten Tumoren wurden mit Hilfe eines Leica RM2235 Rotationsmikrotoms 6 μ m dünne Schnitte erstellt und diese auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen. Für die HE Färbung wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert und mit einer Alkoholreihe und Wässerung rehydriert. Es folgte eine Hämalaun-Färbung und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Zusätzlich wurde mit Eosin G-Lösung gefärbt. Die Bilder der Schnitte wurden mit einem Leica-Lichtmikroskop und einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. Dunkelblaue Bereiche stellten Zellkerne da, wobei das Zytoplasma rotviolett gefärbt wurde. Bei roten Bereichen handelte es sich um Blutgefäße. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 6. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; ** p < 0,01.

4.4 Akt1-bedingte Modulation der zellulären Antwort auf IR

4.4.1 Proliferations- und Zellzyklusveränderungen nach IR

Nach Charakterisierung der zellulären Aktivität der Akt1-Mutanten stellte sich die Frage, inwiefern die zelluläre Antwort dieser Akt1-Mutanten nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen moduliert sei. Um die Rolle von Akt1 auf die kurzfristige sowie langfristige zelluläre Antwort nach Bestrahlung zu ergründen, wurden die verschiedenen Akt1-Mutanten-exprimierenden Zellen verschiedenen Experimenten mit IR unterzogen.

Hierzu wurde der Einfluss der Überexpression der verschiedenen Akt1-Varianten auf die Proliferation, die metabolische Aktivität und den Zellzyklus nach Bestrahlung gemessen. Hierzu wurde die Zahl der lebenden TrC1 mittels KV-Assays und WST-1-Assays 24, 48, 72 und 96 h nach Bestrahlung mit 0, 2, 5 und 10 Gy Röntgenstrahlung gemessen. Darüber hinaus wurden Veränderungen in der Zellfunktion mittels Durchflusszytometrie erfasst. Die Ergebnisse wurden auf die jeweiligen nicht bestrahlten Werte jeder Zelllinie zum selben Zeitpunkt normalisiert, um eine Verfälschung der Veränderungen nach Bestrahlung durch die bereits bekannten Proliferationsunterschiede zu entfernen.

Das KV-Assay zeigte bei 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy, dass die Akt1-Mutanten unterschiedlich auf diese Behandlung reagierten. Exemplarisch wird in Abb. 4.4.1-1 der Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy gezeigt, da dieser optimale Bedingungen bezüglich der Zelldichte und des Hemmungspotential der Bestrahlung kombiniert. Die Zeitpunkte 24 und 48 h zeigten, dass die Zellpopulationen besonders nach Bestrahlung noch nicht genügend gewachsen waren, um verlässliche Ergebnisse im KV- und WST-1-Assay zu liefern. Nach 96 h waren spezielle TrC1 E17K und TrC1 myr zu dicht gewachsen, was eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge gehabt hätte.

Bei allen untersuchten Zellen reduzierte eine Bestrahlung die Zahl der lebenden Zellen signifikant. Bei TrC1 pBEC wurde die Zahl der lebenden Zellen 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy etwa um die Hälfte reduziert im Vergleich zu den Werten ohne Bestrahlung. Die Überexpression des Akt1-WT führte zu einer leichten Verbesserung des Zellüberlebens wogegen sich bei TrC1 myr eine gegenüber dem TrC1 WT signifikante Verbesserung der Zelltötung ergab. Hingegen zeigte TrC1 E17K eine Tendenz zu einer Verbesserung des Überlebens nach Bestrahlung im Vergleich zum WT. TDS wiederum wies eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung auf, mit den niedrigsten Einbußen an vitalen Zellen von allen untersuchten Akt1-Varianten. Vergleichbar mit dem Effekt einer Bestrahlung auf TrC1 WT reagierte TrC1 R25C, während TrC1 K179A eine ähnliche Reaktion auf Bestrahlung zeigte wie TrC1 pBEC.

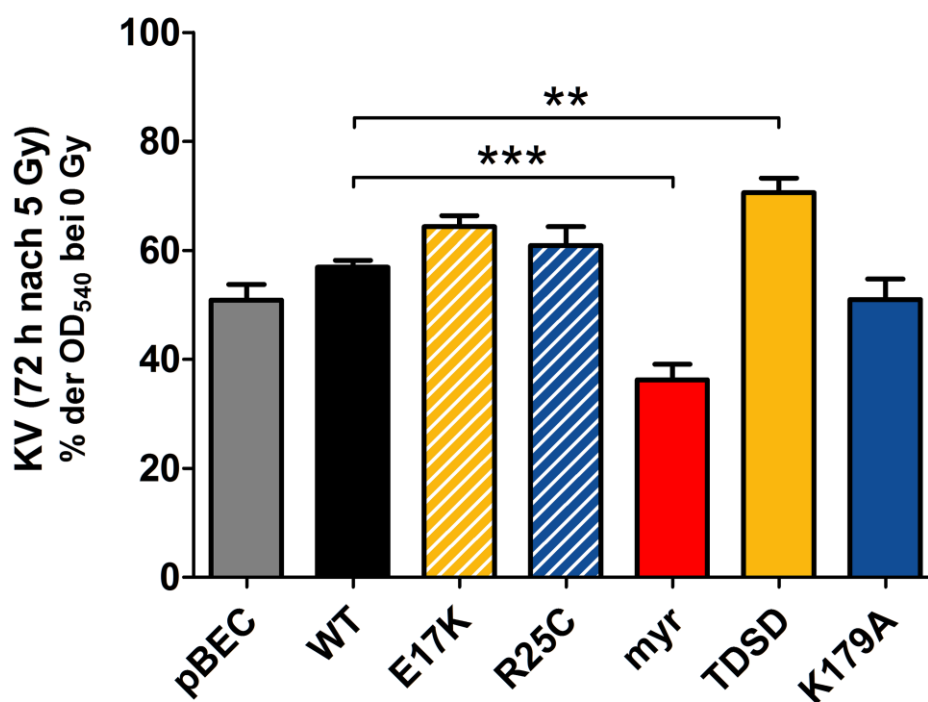


Abb. 4.4.1-1 KV-Assay 72 h nach Behandlung der sieben TrC1 Zelllinien mit 5 Gy

Für den KV-Assay wurden jeweils 2500 Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle und TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Zellviabilität der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C, TrC1 myr, TrC1 TDSD und TrC1 K179A. Die adhärennten Zellen wurden 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Der Farbstoff wurde nach dem Trocknen der Platten mit 50 μ L 0,2% Triton in A. dest pro Well aus den Zellen gelöst und die OD photometrisch in einem ELISA reader bei 540 nm bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Diese Tendenzen waren ebenso bei anderen untersuchten Zeitpunkten, 48 und 96 h nach Bestrahlung, sowie bei anderen Bestrahlungsdosen, mit 2 und 10 Gy, zu erkennen. Allerdings fielen die Unterschiede nicht in dem Umfang, wie im Falle der 72 h nach 5 Gy, aus.

Um die Effekte der Akt1-Varianten auf die Strahlenantwort der untersuchten Zellen nach Bestrahlung eingehender zu beleuchten, wurde die Zellvitalität nach Bestrahlung zusätzlich mittels WST-1-Test untersucht, der die Erfassung der Zellvitalität über das Ausmaß der metabolischen Aktivität erlaubt (3.3.12 Metabolischer Assay mit WST-1 S.66). Auch hier wurde exemplarisch der Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy abgebildet (siehe Abb. 4.4.1-2) Grundsätzlich senkte Bestrahlung in allen Fällen den Gesamtumsatz des WST-1 Reagenzes durch metabolische Prozesse der Zellen. Verglichen mit der Zellmenge im KV-Assay, der die Zahl der überlebenden, adhärennten Zellen erfasst, war der metabolische Umsatz aller Akt1-Varianten nach Bestrahlung deutlich weniger eingeschränkt.

4 Ergebnisse

Beispielsweise zeigte TrC1 pBEC im WST-1-Test nur eine Reduktion der optischen Dichte um 30%, im Vergleich zu den Werten ohne Bestrahlung, während dies im KV-Assay 50% waren (Abb. 4.4.1-2). Die maximale Reduktion der Lebendzellzahl (myr, pBEC) betrug 32% im Vergleich zu über 60% beim KV-Assay. TrC1 E17K bzw. TrC1 TDSD zeigten nach 3 Tagen einen Anteil metabolisch aktiver Zellen von fast 100%.

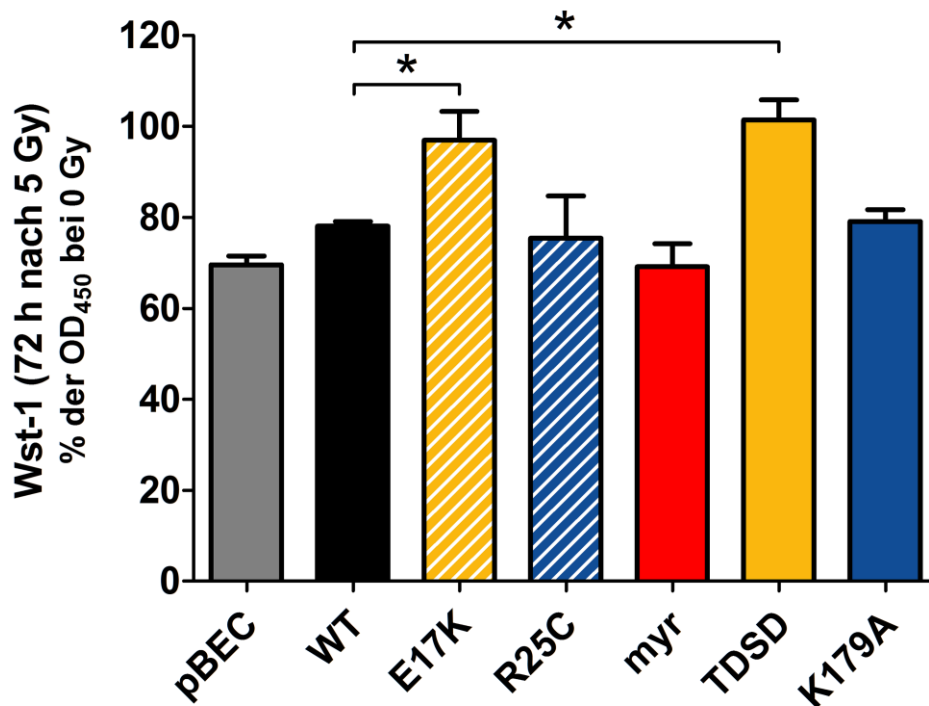


Abb. 4.4.1-2 Metabolischer Assay WST-1 72 h nach Bestrahlung der sieben TrC1 Zelllinien mit 5 Gy

Für den WST-1-Assay wurden jeweils 2500 Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die metabolische Aktivität der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C, TrC1 myr, TrC1 TDSD, TrC1 K179A. Die Zellen wurden 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy und mit 10 µL WST-1-Lsg. pro Well versetzt. Nach 75-minütiger Inkubation bei Standardbedingungen wurde Reduktion von WST-1 zu Formazan als OD photometrisch in einem ELISA reader bei 450 nm bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Auch wenn die Absolutwerte unterschiedlich waren, so waren die Tendenzen doch vergleichbar. Wie im KV-Assay hatte TrC1 WT, die Akt1-Kontrollvariante, leicht erhöhte Werte im Vergleich zu TrC1 pBEC. Die signifikante Reduktion der Zellviabilität von TrC1 myr konnte im WST-1-Assay nur als Tendenz eines erniedrigten metabolischen Umsatzes gemessen werden. Im Gegenteil dazu präsentierten sich die Zellen der TrC1 E17K, auch im WST-1-Assay, als signifikant resistenter gegenüber den Bestrahlungseffekten im Vergleich zu

4 Ergebnisse

der Kontrolle TrC1 WT. TrC1 R25C wich ebenso wie im KV-Assay nicht von der Kontrolle ab. TrC1 TDSO zeigte, wie im KV-Assay, die höchste Resistenz gegen Bestrahlung. Vergleichbare Werte wie die Kontrolle zeigte, wie TrC1 R25C, auch die Variante TrC1 K179A.

4.4.2 Apoptose und Zelltod nach IR

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Effekte der Mutationen durch eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem strahleninduzierten Zelltod erklären lassen. Zur Messung apoptotischer Zellen nach Bestrahlung wurde das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) mit TMRE bei TrC1 72 h nach 5 Gy analysiert. Es wurde insbesondere auf die unterschiedlichen Antworten auf Bestrahlung durch die verschiedenen Mutanten geachtet. Dieses Experiment basiert auf dem Farbwechsel des TMRE, wenn ein niedriges Membranpotential im Laufe der Apoptose vorliegt.

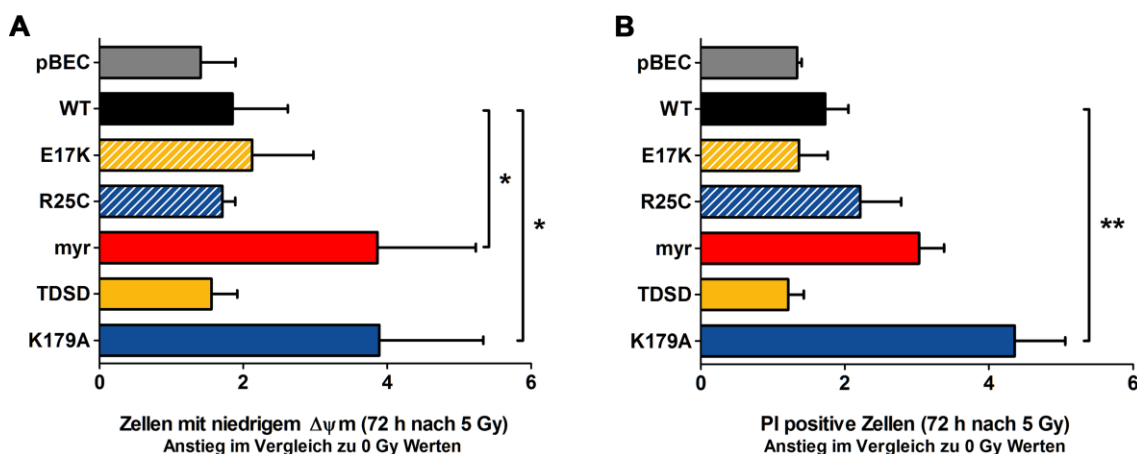


Abb. 4.4.2-1 Apoptose- und Zelltod-Analyse der TrC1 72 h nach 5 Gy

Für die Apoptose- und Zelltod-Messung wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well in einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle und TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Dargestellt ist der anteilige Anstieg von Zellen mit erniedrigtem mitochondrialen Membranpotential (A) und mit rupturierter Zellmembran (B). Verglichen wurde die TrC1 WT mit TrC1 E17K, TrC1 R25C, TrC1 myr, TrC1 TDSO und TrC1 K179A. Die Zellen wurden 72 h nach Bestrahlung mit 5 Gy geerntet und auf zwei FACS-Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von 200 μ L TMRE-Lsg. (A) bzw. 200 μ L PI-Lsg. (B) wurden die Zellen 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbungen wurden im FL-2 Kanal mit einem 555 nm-Laser gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

In allen TrC1 war in Abb. 4.4.2-1 A ein Anstieg der Anzahl apoptotischen Zellen um mindestens das 1,5-fache zu erkennen im Vergleich zu den unbestrahlten Werten. TrC1 WT

erreichte eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen als TrC1 pBEC mit einem fast zweifachen Anstieg. TrC1 E17K, TrC1 R25C und TrC1 TDSO hatten mit der Kontrolle vergleichbare Werte. Hingegen wiesen TrC1 myr und TrC1 K179A eine signifikant, annähernd vierfach gesteigerte Anzahl von Zellen mit erniedrigtem mitochondrialen Membranpotential nach Bestrahlung auf.

Die Exclusion-PI-Färbung dient der Analyse toter Zellen. Diese wurde durchgeführt um den Zelltod der Zellen nach Bestrahlung zu messen. Hierbei war zu erkennen, dass die Tendenzen der Verteilung der apoptotischen Zellen der TMRE-Messung annähernd auf die Verteilung avitaler Zellen zuträfen (vgl. Abb. 4.4.2-1 B). TrC1 pBEC und WT bildeten diese Tendenzen ab, mit einer annähernd zweifach gesteigerten Rate avitaler Zellen im Gegensatz zur Situation vor Bestrahlung. Während bei TrC1 E17K im Vergleich zur Kontrolle weniger Zellen starben, war der Zelltod bei TrC1 R25C über zweifach gesteigert. Ebenso wies TDSO mit der Kontrolle vergleichbare Werte auf. TrC1 myr wies eine dreifache Steigerung der Zahl toter Zellen in der Exclusion-PI-Färbung auf. Ebenso bestätigte das Experiment die TMRE-Messung der TrC1 K179A mit einer über 4-fachen signifikanten Steigerung avitaler Zellen nach Bestrahlung (vgl. Abb. 4.4.2-1 A).

4.4.3 Effekte der Mutanten auf das Langzeitüberleben nach IR

In den vorangegangenen Abschnitten wurden Kurzzeiteffekte der Akt1-Varianten auf das Zellüberleben nach Bestrahlung gezeigt. Um eine klinisch relevantere Aussage über die Bedeutung der Akt1-Varianten für die Strahlensensitivität treffen zu können, wurden im nächsten Schritt die Effekte auf das Langzeitüberleben gemessen. Dies wurde mit Hilfe eines Koloniebildungs-Assay über einen Zeitraum von 10 Tagen nach der Bestrahlung untersucht.

Alle Varianten des PH-Domänen-Sets wiesen ein verringertes Überleben bei steigender Strahlendosis auf. TrC1 pBEC und TrC1 WT verliefen annähernd kongruent und erreichten eine effiziente Dosis mit unter 10% überlebenden Zellen nach 6 Gy (vgl. Abb. 4.4.3-1). Hingegen zeigte myr eine erhöhte Sensitivität nach Bestrahlung und war bereits bei 5 Gy unter der 10% Überlebensgrenze. Im Gegensatz hierzu verhielt sich TrC1 E17K gegensätzlich und wies nach einer Dosis von 8 Gy über 10% vitaler Zellen auf. TrC1 R25C hatte im Koloniebildungs-Assay keinen signifikanten Unterschied zu TrC1 WT.

4 Ergebnisse

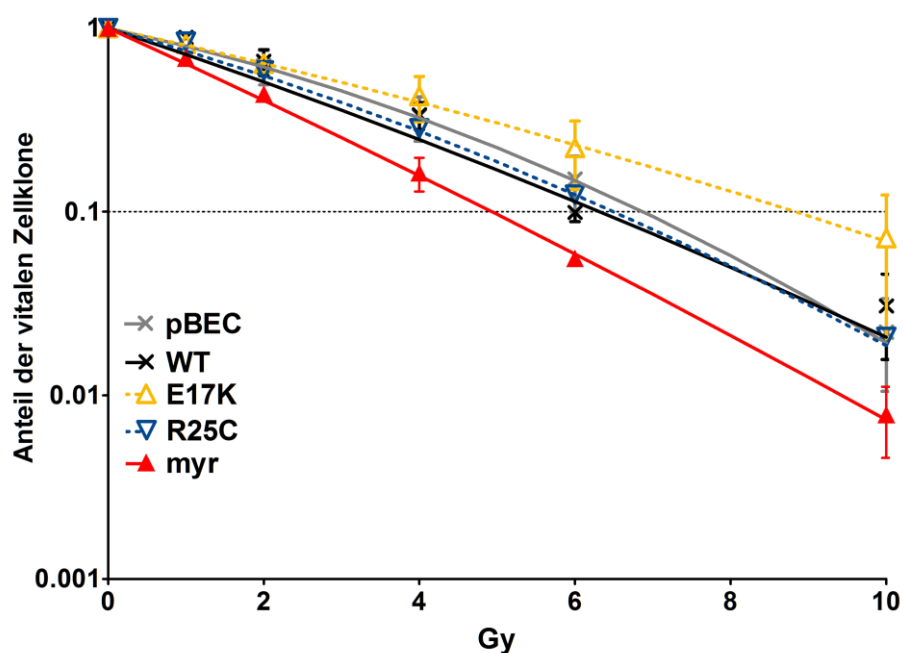


Abb. 4.4.3-1 Koloniebildungs-Assay des TrC1 PH-Domänen-Sets mit steigender IR-Dosis

Für den Koloniebildungs-Assay wurden Zellen abhängig von der Dosis auf einer 6-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass sich im Schnitt 50 Kolonien bilden konnten. Die Zellen wurden 4 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die Zellen wurden mit 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen für 10 Tage kultiviert. Die Zellen wurden in 3,7% Formaldehyd und 70% Ethanol fixiert und anschließend mit 0,05% Coomassie blue gefärbt. Ab 50 Zellen pro Kolonie wurde diese als solche gezählt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$.

Im Koloniebildungs-Assay des Kinase-Domänen-Sets (vgl. Abb. 4.4.3-2) zeigte TrC1 R25C eine ähnliche Überlebensfraktion wie die beiden Kontrollen TrC1 pBEC und TrC1 WT. In allen drei Fällen war eine Dosis von ca. 6 Gy nötig um 90% der Zellen an der Koloniebildung zu hindern. Die effektive Dosis für TrC1 TDS lag bei knappen 8 Gy, womit diese Zelllinie neben TrC1 E17K ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber IR im Langzeitüberleben aufwies (siehe Abb. 4.4.3-1 und Abb. 4.4.3-2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Varianten TrC1 E17K und TrC1 TDS mit vermuteter erhöhter Aktivität, wie auch schon in den Kurzzeit-Überlebens-Assays sowie den Apoptose und Zelltod Assays, eine höhere Resistenz gegenüber Bestrahlung aufwies. So wurde die Proliferation und die Einleitung des Zelltods nach Bestrahlung weniger gehemmt. Dies korreliert mit der erhöhten Dosis die im Koloniebildungs-Assay nötig war um 90% der Zellen zu inaktivieren. Die Koloniebildungs-Assays zeigten bei der hochaktivierten TrC1 myr bereits bei 4 Gy deutlich verringertes Überleben.

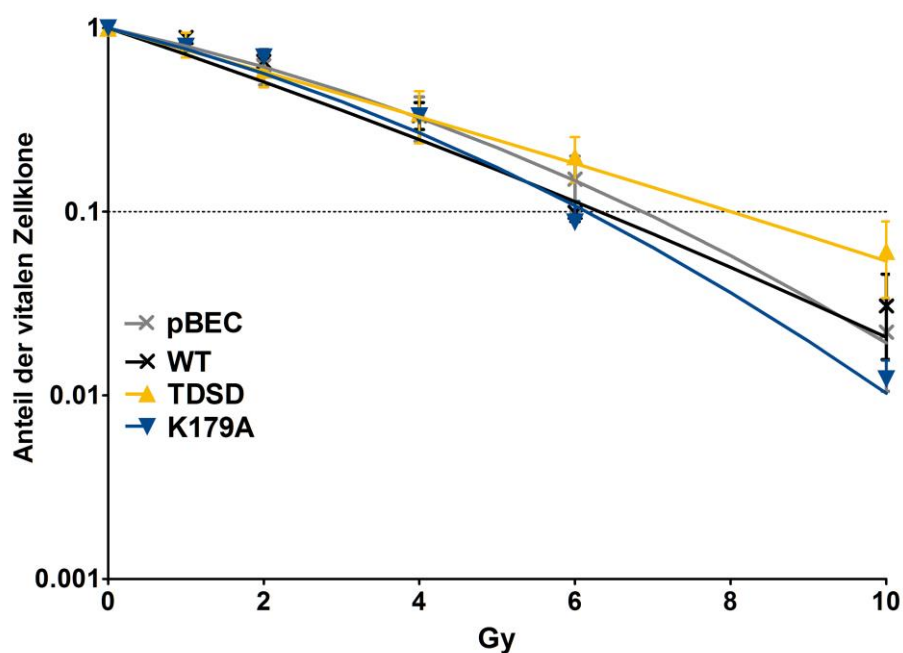


Abb. 4.4.3-2 Koloniebildungs-Assay des TrC1 Kinase-Domänen-Sets mit steigender IR-Dosis

Für den Koloniebildungs-Assay wurden Zellen abhängig von der Dosis auf einer 6-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass sich im Schnitt 50 Kolonien bilden konnten. Die Zellen wurden 4 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 TDS und TrC1 K179A. Die Zellen wurden mit 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen für 10 Tage kultiviert. Die Zellen wurden in 3,7% Formaldehyd und 70% Ethanol fixiert und anschließend mit 0,05% Coomassie blue gefärbt. Ab 50 Zellen pro Kolonie wurde diese als solche gezählt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$.

4.4.4 Phosphorylierung der Akt1-Mutanten nach Bestrahlung

Um einen Einblick in die Bedeutung der Phosphorylierung und damit der direkten Aktivierung von Akt1 nach Bestrahlung zu erlangen, wurden in weiteren Untersuchungen Western Blot-Analysen zur Verifizierung der Veränderungen der Phosphorylierung der Akt1-Mutanten nach IR mit 5 Gy beobachtet. Zunächst wurde das TrC1-Set getestet.

In Abb. 4.4.4-1 sind die Western Blot-Analysen der TrC1 zusammengefasst. Als Positivkontrolle für die Bestrahlung wurde ein Antikörper gegen phosphoryliertes H2.AX genutzt. Akt1-E17K und myrAkt1 wiesen leicht erhöhte Phosphorylierung am S473 nach Bestrahlung auf. Keinen Einfluss bzw. eine leichte Verringerung zeigte sich hingegen auf die Phosphorylierung des T308 nach IR. Wie in den vorangegangenen Experimenten zeigte sich bei Akt1-WT kaum eine Phosphorylierung der Stellen T308 und S473. Dies änderte sich nach Bestrahlung nicht.

4 Ergebnisse

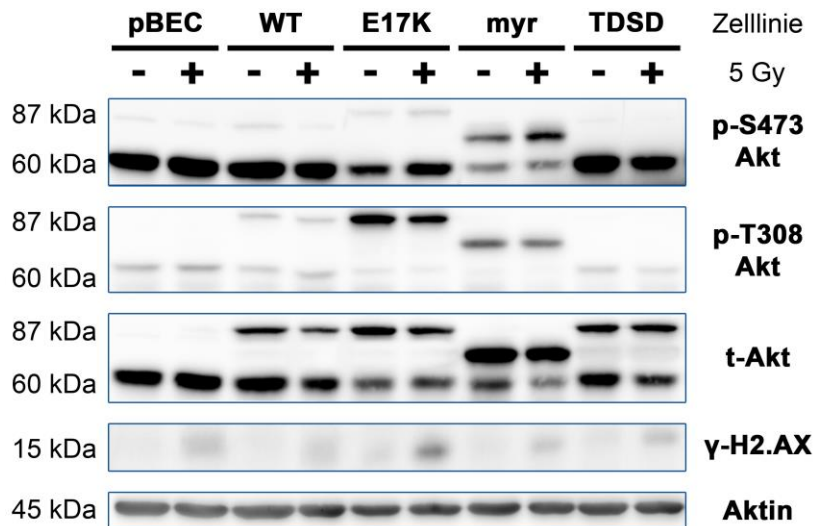


Abb. 4.4.4-1 Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden TrC1 nach IR

Für die Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen wurden pro Spur 20 µg Protein aus Vollzelllysaten der jeweiligen Zellen aufgetragen. Die Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt. Die Western Blot-Membranen wurden mit Antikörpern gegen Aktin als Ladekontrolle, γ-H2.AX als Nachweis von Bestrahlungsschäden, Akt insgesamt (t-Akt) und die jeweiligen phosphorylierten Varianten am Threonin 308 (p-T308) und Serin 473 (p-S473). Dies wurde für die Akt1-exprimierenden Varianten der TrC1 durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde mit einem FUSION Solo in einem 16-bit Graustufenbild aufgenommen und der Fusion Software erstellt.

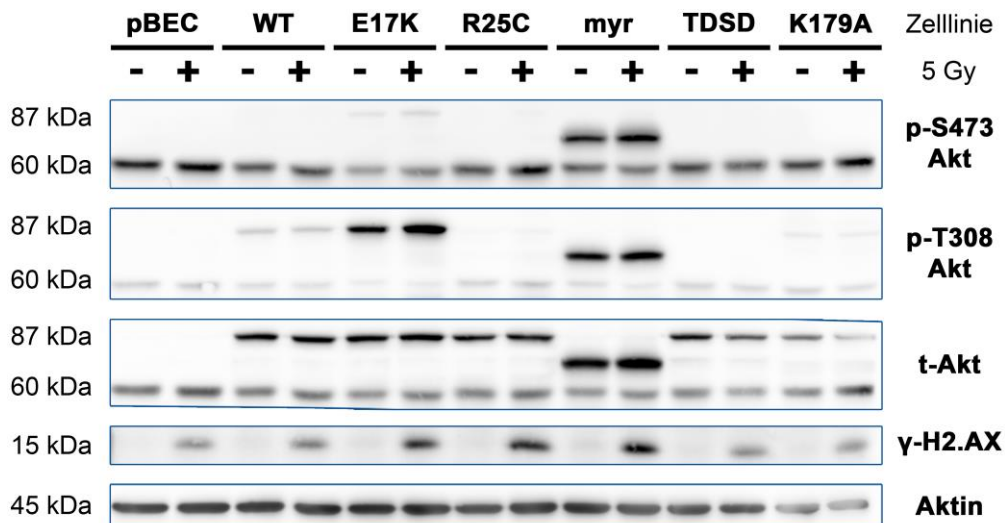


Abb. 4.4.4-2 Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden MEF -/- nach IR

Für die Western Blot-Analyse der Lysate der Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen wurden pro Spur 20 µg Protein aus Vollzelllysaten der jeweiligen Zellen aufgetragen. Die Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt. Die Western Blot-Membranen wurden mit Antikörpern gegen Aktin als Ladekontrolle, γ-H2.AX als Nachweis von Bestrahlungsschäden, Akt insgesamt (t-Akt) und die jeweiligen phosphorylierten Varianten am Threonin 308 (p-T308) und Serin 473 (p-S473). Dies wurde für die Akt1-exprimierenden Varianten der MEF -/- durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde mit einem FUSION Solo in einem 16-bit Graustufenbild aufgenommen und der Fusion Software erstellt.

In Abb. 4.4.4-2 sind die Western Blot-Analysen der MEF $-/-$ nach Bestrahlung dargestellt. Akt1-E17K und myrAkt1 wiesen auch in den MEF $-/-$ leicht erhöhte Phosphorylierung am S473 nach Bestrahlung auf. Keinen Einfluss bzw. eine leichte Verringerung zeigte sich hingegen auf die Phosphorylierung des T308 nach IR. Wie in den Western Blot-Analysen ohne IR, zeigte sich bei Akt1-WT kaum eine Phosphorylierung der Stellen T308 und S473. Dies änderte sich nach Bestrahlung nicht. Auch hier wurde als positiv Kontrolle für die Bestrahlung ein Antikörper gegen phosphoryliertes H2.AX genutzt.

4.4.5 Inhibition der Akt1-Mutanten und Folgen für das Überleben nach IR

Um zu untersuchen, ob der Effekt der Akt1-Mutanten auf das Überleben nach Bestrahlung pharmakologisch reversibel war, wurden Koloniebildungs-Assays mit den Akt-Inhibitoren MK-2206 oder GDC0068 durchgeführt. Bei MK-2206 handelt es sich um einen allosterischen Akt-Inhibitor. Diese Art von Inhibitoren hemmen die Lokalisation an der Membran und damit die Aktivierung von Akt, indem die PH-Domäne mit der Kinase-Domäne verbunden wird. Dies hemmt die Koordination von PIP_3 . GDC0068 hingegen ist ein kompetitiver Akt-Inhibitor, der die ATP-Bindestelle und somit die Kinaseaktivität direkt blockiert, aber keinen Einfluss auf die Rekrutierung zu der Membran haben sollte.

Die folgende Abbildung (Abb.4.4.5-1) zeigt die TrC1 WT als Überexpressionskontrolle jeweils mit und ohne Inhibitor. In jeder Abbildung sind die bestrahlten Überlebens-tests ohne Inhibitor verglichen mit je einem der beiden Inhibitoren. Aus Übersichtsgründen wurde die TrC1 pBEC Kontrolle nicht abgebildet. Diese zeigte in allen Tests einen leicht reduzierten parallelen Verlauf zu TrC1 WT. In Abbildung A sind die Werte der Koloniebildungs-Assays der TrC1 WT, TrC1 E17K, TrC1 myr und TrC1 TDSD ohne Inhibitor nochmals abgebildet. Wie bereits beschrieben zeigte TrC1 E17K und TrC1 TDSD eine erhöhte Radioresistenz. TrC1 myr hingegen eine stärkere Radiosensitivität im Vergleich zu TrC1 WT. Die Behandlung mit beiden Akt-Inhibitoren verschlechterte im Vergleich zu diesem Experiment das Überleben aller Ziellinien. Zusätzlich zu diesem Effekt zeigte sich eine Annäherung aller Kurven sowohl bei MK-2206- (B) als auch GDC0068-Nutzung (C). So verloren die TrC1 E17K und TrC1 TDSD ihre erhöhte Radioresistenz.

4 Ergebnisse

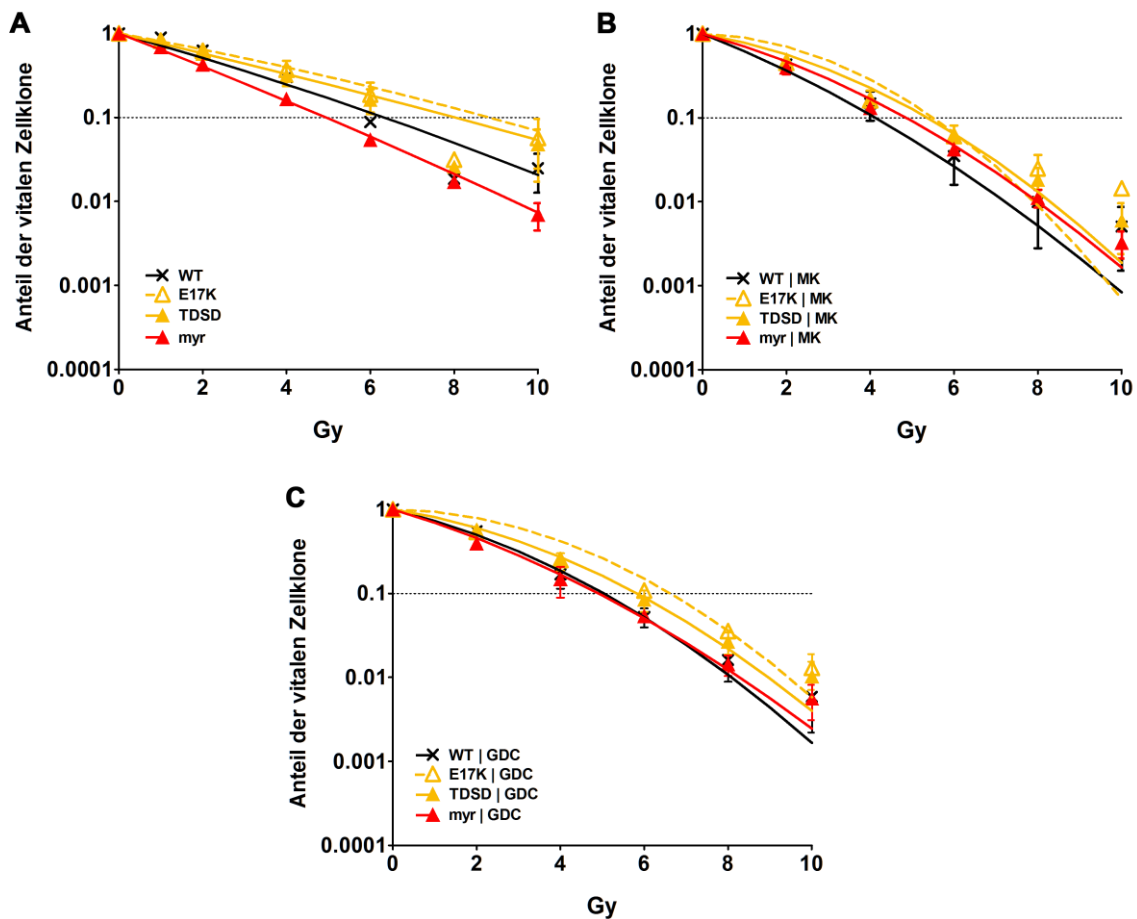


Abb. 4.4.5-1 Koloniebildungs-Assay der aktivierenden Mutanten mit Akt-Inhibitor MK-2206 und IR

Für den Koloniebildungs-Assay wurden Zellen abhängig von der Dosis auf einer 6-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass sich im Schnitt 50 Kolonien bilden konnten. Die Zellen wurden 4 h nach der Aussaat mit 2 μ M MK-2206 (B) oder 2 μ M GDC0068 behandelt und nach weiteren 2 h bestrahlt. Am nächsten Tag wurde der Inhibitor durch einen Mediumwechsel entfernt. Die Ergebnisse des Koloniebildungs-Assay der TrC1 ohne Inhibitor wurden zum Vergleich mit abgebildet (A). TrC1 WT wurde als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die Zellen wurden mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen für 10 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in 3.7% Formaldehyd und 70% Ethanol fixiert und anschließend mit 0.05% Coomassie blue gefärbt. Ab 50 Zellen pro Kolonie wurde diese als solche gezählt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3.

4.5 Effekte der Akt1-Mutationen auf die DNA-Reparatur

4.5.1 Focinator – Programmierung einer Auswertesoftware für Foci von DNA-Schäden

Die Analysen in 4.4 (Akt1-bedingte Modulation der zellulären Antwort auf IR S.104) hatten gezeigt, dass die Akt1-Varianten E17K und TDSO die Radiosensitivität von TrC1 und MEF -/- reduzieren. Daher wurde im nächsten Schritt analysiert, ob die Änderung der Radiosensitivität möglicherweise durch eine Veränderung der Kinetik und oder Effektivität der DNA-Reparatur einhergeht. Um die Bildung und die Verarbeitung von DNA-Schaden und DNA-Reparatur-Kinetiken mit und ohne Bestrahlung bewerten zu können wurden fluoreszenzmarkierte Protein-Foci oder Phospho-Protein-Foci im Zellkern unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurden γ -H2.AX Antikörper als Marker für DNA-Schädigung genutzt.

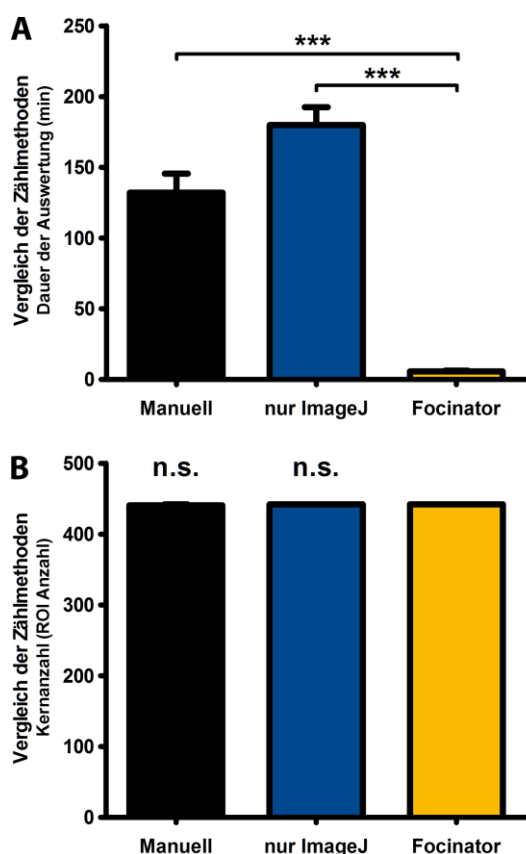


Abb. 4.5.1-1 Vergleich der Quantifizierungsmethoden von Foci in TrC1 nach 3 Gy Bestrahlung

Für den Vergleich der unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden, der manuellen Foci-Zählung zu ImageJ-basierter Auswertung und Focinator-Zählung wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 2, 4, 6, 8 sowie 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte die Färbung der DNA mit Hoechst33342. Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Die erstellten Fluoreszenzbilder wurden daraufhin mit jeder der Zählmethoden ausgewertet. (A) Direkter Vergleich der benötigten Auswertezeit der verschiedenen Quantifizierungsmethoden in Minuten pro Testset bestehend aus 439 Kernen in 35 Bildern mit verschiedenen Foci-Anzahlen pro Kern.

(B) Vergleich der erkannten Anzahl an Zellkernen mit den verschiedenen Quantifizierungsmethoden

Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf die Auswertung via Focinator bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei *** p < 0,001.

Die neu entwickelte Auswertungsmethode ermöglichte es, die großen Mengen an Foci-Fluoreszenzbildern automatisch, schnell, objektiv und reproduzierbar auszuwerten

(Oeck *et al.*, 2015). Die Verwendung des Focinators wurde mit γ -H2.AX Foci in TrC1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 0,5-3 Gray (Gy) getestet. Zusätzlich wurden Messungen von Nutzern mit unterschiedlichen Hintergründen und Erfahrungen durchgeführt. Die Nutzung des Focinators reduzierte die Auszählzeit im Vergleich zu ImageJ-basierter Zählung und manueller Auswertung. TrC1-Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit anti- γ -H2.AX gefärbt und ausgewertet. Durch die Verarbeitung von 35 Mehrkanal-Bildern wurden 439 Kerne analysiert. Der Focinator reduziert die Analysezeit von $132,07 \pm 13,44$ Minuten für die manuelle Analyse um einen Faktor von etwa 23 auf $5,61 \pm 0,67$ Minuten mit dem Focinator. (vgl. Abb. 4.5.1-1 A) Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Erfassung der Kerne zwischen beiden ImageJ-basierten Verfahren mit 442 ± 0 Kernen insgesamt, im Vergleich zur manuellen Zählung mit $440,7 \pm 1,53$ Kernen. (vgl. Abb. 4.5.1-1 B)

4.5.2 Effekte der Akt1-Mutationen auf die Reparatur-Kinetiken von DNA-Schäden (γ -H2.AX-Assay)

Zur Untersuchung von DNA-Reparaturkinetiken der generierten Akt1-Varianten nach Bestrahlung wurden die Zellen nach Behandlung mit 3 Gy untersucht. Dies wurde unter Verwendung eines γ -H2.AX-Assays im Zeitverlauf nach 30 min, 2, 4, 6, sowie 24 h durchgeführt. Die Ergebnisse vergleichen die TrC1 und MEF $-/-$ Zellen sowie die PH-Domänen und Kinase-Domänen-Mutationen.

Alle Zellvarianten der PH-Domänen-Mutationen der TrC1 wiesen nach 30 min die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci als Korrelat für DSB auf. Angegeben wurden die Ergebnisse in dem prozentuellen Anteil der bei 30 min der jeweiligen Zelllinie quantifizierten Foci pro Zellkern. Im Verlauf fand eine Reduktion der DSB in verschiedener Geschwindigkeit mit unterschiedlichen Abstufungen abhängig von der jeweiligen Mutation statt. Nach 24 h nach der Bestrahlung waren bei allen Mutationen nahezu keine γ -H2.AX-Foci mehr nachweisbar. (vgl. Abb. 4.5.2-1)

4 Ergebnisse

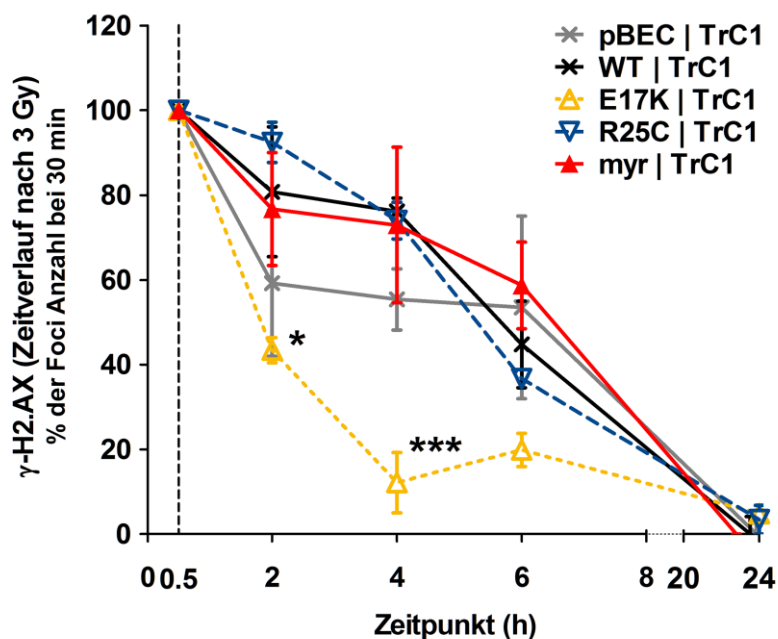


Abb. 4.5.2-1 γ -H2.AX-Assay der TrC1 PH-Domänen-Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy

Für den γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Platte auf ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle und TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der bei 30 min der jeweiligen Zelllinie quantifizierten Foci pro Kern der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 2, 4, 6, sowie 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung der DNA mit Hoechst33342, die Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Es folgte eine Quantifizierung der sich im Fluoreszenzmikroskop ergebenden Foci mit dem Focinator. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

TrC1 pBEC wies nach einer anfänglich langsamen Phase bis 2 h nach Bestrahlung eine moderate Reduktion der Foci auf; dagegen war die Geschwindigkeit der Abnahme der Foci zwischen 4 und 6 h maximal ausgeprägt. Hingegen zeigte die Mutation TrC1 WT eine anfänglich schnellere Reparatur bis 2 h nach Bestrahlung, um dann in eine langsamere Phase überzugehen. So war bei 2 h nach Bestrahlung TrC1 WT über 10% unterhalb der Werte des TrC1 pBEC und nach 4 h annähernd parallel zu pBEC. TrC1 myr wies einen ähnlichen Verlauf wie die TrC1 WT Kontrolle auf. Bis auf eine leicht erhöhte Anzahl bei 2 h verlief TrC1 R25C wie der TrC1 WT. Im Gegensatz zu der Kontrolle und zu allen anderen Varianten wies TrC1 E17K ab dem 2 h Zeitpunkt eine signifikant erniedrigte Foci-Anzahl auf. Insbesondere nach 4 h war die Anzahl der Foci bereits auf 10% der Werte bei 30 min reduziert, wohingegen die Kontrolle noch 80% aufwies.

4 Ergebnisse

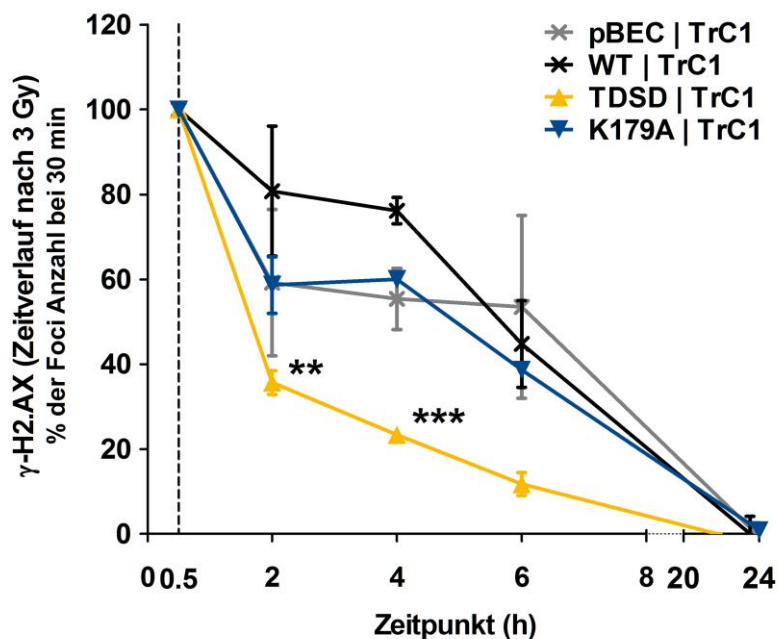


Abb. 4.5.2-2 γ -H2.AX-Assay der TrC1 Kinase-Domänen-Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy

Für den γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well Platte auf ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der bei 30 min der jeweiligen Zelllinie quantifizierten Foci pro Kern der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten exprimierenden TrC1 TDS sowie TrC1 K179A. Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 2, 4, 6, sowie 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung der DNA mit Hoechst33342 und die Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Es folgte eine Quantifizierung der sich im Fluoreszenzmikroskop ergebenden Foci mit dem Focinator. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Im Vergleich des Effektes von Bestrahlung auf die Mutanten der Kinase Domäne bei den TrC1 zeigte TrC1 TDS eine signifikant erniedrigte Anzahl an γ -H2.AX-Foci bei 2 und 4 h. TrC1 K179A verhielt sich ähnlich wie TrC1 pBEC (vgl. Abb. 4.5.2-2). Diese Experimente wurden auch bei einer Initialen Dosis von 0,5 Gy und 1,5 Gy durchgeführt. Beide Experimente zeigten ähnliche Tendenzen. Allerdings war die Signifikanz der beschleunigten Reparatur erst bei erhöhtem DNA-Schaden vorhanden. Höhere Dosen wurden mit 5 Gy einmalig in diesen Zellen getestet. Diese zeigten aber eine zu große Überlagerung der Foci und wurden nicht weiter für dieses Assay genutzt.

4 Ergebnisse

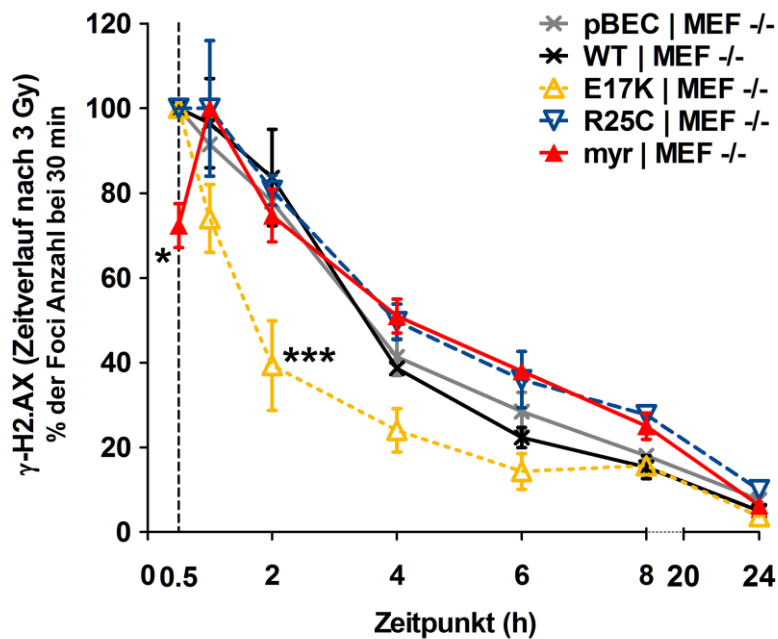


Abb. 4.5.2-3 γ -H2.AX-Assay der MEF Akt1 PH-Domänen Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy

Für den γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. MEF pBEC wurde als Transduktionskontrolle, MEF WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der bei 30 min der jeweiligen Zelllinie quantifizierten Foci pro Kern der MEF WT mit den Werten der Akt1-Mutanten exprimierenden MEF E17K, MEF R25C sowie MEF myr. Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 sowie 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung der DNA mit Hoechst33342 und die Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Es folgte eine Quantifizierung der sich im Fluoreszenzmikroskop ergebenden Foci mit dem Focinator. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf MEF WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Um die Relevanz der Ergebnisse zu überprüfen wurden analoge Untersuchungen zum Einfluss der Akt1-Varianten auf die Kinetik der DNA-Reparatur in MEF -/- Zellen nach Bestrahlung mit 3 Gy durchgeführt. Die MEF -/- Zellen wurden untersucht, um den Einfluss der Akt1-Mutanten auf die DSB-Reparaturkinetiken zu beurteilen, ohne eine Verfälschung durch endogenes Akt1. Dies wurde unter Verwendung eines γ -H2.AX-Assays im Zeitverlauf nach 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 sowie 24 h durchgeführt. Fast alle Zellvarianten der PH-Domänen-Mutationen der MEF -/- wiesen nach 30 min die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci auf. Es fand eine Reduktion der γ -H2.AX-Foci-Anzahl im Zeitverlauf bei allen Zelllinien statt, sodass nach 24 h nach Bestrahlung nahezu alle γ -H2.AX-Foci verschwunden waren. (vgl. Abb. 4.5.2-3)

4 Ergebnisse

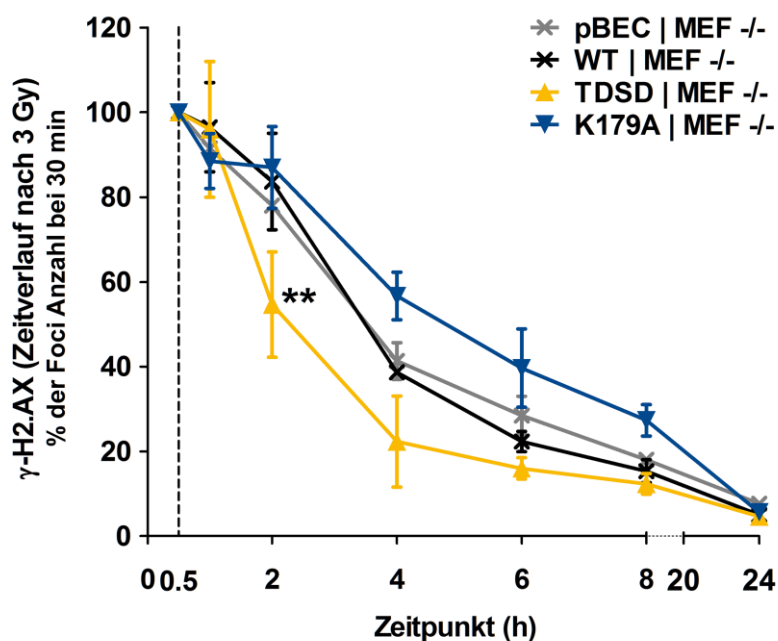


Abb. 4.5.2-4 γ -H2.AX-Assay der Akt1 Kinase-Domänen Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy

Für den γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well Platte auf ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. MEF -/- pBEC wurde als Transduktionskontrolle, MEF -/- WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der bei 30 min der jeweiligen Zelllinie quantifizierten Foci pro Kern der MEF -/- WT mit den Werten der Akt1-Mutanten exprimierenden MEF -/- TDSB sowie MEF -/- K179A. Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 sowie 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung der DNA mit Hoechst33342 und die Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Es folgte eine Quantifizierung der sich im Fluoreszenzmikroskop ergebenden Foci mit dem Focinator. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf MEF -/- WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei ** $p < 0,01$.

Wie bei den TrC1 wiesen MEF -/- pBEC und MEF -/- WT eine gleich ausgeprägte Veränderung der γ -H2.AX-Foci-Anzahl, jedoch waren die Werte im Gegensatz zu den TrC1-Varianten zwischen vier und sechs Stunden niedriger. MEF -/- E17K wies ebenso wie bei TrC1 eine signifikant niedrigere Foci-Anzahl auf, besonders nach 2 h. MEF -/- R25C war wiederum vergleichbar in der Anzahl der Foci im Zeitverlauf zu der Kontrolle. Im Gegensatz hierzu zeigte MEF -/- myr eine Ausnahme. MEF -/- myr entwickelte die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci erst nach einer Stunde, somit war der Wert bei 30 min im Vergleich zu den anderen Varianten mit lediglich 70% Foci signifikant erniedrigt. Deswegen wurde für MEF -/- myr die Normierung und die Berechnung des prozentualen Anteils an γ -H2.AX-Foci im weiteren Verlauf mit dem Wert bei einer Stunde durchgeführt. Die weitere Foci-Entwicklung verlief wie bei der Kontrolle.

Die Effekte von Bestrahlung auf die Mutanten der Kinase-Domäne bei den MEF $-/-$, wiesen ebenso wie bei den TrC1 TDSO eine erniedrigte Anzahl an γ -H2.AX-Foci nach 2 h nach Bestrahlung auf. MEF $-/-$ K179A verhielt sich ähnlich wie die Kontrolle. (Abb. 4.5.2-4)

Fasst man die Effekte der verschiedenen Mutationsvarianten nach Bestrahlung zusammen, kann man erkennen, dass alle Zellvarianten der PH-Domänen-Mutationen der TrC1 nach 30 min die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci aufwiesen. 24 h nach Bestrahlung waren bei allen Mutationen nahezu alle γ -H2.AX-Foci verschwunden.

TrC1 pBEC, TrC1 myr, TrC1 K179A und TrC1 R25C hatten ähnliche Verläufe der Foci-Anzahl wie die Kontrolle, TrC1 WT. Im Gegensatz zu der Kontrolle und zu allen anderen Varianten wies TrC1 E17K eine signifikant erniedrigte Anzahl an γ -H2.AX-Foci auf. Ebenso hatte TrC1 TDSO eine signifikant erniedrigte Anzahl an γ -H2.AX-Foci. Die MEF $-/-$ Varianten wiesen insgesamt eine niedrigere Anzahl an Foci auf im Vergleich zu den TrC1 Variante. Wie bei den TrC1 Mutanten hatten MEF $-/-$ pBEC, MEF $-/-$ R25C, MEF $-/-$ K179A ähnliche Foci-Anzahl-Entwicklungen zu den verschiedenen Zeitpunkten wie MEF $-/-$ WT. Ebenso zeigte sich bei MEF $-/-$ E17K und MEF $-/-$ TDSO eine signifikant niedrigere Foci-Anzahl. Im Gegensatz hierzu zeigte MEF $-/-$ myr jedoch eine Ausnahme, diese Variante entwickelte die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci erst nach einer Stunde.

4.5.3 Effekte der Akt1-Mutationen auf DNA-DSB-Reparatur im direkten DNA-Schaden Assay (neutrales Comet Assay)

Die Ergebnisse von Abschnitt 4.5.2 (Effekte der Akt1-Mutationen auf die Reparatur-Kinetiken von DNA-Schäden (γ -H2.AX-Assay) S.115) deuteten darauf hin, dass unterschiedliche Kinetiken der DNA-Reparatur abliefen. Um die Effekte der Akt1-Mutationen auf DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung im direkten DNA-Schadens-Assay zu untersuchen, wurde der neutrale Comet Assay verwendet. Die Zellen wurden mit 0 Gy oder 40 Gy bestrahlt und 30 min, 4 h und 24 h danach die entstandenen Kometenschweife untersucht. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden die Resultate der TrC1 mit Expression der verschiedenen Akt1-Varianten untereinander und zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen (vgl. Abb. 4.5.3-1). Vor Bestrahlung (vgl. Abb. 4.5.3-1 A) zeigten alle TrC1-Ausgangswerte der Flächen der Kometenschweife zwischen TrC1 pBEC mit Mittelwerten von 8830 und TrC1 E17K als Mutante mit der höchsten mittleren Pixelanzahl (px) von 11.517. Die Pixelanzahl der Kometen stellt eine Surrogatvariable für die DNA-DSB-Anzahl dar. Nach 30-minütiger Bestrahlung (vgl. Abb. 4.5.3-1 B) veränderten sich die Werte und differierten bezüglich der verschiedenen Mutanten. Die Werte stiegen auf gemittelt 32.780 px bei TrC1 pBEC mit der höchsten Fläche, somit der höchsten Anzahl an DSB.

4 Ergebnisse

TrC1 WT, die Kontrolle, wies ähnliche Flächen wie TrC1 pBEC auf. Hingegen zeigte sich bei TrC1 E17K signifikant die niedrigste Kometenschweiffläche mit 25.223 px im Mittel. Dies entsprach der niedrigsten Anzahl der DSB. TrC1 myr und TrC1 TDSD hatten Kometenschweife wie die Kontrolle.

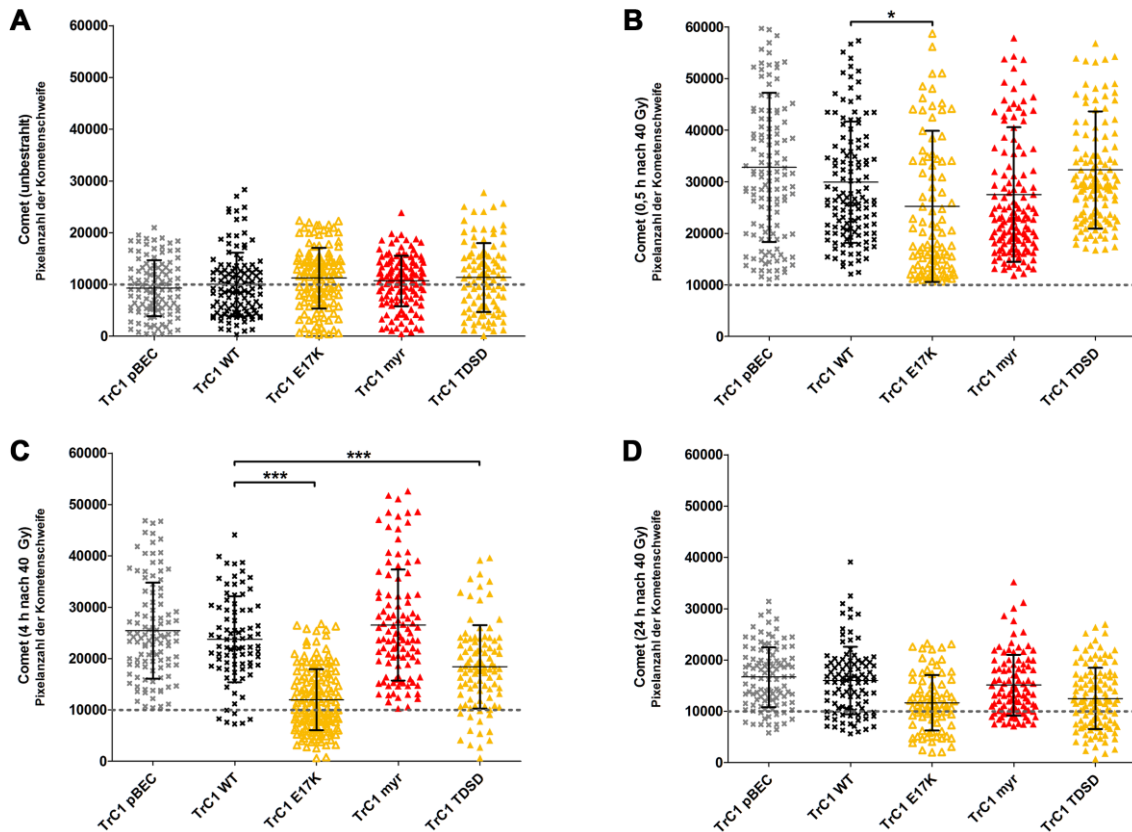


Abb. 4.5.3-1 Neutraler Comet Assay der Akt1-Varianten in TrC1 nach 40 Gy

Der neutrale Comet Assay wurde ohne Bestrahlung (A) sowie 30 min (B), 4 h (C) und 24 h (D) nach 40 Gy durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 200.000 Zellen pro 3 mL in DMEM10% in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. Die Zellen wurden mit 40 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 4 sowie 24 h wurden die Zellen in Agarose fixiert, neutral lysiert und permeabilisiert. Es folgte die DNA-Färbung auf Objektträgern mit 60 μ L Propidiumiodid (50 μ g/mL, in A. dest). Eine quantitative Evaluation der unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografierten Kometenschweife wurde mit der Software OpenComet und ImageJ durchgeführt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurden die Flächen der Kometenschweife in px. Die gestrichelte Linie verdeutlichte in allen Graphen den Wert des unbestrahlten TrC1 WT. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Nach 4 h entwickelten sich bei allen Zellvarianten niedrigere Pixelanzahlen der Kometenschweife (C). TrC1 pBEC hatte ähnliche Werte aufzuweisen wie der TrC1 WT mit Mittelwerten von 23.700 px. Eine signifikante Verminderung zeigte hingegen TrC1 E17K mit mittleren Werten von 12.000 px. Die Anzahl der DNA-DSB war bei TrC1 myr wiederum

4 Ergebnisse

vergleichbar ausgeprägt wie bei TrC1 WT, jedoch hatten die Mutanten zu diesem Zeitpunkt eine breite Streuung. TrC1 TDSD zeigte im Mittel 19.000 px.

Abbildung 4.5.3-2 zeigt exemplarisch je ein Bild der Zelllinien TrC1 WT, TrC1 E17K, TrC1 TDSD und TrC1 myr. Diese Bilder stellen die Formung der Kometenschweife und deren Analyse mittels der Software OpenComet 4 h nach 40 Gy dar. Die Abbildungen verdeutlichen die Unterschiede der jeweiligen Zelllinien zueinander. Es ist erkennbar, dass TrC1 E17K und TrC1 TDSD im Vergleich zu TrC1 WT und TrC1 myr deutlich geringere Kometenflächen besitzen. Dies verdeutlicht die Ergebnisse aus Abb. 4.5.3-1 C.

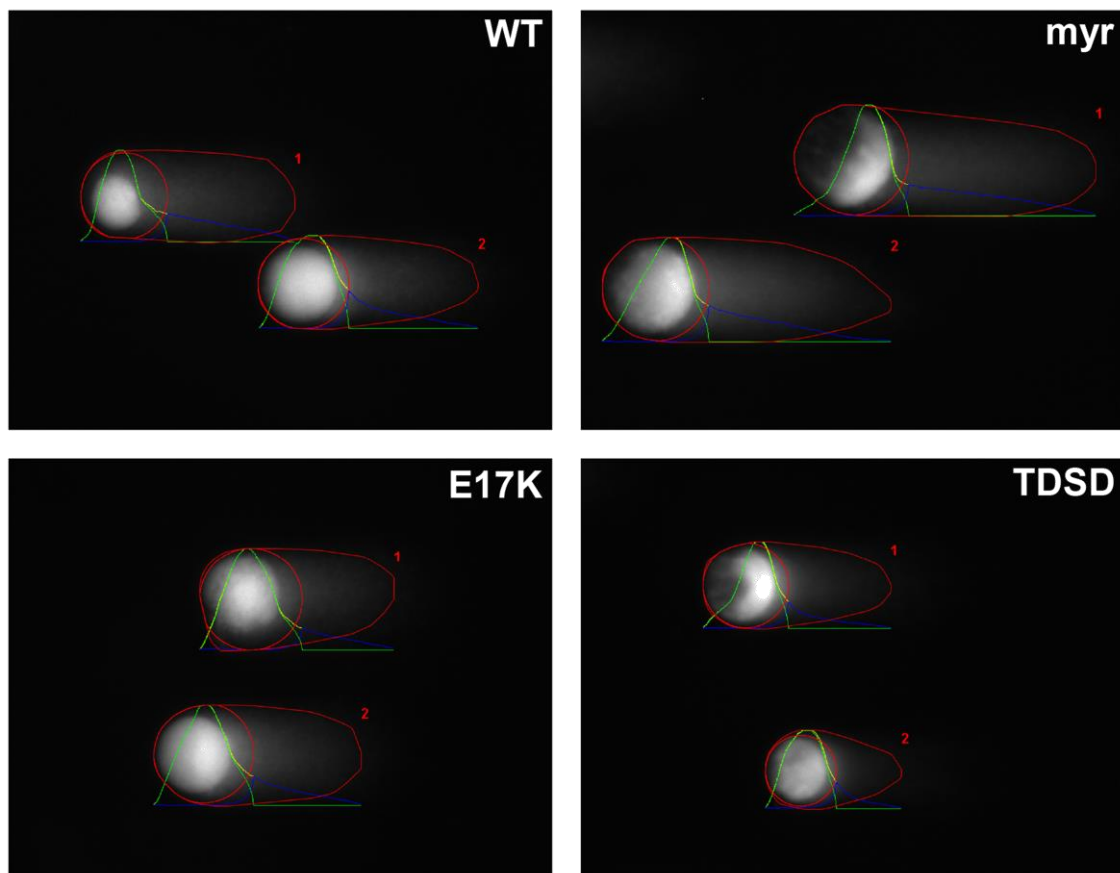


Abb. 4.5.3-2 Neutraler Comet Assay mit Auswertung der Akt1-Varianten in TrC1 nach 4 h nach 40 Gy

Der neutrale Comet Assay wird 4 h 40 Gy Bestrahlung dargestellt. Hierzu wurden jeweils 200.000 Zellen pro 3 mL in DMEM10% in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. Die Zellen wurden mit 40 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 4 sowie 24 h wurden die Zellen in Agarose fixiert, neutral lysiert und permeabilisiert. Es folgte die DNA-Färbung auf Objektträgern mit 60 μ L Propidiumiodid (50 μ g/mL, in A. dest). Eine quantitative Evaluation der unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografierten Kometenschweife wurde mit der Software OpenComet und ImageJ durchgeführt. Verglichen wurden die Flächen der Kometenschweife in px. Exemplarisch ist je ein Bild der Zelllinien TrC1 WT, TrC1 E17K, TrC1 TDSD und TrC1 myr mit überlagerten Auswertemasken des OpenComet in rot zu erkennen

4 Ergebnisse

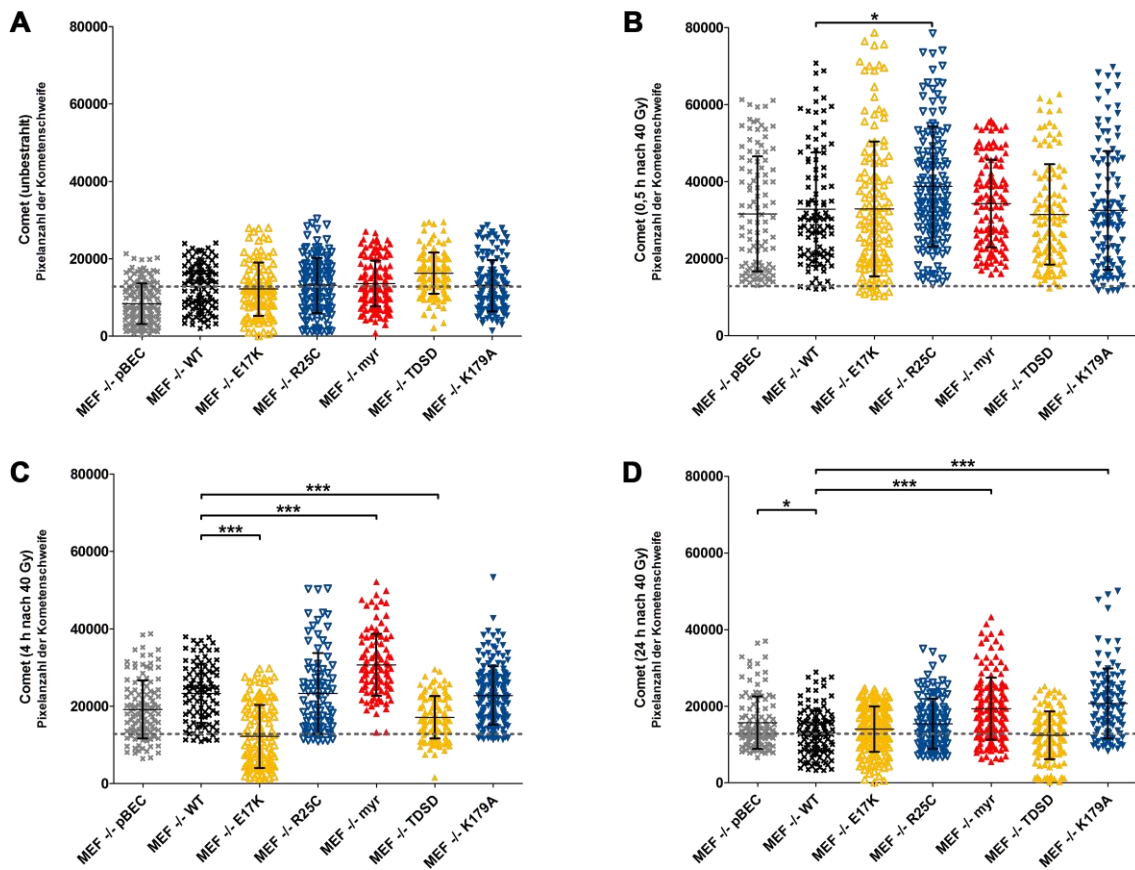


Abb. 4.5.3-3 Neutraler Comet Assay der Akt1-Varianten in MEF -/- nach 40 Gy

Der neutrale Comet Assay wurde ohne Bestrahlung (A) sowie 30 min (B), 4 h (C) und 24 h (D) nach 40 Gy durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 200.000 Zellen pro 3 mL in DMEM10% in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat bestrahlt. Die Zellen wurden mit 40 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 30 min, 4 sowie 24 h wurden die Zellen in Agarose fixiert, neutral lysiert und permeabilisiert. Es folgte die DNA-Färbung auf Objektträgern mit 60 μ L Propidiumiodid (50 μ g/mL, in A. dest). Eine quantitative Evaluation der unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografierten Kometenschweife wurde mit der Software OpenComet und ImageJ durchgeführt. MEF -/- pBEC wurde als Transduktionskontrolle, MEF -/- WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurden die Flächen der Kometenschweife in Pixeln. Die gestrichelte Linie verdeutlichte in allen Graphen den Wert des unbestrahlten MEF -/- WT. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf MEF -/- WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Nach 24 h setzte eine nahezu vollständig Reparatur der DNA-DSB aller Mutanten ein (D). Die Werte der Kometenflächen lagen bei allen Mutanten etwas höher als ohne Bestrahlung, jedoch waren die Pixelanzahlen aller Akt1-Varianten gleichmäßig vermindert. So hatte TrC1 pBEC die höchsten Mittelwerte mit 16.200 px und die niedrigsten Werte bei TrC1 E17K, mit 11.200 px im Mittel.

Zur Überprüfung der Effekte wurden wiederum analoge Untersuchungen in den MEF -/- Zellen (vgl. Abb. 4.5.3-3). Ohne Bestrahlung hatten alle Zellvarianten vergleichbare Ausgangswerte an Pixeln. (vgl. Abb. 4.5.3-3 A) Die niedrigsten Werte wiesen mit Mittel die

4 Ergebnisse

MEF $-/-$ pBEC mit 7.900 px und die höchsten MEF $-/-$ TDSB mit 16.800 px auf. Nach Behandlung mit 40 Gy entwickelten sich vermehrte Pixelanzahlen der Kometenschweife als Zeichen von DNA-DSB. Bei 30 min entwickelten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Akt1-Varianten. MEF $-/-$ pBEC wies hierbei signifikant die niedrigsten mittleren Pixelwerte mit 26.000 pxm, entsprechend der niedrigsten Anzahlen an DSB, auf im Vergleich zu MEF $-/-$ WT mit 32.000 px im Mittel. (vgl. Abb. 4.5.3-3 B) Die Variante MEF $-/-$ E17K zeigte eine mit der Kontrolle vergleichbare Entwicklung, im Gegensatz zu TrC1 E17K, die bereits geringere Kometenschweifflächen bei 30 min hatte. MEF $-/-$ R25C hatte die signifikant niedrigsten Mittelwerte, DSB, nach 30 min mit 38.200 px. MEF $-/-$ myr, MEF $-/-$ TDSB und MEF $-/-$ K179A erreichten eine ähnliche Anzahl an Pixeln wie MEF $-/-$ WT.

Nach einer vierstündigen Reparaturzeit nach Bestrahlung waren bei allen Varianten weniger DNA-DSB zu erkennen. (vgl. Abb. 4.5.3-3 C) MEF $-/-$ pBEC und MEF $-/-$ WT mit einer mittleren Pixelanzahl von 23.800 px zeigten gleiche Entwicklungen, MEF $-/-$ E17K signifikant weniger große Kometenschweifflächen mit im Mittel 11.600 px, somit die niedrigste Anzahl an DSB.

Die Werte von MEF $-/-$ R25C wichen leicht von den Kontrollwerten ab, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Kaum Abnahme der DNA-DSB war bei MEF $-/-$ myr zu erkennen, die signifikant vom MEF $-/-$ WT abwichen. Eine signifikant beschleunigte Reparatur war ebenso bei MEF $-/-$ TDSB mit Mittelwerten von 17.000 px zu sehen. MEF $-/-$ K179A zeigte keine Abweichungen zu MEF $-/-$ WT.

Während die TrC1 keine signifikanten Unterschiede nach 24 h Erholungszeit aufwiesen, zeigten die MEF $-/-$ signifikante Unterschiede auf. (vgl. Abb. 4.5.3-3 D) MEF $-/-$ pBEC unterschied sich mit einer mittleren Fläche von 15.900 px signifikant von den MEF $-/-$ WT mit 12.500 px. MEF $-/-$ E17K hatte bereits nach vier Stunden nahezu Ausgangswerte erreicht und veränderte die Kometenschweife nicht mehr signifikant. MEF $-/-$ R25C ähnelte der Kontrolle. Hingegen hatte MEF $-/-$ myr mit Mittelwerten von 19.500 px und MEF $-/-$ K179A mit 21.500 px die höchste verbleibende Anzahl an DNA-DSB. MEF $-/-$ TDSB wich nicht von der Kontrolle ab.

4.5.4 Inhibition der Akt1-Mutanten und die Reparatur von DNA-Schäden

In vorrangegangenen Experimenten zeigte sich, dass Akt1-E17K und Akt1-TDSD die Reparatur von DNA-DSB beschleunigten. Um in Erfahrung zu bringen, ob dieser Effekt direkt durch die Akt1-Aktivität hervorgerufen wurde, wurde in den folgenden Experimenten versucht diesen Phänotyp mit Akt-Inhibitoren zu negieren.

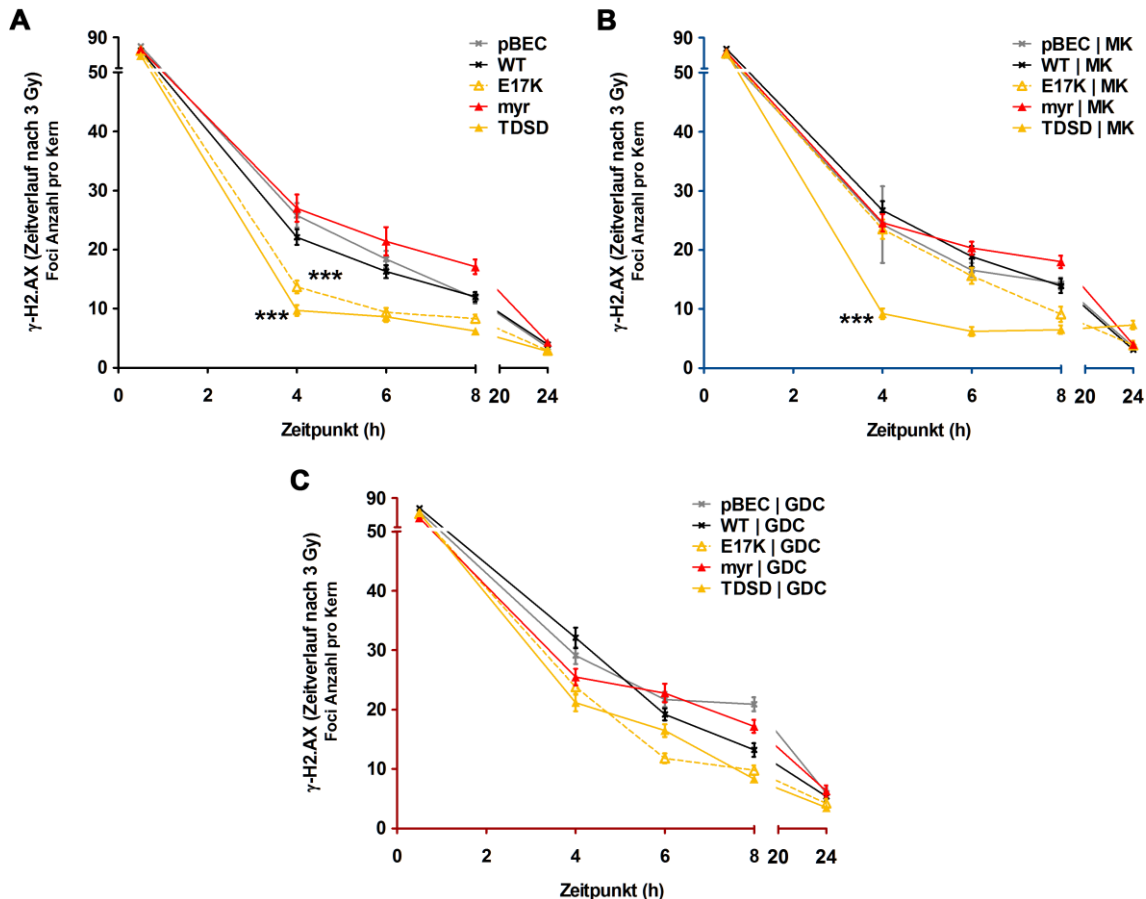


Abb. 4.5.4-1 γ -H2.AX-Assay der TrC1 Akt1-Mutanten im Zeitverlauf nach 3 Gy mit Akt-Inhibitoren

Für den γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Akt Inhibitoren behandelt und nach 2 h bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die gemittelte Anzahl der Foci pro Kern der jeweiligen Zelllinie TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 myr sowie TrC1 TDSD jeweils ohne Inhibitor (A), mit MK-2206 (B) oder GDC0068 (C). Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Ohne Bestrahlung sowie nach 30 min, 4, 6, 8 sowie 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung der DNA mit Hoechst33342 und die Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Die Quantifizierung der sich im Fluoreszenzmikroskop ergebenden Foci-Bilder wurde mit Hilfe des Focinators durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Effekte von DNA-Reparatur und Akt-Inhibitoren bei den verschiedenen Mutanten wurden DNA-Reparaturkinetiken der generierten Akt1-Varianten nach Behandlung mit und ohne Akt-Inhibitoren und Bestrahlung untersucht. Dies wurde unter Verwendung eines γ -H2.AX-Assays im Zeitverlauf bei vor sowie 30 min, 4, 6, 8 und 24 h nach 3 Gy durchgeführt.

Verglichen wurden die Auswirkungen der Akt-Inhibitoren MK-2206 oder GDC0068. In der Abbildung A ist die Reparaturkinetik aller Varianten der TrC1 nach Bestrahlung jedoch ohne Behandlung mit Inhibitor zu sehen. Alle Mutationen der TrC1 wiesen nach 30 min die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci auf und zeigten bereits nach vier Stunden eine um die Hälfte oder mehr als die Hälfte verminderte Foci-Anzahl als Korrelat für DSB auf. Nahezu alle Foci waren nach 24 h bei allen Mutanten verschwunden. TrC1 WT und TrC1 pBEC zeigten ähnliche Verläufe der Verminderung der Anzahl an γ -H2.AX-Foci. Signifikant abweichend gegenüber der Kontrolle waren TrC1 E17K und TrC1 TDSD. TrC1 E17K wies vier Stunden nach Bestrahlung eine signifikant niedrigere Foci-Anzahl auf, flachte dann zwischen vier bis acht Stunden nach Bestrahlung ab. Diesen Verlauf der putativ beschleunigten Reparatur zeigte ebenso TrC1 TDSD. Bei dem Assay ohne Bestrahlung zeigten sich vergleichbare Verläufe wie bei Abb. 4.5.4 1 und 4.5.4 2.

Nach der allosterischen Inhibition mit MK-2206 veränderte sich der Verlauf der Foci-Anzahl nach Bestrahlung. (vgl. Abb. 4.4.5-1 B) Während TrC1 pBEC und TrC1 WT eine leichte Verschlechterung im Verlauf der Zeit aufwiesen, veränderte sich die Antwort nach Bestrahlung insbesondere bei TrC1 E17K deutlich. Die Variante zeigte bei zusätzlicher Verwendung des Inhibitors gleiche Verläufe wie die Kontrolle und verlor damit den frühen Abbau von γ -H2.AX-Foci. Hingegen verlief die Reduktion der Foci-Anzahl bei TrC1 TDSD ähnlich schnell wie ohne Inhibitor. Die Inhibition mit dem kompetitiven Inhibitor GDC0068 bewirkte eine Angleichung der Reparaturverläufe aller untersuchten Akt1-Varianten auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen. So zeigten auch TrC1 E17K und TrC1 TDSD unter kompetitiver Inhibition der ATP-Bindung ähnliche Foci-Reduktionen wie TrC1 WT (vgl. Abb. 4.5.4-1 C).

4.6 Subzelluläre Lokalisation von Akt1-Mutanten

Ein wichtiger Faktor der Veränderung der Funktion und der Aktivität der Kinase ist deren Lokalisation innerhalb der Zelle. Auch die Translokation des Akt1 nach Stimuli spielt hierbei eine große Rolle. Die folgenden Abbildungen zeigen die Akt1-eGFP-Varianten-exprimierenden TrC1 und MEF $-/-$. Das Akt1-eGFP Protein musste durch Nutzung des eGFP nicht gefärbt werden, da das grüne Fluoreszenzprotein eGFP bei einer Anregung mit Licht im Bereich von 488 nm selbst grünes Licht emittiert. So wurde in den beiden folgenden Abschnitten die Lokalisation des human Akt1-eGFP in den beiden Mauszelllinien, ungeachtet von anderen Akt-Formen, in den Zellen sichtbar. Der Zellkörper wurde mit Hilfe des Phalloidin-TRITC (Anregung mit 555 nm), einer direkten Aktin-Färbung, in rot markiert. Eine Hoechst33342-Färbung ermöglichte die Fluoreszenz-basierte Detektion (Anregung mit 365 nm) des Zellkerns bzw. der DNA. Die nur eGFP-exprimierenden Kontrollen beider Zelllinien (TrC1 pBEC und MEF $-/-$ pBEC) wiesen ubiquitäre zelluläre grüne Fluoreszenz ohne Veränderungen der Lokalisation durch Bestrahlung auf und wurden daher in dieser Arbeit nicht abgebildet.

4.6.1 Lokalisation der Akt1-Varianten in TrC1 nach IR

Die folgende Abbildung zeigt die Lokalisation von Akt1-WT-eGFP in der Zelle vor und nach Bestrahlung. Diese Akt1-eGFP-Form diente als Kontrolle für eine nicht durch eine Mutation beeinflusste Lokalisation der Kinase. Zusätzlich diente sie als Vergleichsprotein eines Akt1, das mit einem C-terminalen eGFP versehen ist. Eine Veränderung der Eigenschaften des Akt1, besonders bezüglich der Lokalisation, konnte durch die zusätzliche 27 kDa große Protein-Domäne nicht ausgeschlossen werden.

Die unbestrahlten Zellen zeigten eine weitestgehend ubiquitäre zelluläre Verteilung des Akt1-WT. (vgl. Abb. 4.6.1-1) Eine leichte Erhöhung der Proteinmenge entlang der Zellmembran war erkennbar. Eine Stunde nach der Bestrahlung mit 3 Gy änderte sich dies nicht. Im Gegensatz hierzu war eine leichte Zunahme der Membranlokalisation des Akt1-WT 4 h nach Bestrahlung zu erkennen. Der 24 h-Zeitpunkt ähnelte in seiner Verteilung des eGFP-Signals der unbestrahlten Probe. Aktin und DNA-Färbung zeigten die erwartete Lokalisation. Aktin lag ausschließlich im Zytoplasma vor, daher sparte die Färbung den Zellkern aus. Die DNA-Färbung beschränkte sich auf den Zellkern. Im Folgenden werden diese beiden Kanäle nicht weiter aufgeführt, da keine Änderungen erkennbar waren.

4 Ergebnisse

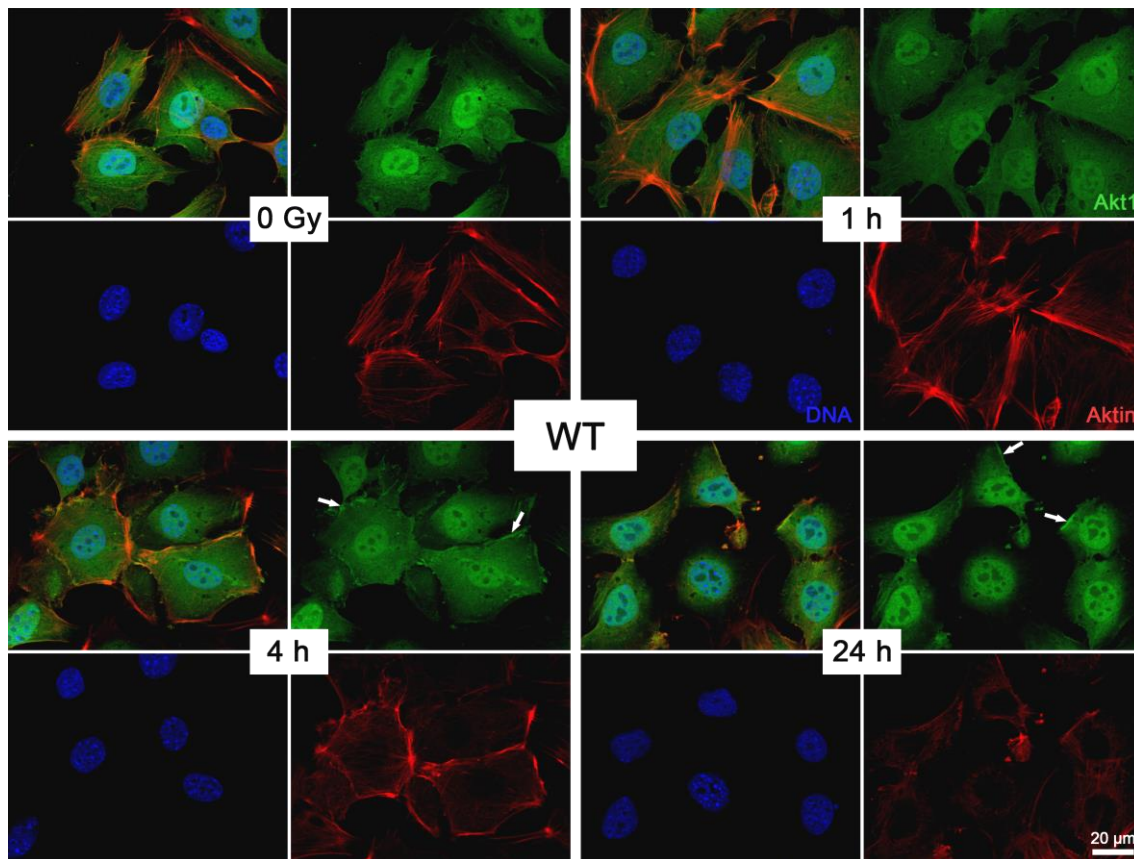


Abb. 4.6.1-1 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-WT-eGFP in TrC1 nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des Akt1-WT-eGFP in TrC1 zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 μ L PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Das in TrC1 überexprimierte Akt1 mit der PH-Domänen-Mutation E17K wurde ebenfalls hinsichtlich seiner Lokalisation untersucht. (vgl. Abb. 4.6.1-2) Bereits bei 0 Gy zeigte diese Variante starke Unterschiede zu der TrC1 WT-Kontrolle. Die grüne Fluoreszenz zeigte deutliche Maxima entlang der gesamten Zellmembran, weniger im Zytoplasma und ähnlich viel Signal im Zellkern. Eine Stunde nach Bestrahlung nahm die Lokalisation an der Membran ab und verlagerte sich zum Zytoplasma. Vier Stunden nach Bestrahlung hingegen war die deutliche Membranlokalisation verschwunden und ein Anstieg im Kern zu erkennen. Dies war auch nach 24 h bei vielen Zellen noch nicht verändert.

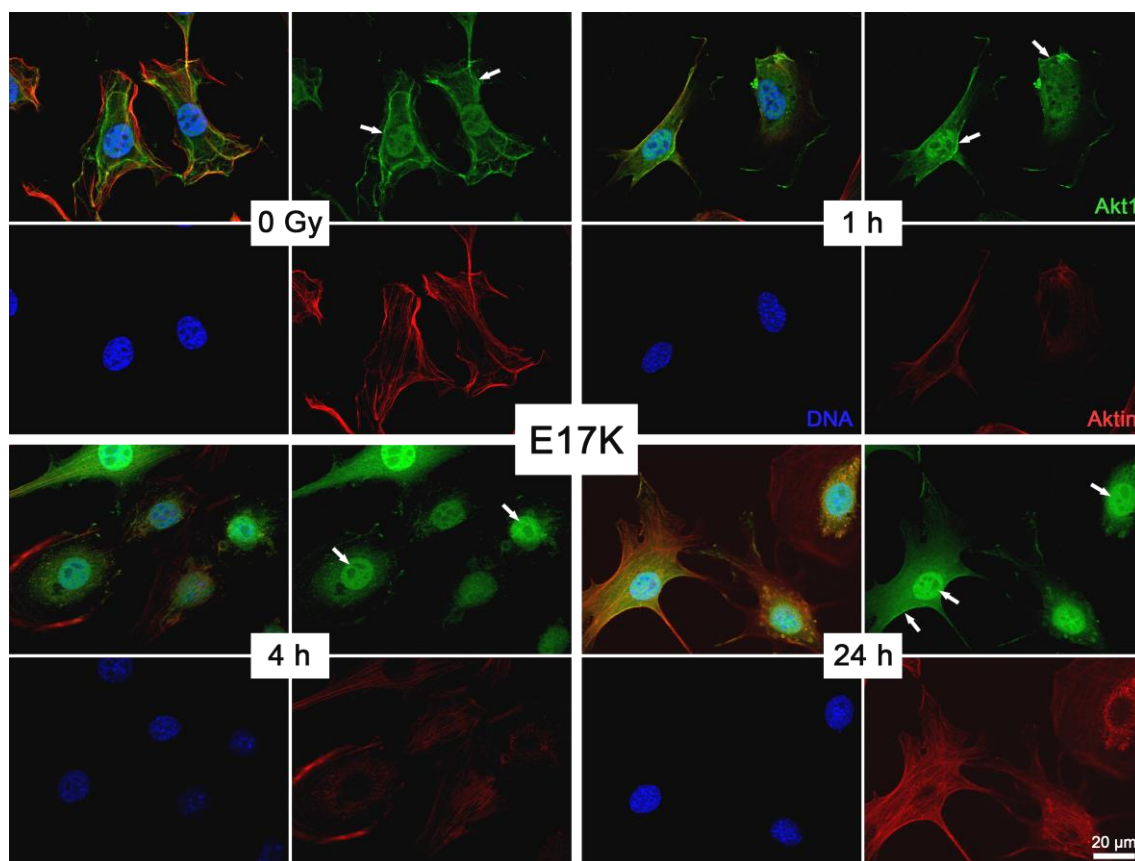


Abb. 4.6.1-2 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-E17K-eGFP in TrC1 nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des Akt1-E17K-eGFP in TrC1 zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 μ L PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Auch TrC1 myr zeigte eine individuelle Verteilung der eGFP-Fusionsproteine. (vgl. Abb. 4.6.1-3) Besonders auffällig war, dass kaum grüne Färbung im Kern vorhanden war. Es war zu beobachten, dass das Protein sich vermehrt in Membranstrukturen ansammelte, besonders in der direkten Umgebung des Kerns. Diese Lokalisation veränderte sich auch nach Bestrahlung nicht sichtbar. In manchen Zellen fand sich nach Bestrahlung ein leichter Anstieg der grünen Fluoreszenz im Kern. Teilweise fanden sich 4 und 24 h nach Bestrahlung mit 3 Gy-Zellen mit runden Stellen im Zytoplasma, die kein Akt1-eGFP enthalten zu schienen.

4 Ergebnisse

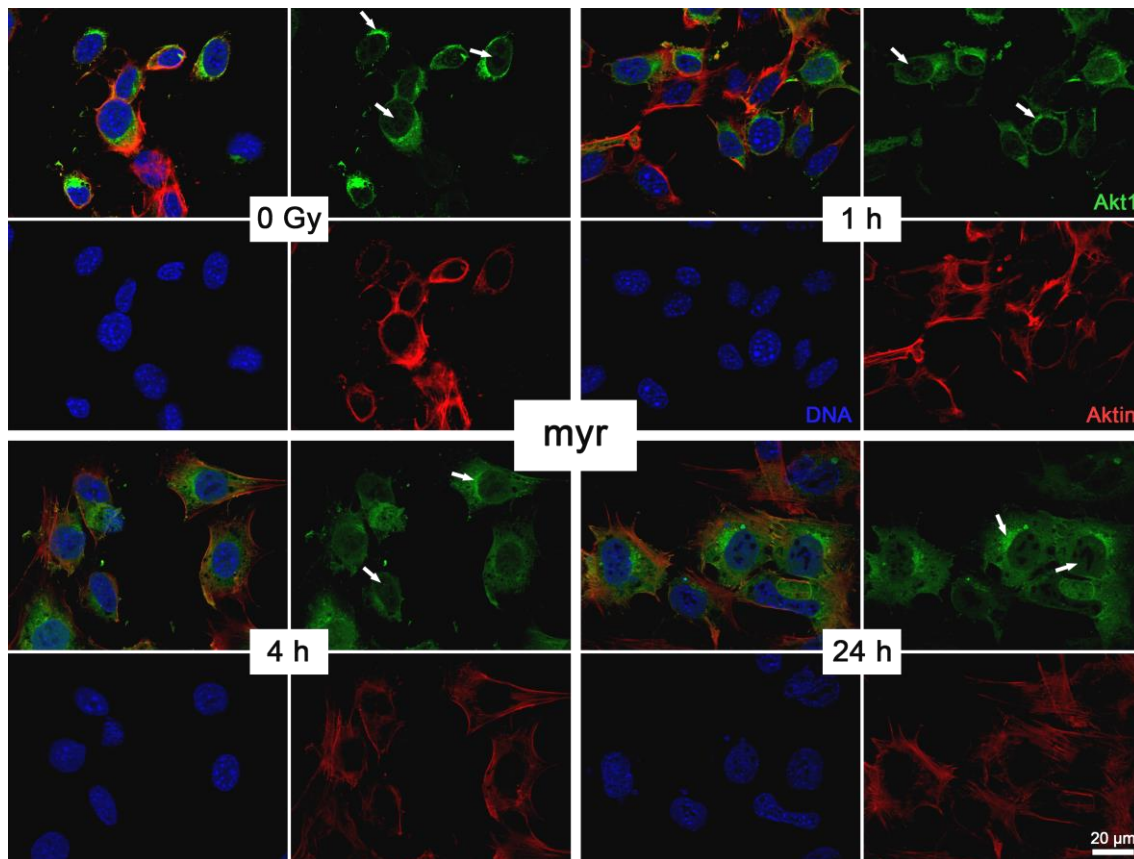


Abb. 4.6.1-3 Subzelluläre Lokalisation des myrAkt1-eGFP in TrC1 nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des myrAkt1-eGFP in TrC1 zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 µL PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Die unbestrahlten TrC1 TDSO zeigten eine ubiquitäre zelluläre Verteilung. (vgl. Abb. 4.6.1-4) Eine leichte Erhöhung der Proteinmenge entlang der Zellmembran war erkennbar. Dies veränderte sich auch nach Bestrahlung nicht. Insgesamt waren grüne Signale auch im Kern intensiv detektierbar, besonders im Vergleich zu TrC1 myr war dieser Unterschied erheblich.

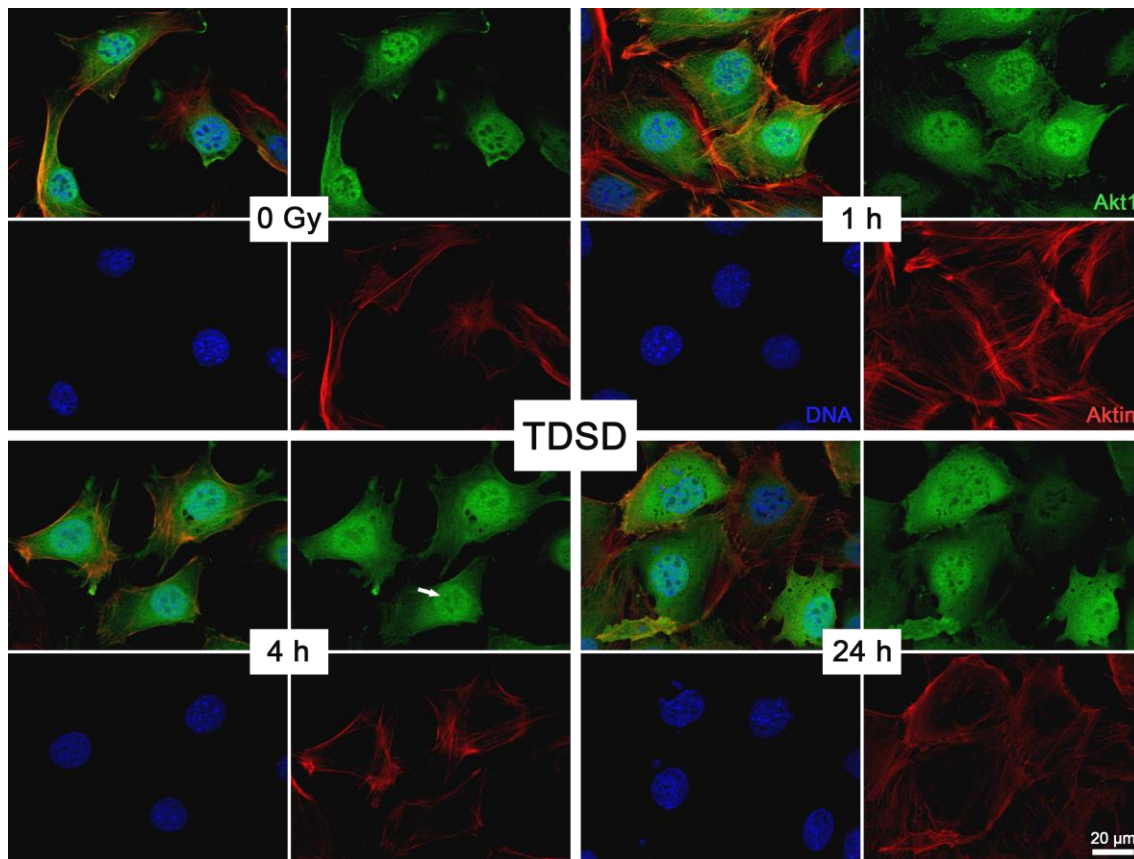


Abb. 4.6.1-4 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-TDSD-eGFP in TrC1 nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des Akt1-TDSD-eGFP in TrC1 zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 μ L PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

4.6.2 Lokalisation der Akt1-Varianten in MEF $-/-$ nach IR

Für die Ergründung der Funktion und Aktivität der Akt1-Varianten in MEF $-/-$ wurde die Lokalisation innerhalb der Zelle vor und nach IR untersucht. Aktin und DNA-Färbung zeigten die erwartete Lokalisation. Aktin lag ausschließlich im Zytoplasma vor, daher sparte die Färbung den Zellkern aus. Die DNA-Färbung beschränkte sich auf den Zellkern. Im Folgenden wurden diese beiden Kanäle nicht weiter genannt, da keine Änderungen erkennbar waren.

4 Ergebnisse

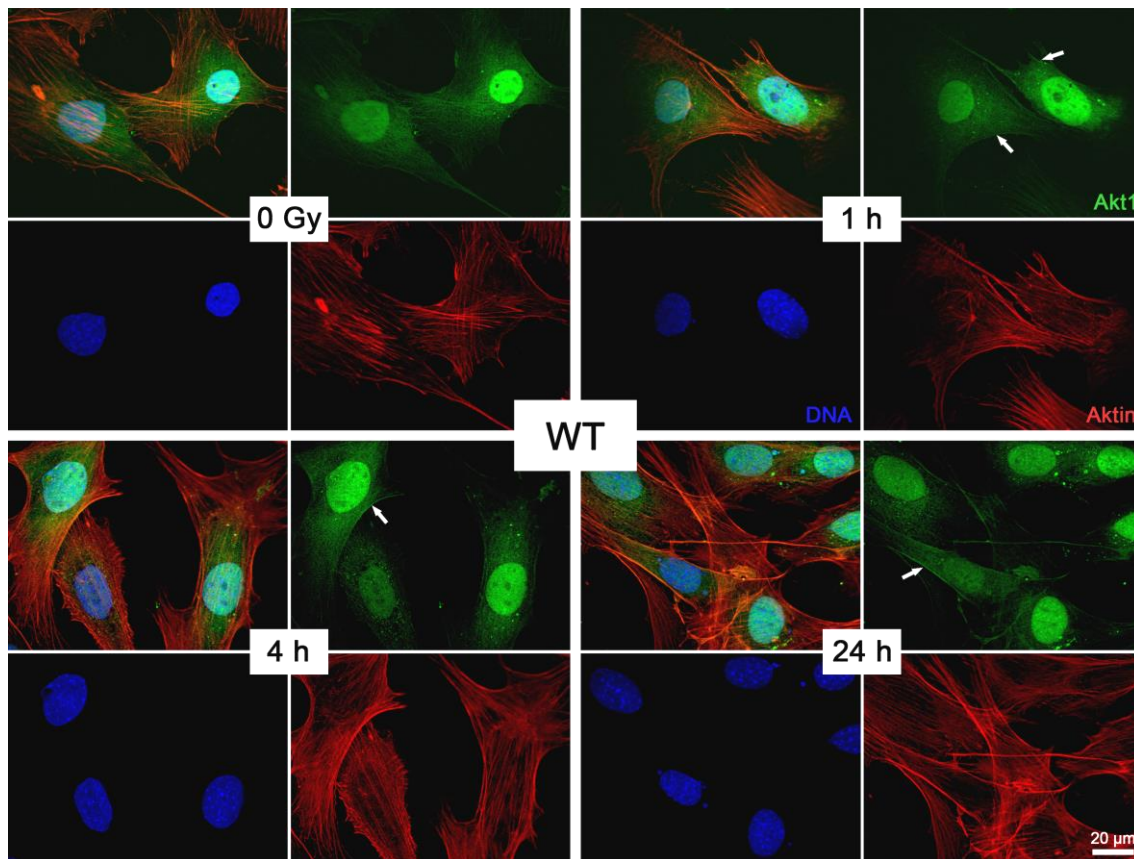


Abb. 4.6.2-1 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-WT-eGFP in MEF $-/-$ nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des Akt1-WT-eGFP in MEF $-/-$ zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 μ L PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Auch bei den MEF $-/-$ Set zeigten die unbestrahlten Zellen eine weitestgehend ubiquitäre zelluläre Verteilung des Akt1-WT (vgl. Abb. 4.6.2-1). Eine leichte Erhöhung der Proteinmenge entlang der Zellmembran war erkennbar. Eine Stunde und 4 h nach der Bestrahlung mit 3 Gy änderte sich dies nicht. Der 24 h-Zeitpunkt ähnelt der unbestrahlten Probe und wies auch leicht erhöhte Membranlokalisation auf.

4 Ergebnisse

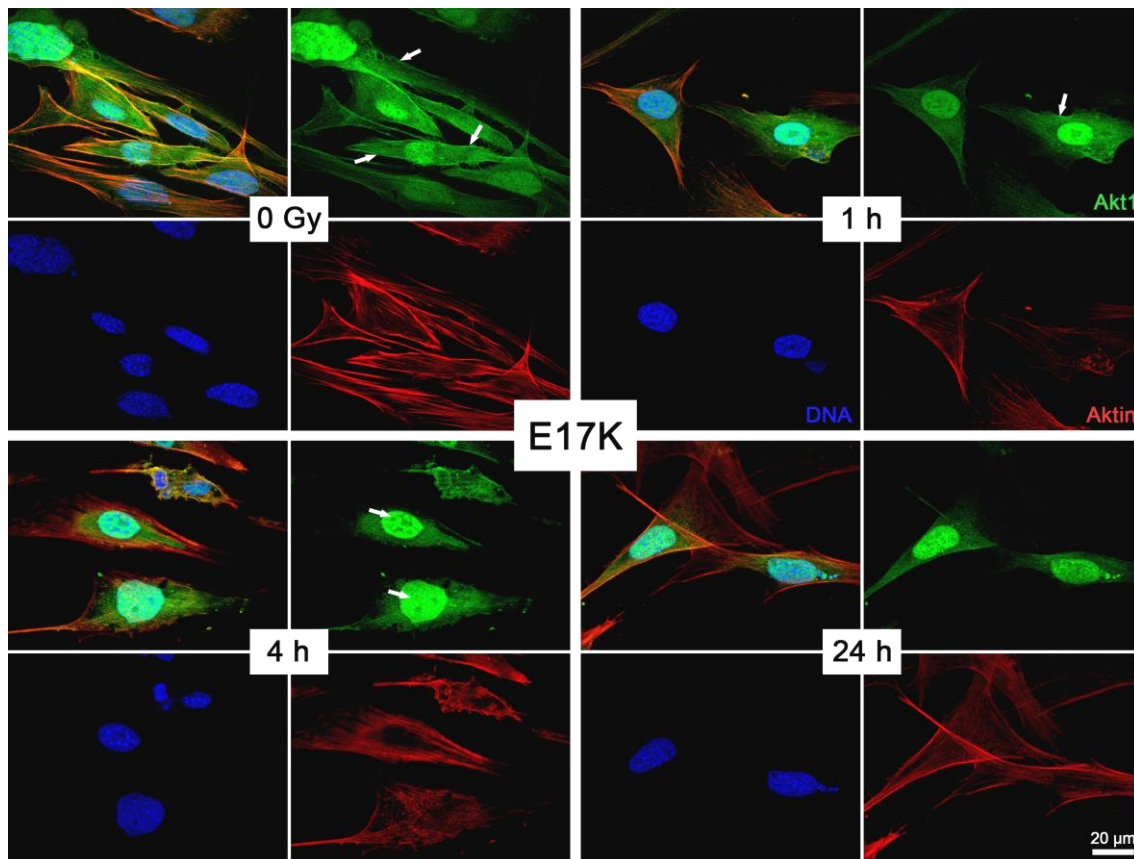


Abb. 4.6.2-2 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-E17K-eGFP in MEF $-/-$ nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des Akt1-E17K-eGFP in MEF $-/-$ zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 μ L PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Das in MEF $-/-$ überexprimierte Akt1-E17K wurde ebenfalls hinsichtlich seiner Lokalisation untersucht (vgl. Abb. 4.6.2-2). Bereits bei 0 Gy zeigte diese Variante starke Unterschiede zu MEF $-/-$ WT-Kontrolle. Die grüne Fluoreszenz wies deutliche Maxima entlang der Zellmembran auf, weniger im Zytoplasma und ähnlich viel Signal im Zellkern. Eine Stunde nach Bestrahlung nahm die Lokalisation an der Membran ab und verlagerte sich zum Zytoplasma. Vier Stunden nach Bestrahlung hingegen war die deutliche Membranlokalisation verschwunden und ähnlich der TrC1 E17K ein Anstieg im Kern zu erkennen. Dies war auch

4 Ergebnisse

nach 24 h bei vielen Zellen noch nicht verändert, wobei auch nach 24 h eine erhöhte Membranlokalisation erkennbar war.

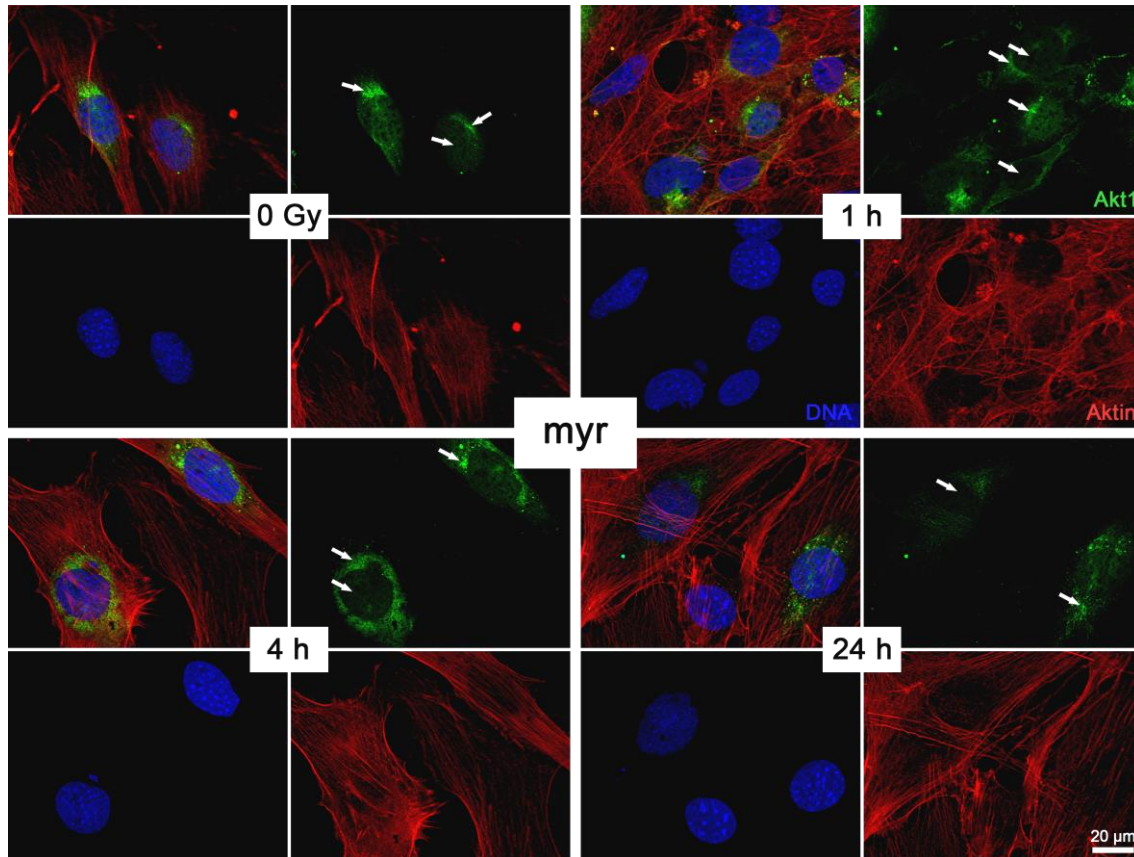


Abb. 4.6.2-3 Subzelluläre Lokalisation des myrAkt1-eGFP in MEF -/- nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des myrAkt1-eGFP in MEF -/- zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 µL PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Auch MEF -/- myr zeigte in diesen Zellen eine individuelle Verteilung der eGFP-Fusionsproteine. (vgl. Abb. 4.6.2-3) Besonders auffällig war, dass auch bei den MEF -/- kaum grüne Färbung im Kern vorhanden war. Ähnlich der TrC1 war zu beobachten, dass das Protein vermehrt in Membranstrukturen vorhanden war. Diese Lokalisation veränderte sich auch nach Bestrahlung nicht.

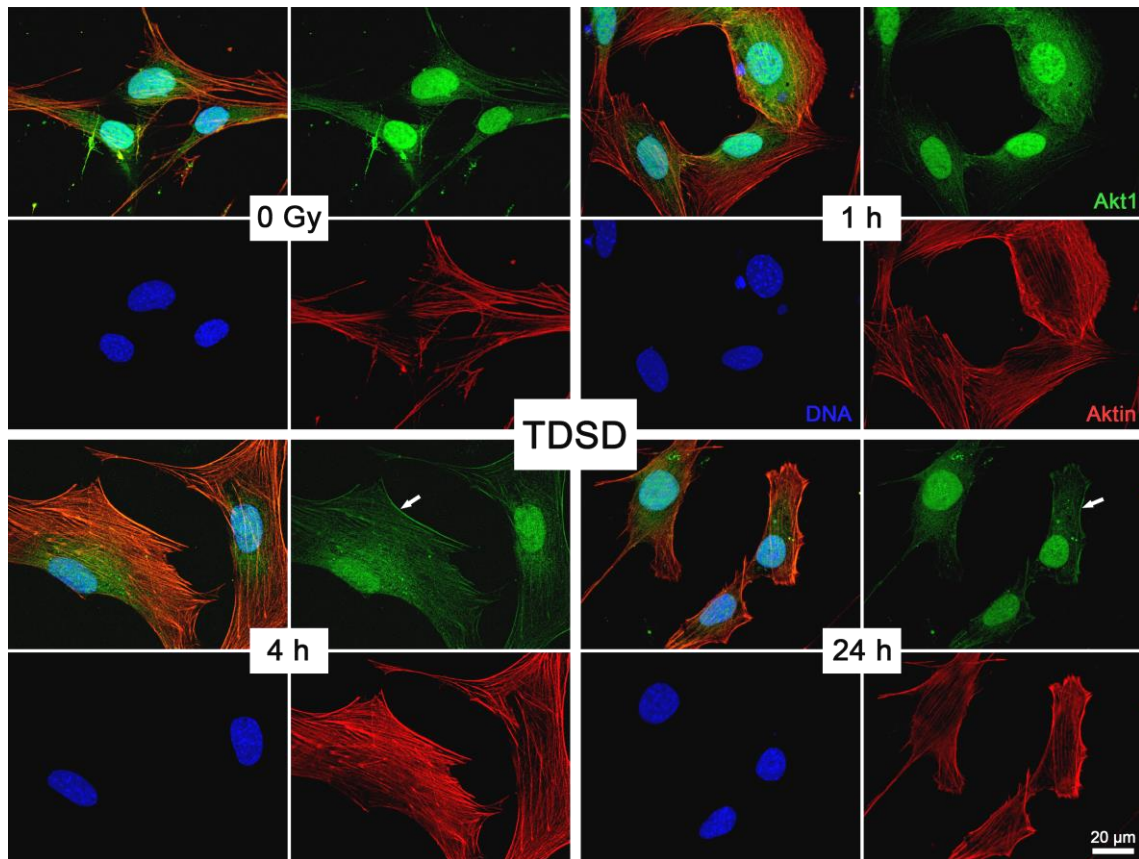


Abb. 4.6.2-4 Subzelluläre Lokalisation des Akt1-TDSD-eGFP in MEF -/- nach 3 Gy

Für die Subzelluläre Lokalisation des Akt1-TDSD-eGFP in MEF -/- zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung wurden 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Vor Bestrahlung (0 Gy) sowie 1, 4 und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung mit Phalloidin-TRITC (1:200) und Hoechst33342 (1:1000) in 500 µL PBS pro Well für 30 min im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen getrocknet und mit DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop und eingeschaltetem ApoTome wurden die Multikanal-Bilder bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Das erste Bild (oben links) zeigt die ausgewerteten Kanäle überlagert, das zweite (oben rechts) den Akt1-eGFP Kanal in grün, das dritte (unten links) DNA Kanal in blau und das vierte (unten rechts) Aktin in rot.

Die unbestrahlten MEF -/- TDSD zeigten eine ubiquitäre zelluläre Verteilung. (vgl. Abb. 4.6.2-4) Eine leichte Erhöhung der Proteinmenge entlang der Zellmembran war erkennbar. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in beiden Zelllinien myrAkt1 nicht in der Lage zu sein scheint in den Kern zu gelangen. Akt1-WT, Akt1-E17K und Akt1-TDSD hingegen sind weitestgehend ubiquitär verteilt. Allerdings konnte besonders bei Akt1-E17K eine erhöhte Membranlokalisation detektiert werden. Auch scheint es, dass die alle Varianten mit Ausnahme des myrAkt1 nach Bestrahlung in den Kern translozieren

4.7 Einfluss von aktiven Akt1-Mutanten auf das NHEJ

4.7.1 Inhibition der DNA-PKcs und das zelluläre Überleben nach IR

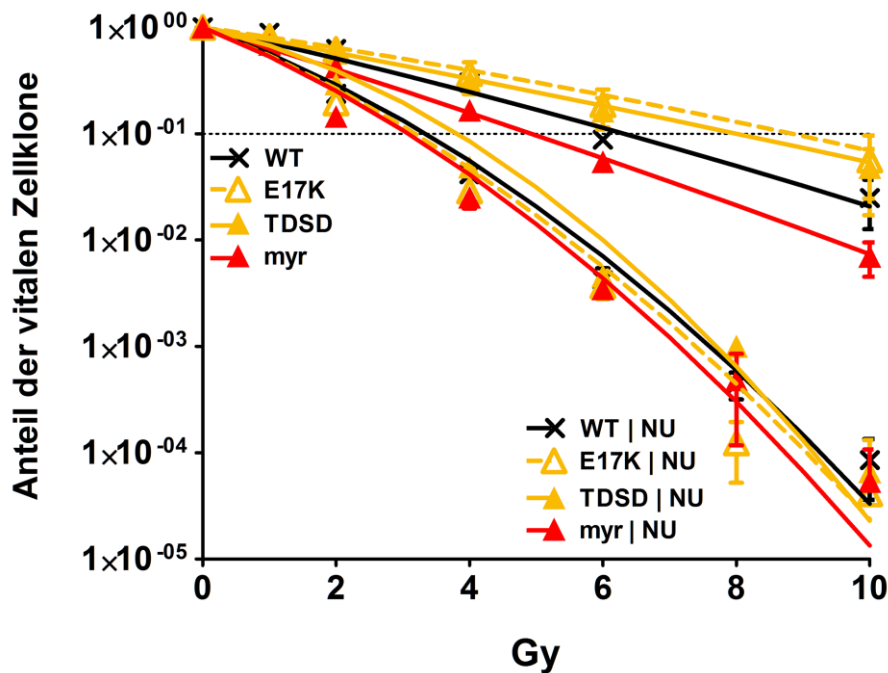


Abb. 4.7.1-1 Koloniebildungs-Assay der aktivierenden Mutanten mit DNA-PK-Inhibitor NU7441

Für den Koloniebildungs-Assay wurden Zellen abhängig von der Dosis auf einer 6-Well-Zellkulturtestplatte ausgesät. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass sich im Schnitt 50 Kolonien bilden konnten. Die Zellen wurden 4 h nach der Aussaat mit 2,5 μ M NU7441 behandelt und nach weiteren 2 h bestrahlt. Am nächsten Tag wurde der Inhibitor durch einen Mediumwechsel entfernt. Die oberen vier Kurven stellen die Ergebnisse des Koloniebildungs-Assay der TrC1 ohne Inhibitor zum Vergleich dar. TrC1 WT wurde als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten-exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 R25C sowie TrC1 myr. Die Zellen wurden mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen für 10 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in 3.7% Formaldehyd und 70% Ethanol fixiert und anschließend mit 0.05% Coomassie blue gefärbt. Ab 50 Zellen pro Kolonie wurde diese als solche gezählt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$.

Zur Testung der Wirkung der Inhibition der DNA-PKcs und des zellulären Überlebens nach IR wurde ein Koloniebildungs-Assay der aktivierenden Mutanten mit DNA-PKcs-Inhibitor NU7441 durchgeführt. Dies vergleicht den Anteil der vitalen Zellklone mit und ohne Inhibition bei verschiedenen Bestrahlungsdosen, 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy. Ohne Inhibition fiel, wie bereits gezeigt, bei allen Mutanten eine unterschiedlich ausgeprägte dosisabhängige Verringerung des Anteils vitaler Zellklone auf. (vgl. Abb. 4.7.1-1) TrC1 WT wiesen hierbei eine Verringerung des Überlebens um 90% bei 6 Gy auf. Hingegen waren bei TrC1 E17K weniger ausgeprägte Effekte zu sehen. So wurden 90% erst bei einer Dosis von 8 Gy. Einen

ähnlichen Verlauf wies hier ebenso TrC1 TDSO auf. Den niedrigsten Anteil vitaler Klone hatten hierbei bei zunehmender Strahlendosis TrC1 myr. Die 90% Marke wurde von diesen Zellen bereits nach 5 Gy unterschritten.

Nach Anwendung des DNA-PK Inhibitors NU7441 fiel auf, dass alle getesteten Varianten nahezu deckungsgleiche dosisabhängige Tendenzen aufwiesen. Bereits ab 2 Gy zeigten mit Inhibition niedrigere Zahlen vitaler Zellen, als im Vergleich zu ohne Inhibition. Dieser Abstand vergrößerte sich im Verlauf, sodass bei 10 Gy 0,01% Zellen verblieben.

Jedoch zeigten alle Mutanten nach Inhibition den gleichen Effekt auf Bestrahlung. Die Dosiseffizienzrate wurde bereits bei etwa drei Gy überschritten im Vergleich zu ohne Inhibitor zwischen 5 und 9 Gy.

4.7.2 Inhibition der DNA-PKcs und die DNA-Reparatur nach IR

Ein weiteres Experiment zum Test des putativen Einflusses der Akt1-Mutanten auf die DNA-PK-abhängige DNA-Reparatur stellte die Überprüfung der DNA-Reparaturkinetik im TrC1-Set unter der pharmakologischen Inhibition der DNA-PKcs dar. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben mit Hilfe des γ -H2.AX-Assays. Die Inhibition der DNA-PKcs erfolgte mit einer Konzentration von 2,5 μ M des Inhibitors NU7441 2 h vor Bestrahlung mit 3 Gy.

Für die Ergründung der Auswirkungen von DNA-PK-Inhibitoren auf die DNA-Reparatur bei den verschiedenen Mutanten wurden DNA-Reparaturkinetiken der generierten Akt1-Varianten nach Behandlung mit und ohne DNA-PK-Inhibitor und nach Bestrahlung mit 3 Gy untersucht. Dafür wurde ein γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf bei 3 Gy nach 4, 6, 8 sowie 24 h durchgeführt. Der DNA-PKcs-Inhibitor NU7441 wurde im Vergleich ohne Inhibitor angewendet und die Reparaturkinetiken untersucht.

In der Abbildung Abb. 4.7.2-1 A ist die Anzahl der γ -H2.AX-Foci aller Varianten der TrC1 nach Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten zu erkennen. Die Grafik bildet die Werte zwischen 4 und 24 h ab. Bei vier Stunden nach Bestrahlung zeigten die verschiedenen Akt1-Varianten bereits unterschiedliche Entwicklungen. Nahezu alle Foci waren zum 24 h-Zeitpunkt verschwunden. TrC1 WT und pBEC verminderten ähnlich verlaufend die Anzahl der Foci. TrC1 E17K und TrC1 TDSO hatten vier Stunden nach Bestrahlung eine signifikant niedrigere Foci-Anzahl, flachten dann zwischen vier bis acht Stunden nach Bestrahlung ab.

4 Ergebnisse

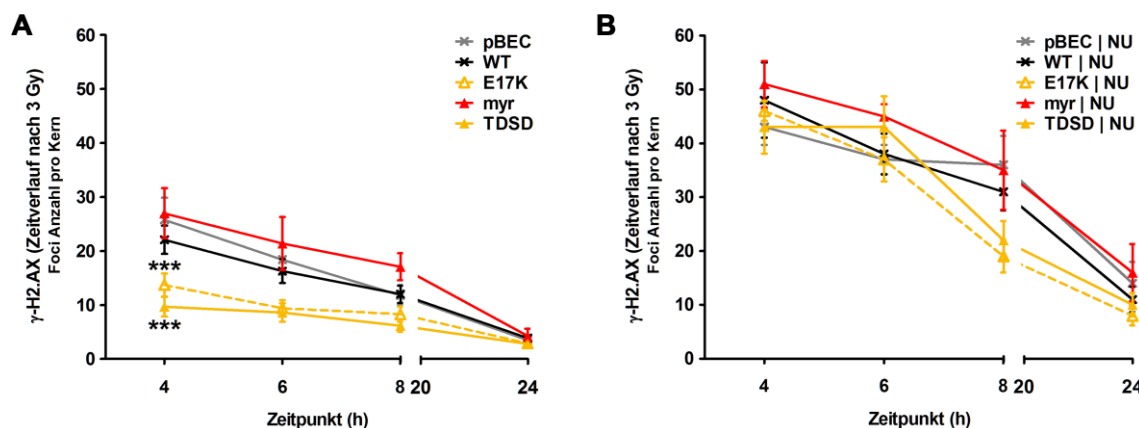


Abb. 4.7.2-1 γ -H2.AX-Assay der TrC1 Akt1-Mutanten mit DNA-PK-Inhibitor

Für den γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf einem Deckgläschen in einer 12-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit einem DNA-PK-Inhibitor behandelt und nachfolgend bestrahlt. TrC1 pBEC wurde als Transduktionskontrolle, TrC1 WT als Überexpressionskontrolle des Akt1 verwendet. Verglichen wurde die Anzahl der Foci pro Kern der TrC1 WT mit den Werten der Akt1-Mutanten exprimierenden TrC1 E17K, TrC1 myr sowie TrC1 TDS jeweils ohne Inhibitor (A) oder mit 2,5 μ M NU7441 (B). Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Ohne Bestrahlung sowie nach 4, 6, 8 und 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert mit 3% PFA und 0.2% Triton X-100. Es folgte eine Färbung der DNA mit Hoechst33342 und die Foci wurden mit Alexa Fluor 647-linked anti- γ -H2.AX Antikörpern markiert. Es folgte eine Quantifizierung der sich im Fluoreszenzmikroskop ergebenden Foci mit dem Focinator. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), $n = 3$. Signifikanzen wurden auf TrC1 WT bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei $***p < 0,001$.

Der DNA-PKcs-Inhibitor NU7441 wurde im Vergleich ohne Inhibitor angewendet und die Reparaturkinetiken grafisch dargestellt. (vgl. Abb. 4.7.2-1 B) Die zusätzliche Inhibition zeigte bei allen Akt1-Varianten eine Beeinflussung der Foci-Anzahlen. Im Gegensatz zum Verlauf ohne Inhibitor wiesen alle Mutanten mit ca. 25 Foci mehr pro Zeitpunkt deutlich erhöhte Werte auf. Besonders fiel auf, dass die Inhibition der DNA-PKcs die beschleunigte Abnahme der Foci bei TrC1 E17K und TrC1 TDS aufhob. Erst nach acht Stunden differenzierten sich die Effekte des Inhibitors auf die verschiedenen Mutationen, sodass bei TrC1 E17K und TrC1 TDS eine verspätet einsetzende, schnellere Reparatur zu erkennen ist, jedoch insignifikant im Vergleich zu der TrC1 WT Kontrolle.

4.7.3 Akt1 Kinase-Assay mit DNA-PKcs als Substrat

Um eindeutige Ergebnisse bezüglich der direkten Interaktion der Kinasen Akt1 und DNA-PKcs zu erlangen, wurde ein *in vitro* Kinase-Assay etabliert. Insbesondere war das Ziel die Hierarchie der Phosphorylierung der beiden Proteine zu ergründen.

Zunächst wurde die Aktivität des Akt1-TDSD Proteins mit Hilfe eines Testsubstrats getestet, ein GSK3 β -Peptidstück. (vgl. Abb. 4.7.3-1 Kinase-Assay zur Testung der Aktivität des Akt1-TDSD und der Autophosphorylierung) Dieser Teil des Assays wurde zur Testung der Autophosphorylierung und der zielgerichteten Phosphorylierung durchgeführt. Das GSK3 β -Peptidstück diente als Positivkontrolle für die Akt1-Kinasereaktion. Die Reaktion von Akt1-WT + Akt1-WT zeigte ein Signal von 10.900 RLU. Dagegen zeigte Akt1-WT + Akt1-TDSD eine mit dem Ansatz Akt1-WT + GSK3 β vergleichbare Lumineszenz. Signifikante Ergebnisse lieferte die Kombination von Akt1-TDSD + GSK3 β im Vergleich zum Akt1-WT + GSK3 β -Ansatz. Diese Mischung zeigte die höchste Aktivität mit 34.500 RLU und lag damit deutlich über der Aktivität des Akt1-WT. (vgl. Abb. 4.7.3-1 A)

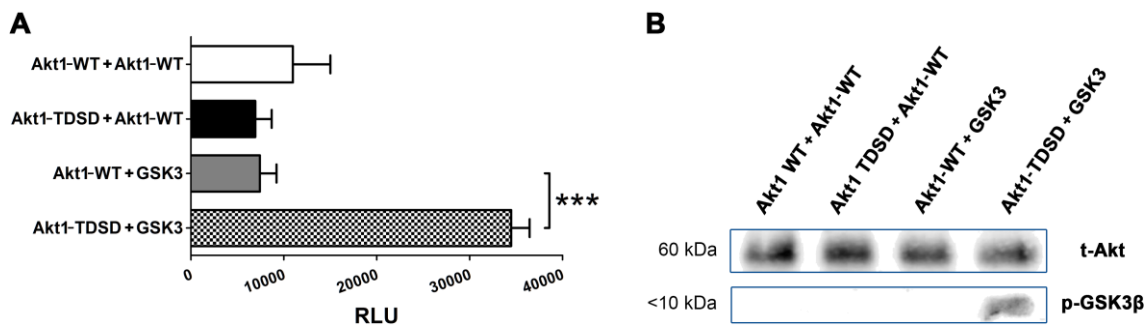


Abb. 4.7.3-1 Kinase-Assay zur Testung der Aktivität des Akt1-TDSD und der Autophosphorylierung

Der Kinase-Assay des Akt1-WT, Akt1-TDSD und GSK3 β wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die verschiedenen humanen Akt1-Mutanten wurden aus HEK293-Zellen mittels des HaloTag® Säugetierproteine-Aufreinigungssystems im Rahmen der Masterarbeit von R. Madel aufgereinigt. Die Ansätze setzten sich aus 25 μ L Proteinlösung (4 μ g Akt1, 4 μ g Substrat), 25 μ L ADP-Glo™ Reagenz und 50 μ L Kinase-Detektions-Reagenz zusammen. Die Kinaseaktivität wurde durch die verbrauchte Menge des benötigten ATPs gemessen. Die erzeugte Lumineszenz wurde in einem ELISA reader in relative light units (RLU) gemessen. Graph A zeigt die RLU der jeweiligen Ansätze. Bei B handelt es sich um die Western Blot-Analyse von 20 μ L des Kinaseansatzes nach Inkubation. Es wurden Antikörper gegen Akt gesamt (t-Akt) und phosphoryliertes GSK3 β (p-GSK3 β) aufgetragen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf Akt1-WT + GSK3 β bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei *** p < 0,001.

Die Western Blot-Analyse des durchgeführten Akt1-Assays zeigte gleichmäßige t-Akt-Signale und ein p-GSK3 β -Signal im Akt1-TDSD + GSK3 β -Ansatz. (vgl. Abb. 4.7.3-1 B)

Das so getestete Akt1-TDSD wurde im folgenden Experiment mit DNA-PK genutzt, um der Frage nachzugehen, ob DNA-PK durch Akt1 phosphoryliert wird. Der Kinase-Assay mit

4 Ergebnisse

DNA-PK-Testsubstrat und humaner DNA-PK wurde als Positivkontrolle verwendet. Außerdem wurden die Ansätze DNA-PK alleine, mit Akt1-TASA als negative Kontrolle und Akt1-TDSD erstellt. Die Messung der Kinaseaktivität zeigte bei allen Kombinationen einen geringen Verbrauch von ATP von mindestens 18.000 RLU. DNA-PK allein als Negativkontrolle zeigte ein Signal von 19.000 RLU. DNA-PK und Substrat, als Positivkontrolle wies signifikant die höchste Lumineszenz mit 73.800 RLU auf. DNA-PK und Akt1-TASA bzw. Akt1-TDSD zeigten ebenso eine erniedrigte Aktivität. Akt1-TASA wurde als Negativkontrolle eingesetzt, die nicht phosphorylierbar sein sollte, aufgrund der Punktmutationen zum Alanin. Auch Akt1-TDSD konnte nicht phosphoryliert werden, war aber putativ aktiv und in der Lage ein Zielprotein zu phosphorylieren. (vgl. Abb. 4.7.3-2 A)

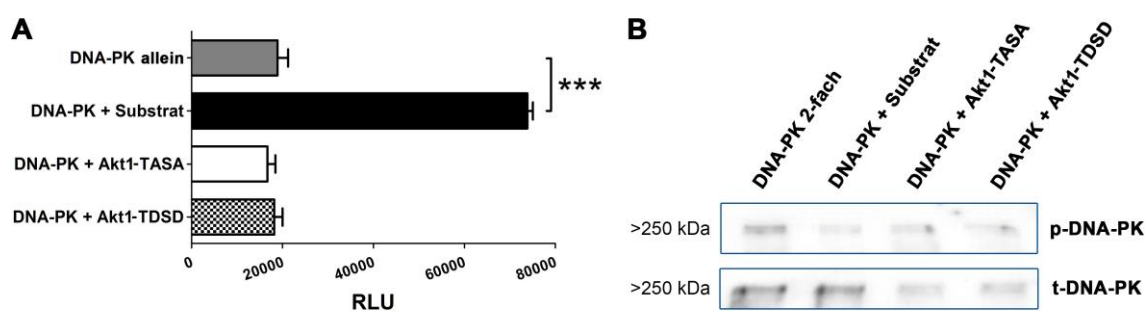


Abb. 4.7.3-2 Kinase-Assay der DNA-PK als putatives Substrat des Akt1

Der Kinase-Assay des DNA-PK als Target wurde allein, mit Substrat, Akt1 TASA und Akt1 TDSD kombiniert in 96-Well-Platten durchgeführt. Die verschiedenen humanen Akt1-Mutanten wurden aus HEK293 Zellen mittels des HaloTag[®] Säugetierproteine-Aufreinigungssystem im Rahmen der Masterarbeit von R. Madel aufgereinigt. Die Ansätze setzten sich aus 25 μ L Proteinlösung (20 Units DNA-PK, 4 μ g Akt1), 25 μ L ADP-Glo[™] Reagenz und 50 μ L Kinase-Detektions-Reagenz zusammen. Die Kinaseaktivität wurde durch die verbrauchte Menge des benötigten ATPs gemessen. Die erzeugte Lumineszenz wurde in einem ELISA reader gemessen. Graph A zeigt die RLU der jeweiligen Ansätze. Bei B handelt es sich um die Western Blot-Analyse von 20 μ L des Kinaseansatzes nach Inkubation. Es wurden Antikörper gegen DNA-PK gesamt (t-DNA-PK) und phosphorylierte DNA-PK (p-DNA-PK) aufgetragen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf DNA-PK allein bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei *** p < 0,001.

Im Anschluss wurden Western Blots mit Antikörperdetektion ausgeführt, um die Ergebnisse des Kinase-Assays zu überprüfen. Diese zeigten t-DNA-PK in ungefähr gleicher Menge und kaum Signal unter Nutzung des p-DNA-PK. (vgl. Abb. 4.7.3-2 B)

4.7.4 Akt1 als Substrat von DNA-PKcs im Kinase-Assay

Zur Klärung, ob Akt1 durch DNA-PK phosphoryliert wurde und an welcher der beiden Phosphorylierungsstellen, wurden ein Kinase-Assay durchgeführt. Zur Feststellung, welche

4 Ergebnisse

Phosphorylierungsstelle das Ziel der DNA-PK putativ sein könnte, wurden Akt1-TA und Akt1-SA mit DNA-PK kombiniert. Akt1-TA enthält ein Alanin anstelle des phosphorylierbaren Threonins. Die doppelte Menge an DNA-PK diente als Autophosphorylierungskontrolle, um die Höhe der stattfindenden Autophosphorylierung der DNA-PK bestimmen zu können. Die Testung der Kinasereaktion von DNA-PK mit Akt1-WT wies ein Aktivitätssignal auf, das zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle bei 32.800 RLU lag. DNA-PK zeigte mit Akt1-SA Signal in derselben Höhe wie Akt1-TASA DNA-PK ohne Substrat bei ca. 17.000 RLU. Dagegen resultierte die Kombination aus DNA-PK und Akt1-TA ein signifikantes Aktivitätssignal im Vergleich zu der Negativkontrolle. (vgl. Abb. 4.7.4-1 A)

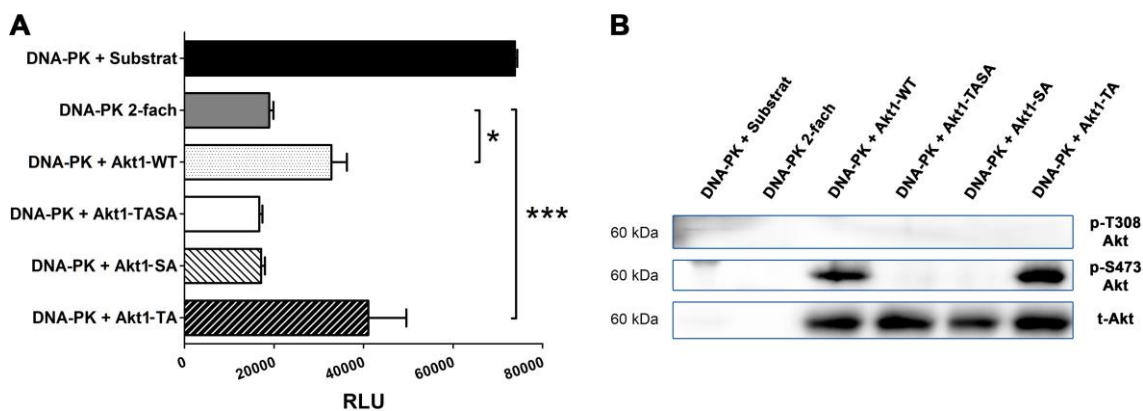


Abb. 4.7.4-1 Kinase-Assay des Akt1 als Substrat von DNA-PK

Der Kinase-Assay des DNA-PK als Target wurde allein, mit Substrat, Akt1-TASA und Akt1-TDSD kombiniert in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die verschiedenen humanen Akt1-Mutanten wurden aus HEK293 Zellen mittels des HaloTag® Säugtierproteine-Aufreinigungssystem im Laufe der Masterarbeit von R. Madel aufgereinigt. Die Ansätze setzten sich aus 25 μ L Proteinlösung (20 Units DNA-PK, 4 μ g Akt1), 25 μ L ADP-Glo™ Reagenz und 50 μ L Kinase-Detektions-Reagenz zusammen. Die Kinaseaktivität wurde durch die verbrauchte Menge des benötigten ATPs gemessen. Die erzeugte Lumineszenz wurde in einem ELISA reader gemessen. Graph A zeigt die RLU der jeweiligen Ansätze. Bei B handelt es sich um die Western Blot-Analyse von 20 μ L des Kinaseansatzes nach Inkubation. Es wurden Antikörper gegen Akt gesamt (t-Akt) und phosphoryliertes Akt-Threonin (p-T308) bzw. phosphoryliertes Akt-Serin (p-S473) aufgetragen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM), n = 3. Signifikanzen wurden auf DNA-PK allein bezogen. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei * p < 0,05; *** p < 0,001.

Die zugehörigen Western Blots zeigten in den Ansätzen mit Akt1-Varianten eine gleichmäßige Menge des Akt. Der Antikörper gegen phosphoryliertes T308 lieferte in keinem Ansatz Signale. Im Gegensatz dazu zeigte der Antikörper gegen phosphoryliertes S473 Signale im Ansatz mit Akt1-WT und Akt1-TA auf. (vgl. Abb. 4.7.4-1 B)

5 Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wiesen einige verschiedene Publikationen auf eine Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für die DNA-Reparatur, insbesondere den DNA-PKcs-abhängigen NHEJ Reparaturwegs hin. Allerdings waren die Aussagen zur Bedeutung von Akt1 für die DNA-Reparatur widersprüchlich. Ziel dieser Arbeit war es daher die Rolle der Akt1 bei der Antwort von Zellen auf ionisierende Strahlung mit Hilfe eines genetischen Ansatzes näher zu ergründen. Besonders die postulierte Interaktion der Kinasen Akt und der DNA-PKcs im Rahmen der Zellantwort auf strahleninduzierte DNA-Schäden standen dabei im Fokus. Eine wichtige Frage, die in diesem Promotionsprojekt erstmals untersucht wurde, war die Bedeutung der klinisch relevanten E17K-Mutation, mit postuliert erhöhter Membran-Lokalisation und Aktivität für die Strahlensensitivität und die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB. Außerdem wurde untersucht, ob sich die Lokalisation von Akt1 nach Bestrahlung verändert und ob dies einen Einfluss auf die Reparatur bzw. das zelluläre Überleben nach IR hat. Weiterhin stellte sich die Frage, ob Akt1 einen direkten Effekt auf die DNA-Reparatur via D-NHEJ hat oder Akt1 lediglich die zelluläre Überlebens-Signaltransduktion nach Bestrahlung verändert, und so die zelluläre Strahlenantwort moduliert.

Hierzu wurden diverse Akt1-Mutanten mit spezifisch postulierten bzw. nachgewiesenen Eigenschaften bezüglich des Aktivierungszustandes erzeugt und stabil in Prostatakarzinomzellen und murinen embryonalen Fibroblasten exprimiert. Die erstellten Mutanten-exprimierenden Zellen wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf die zelluläre Antwort nach Bestrahlung und Alterationen der DNA-Reparatur untersucht. Im Verlauf der Arbeit wurde auch überprüft, ob die gefundenen Phänotypen durch pharmakologische Inhibition des Akt1 oder der DNA-Reparatur reversibel waren oder es sich um einen chronischen Effekt, wie z.B. der Veränderung der Genregulation, handelte. Um weitere Einblicke in die direkte Interaktion von Akt1 und DNA-PK zu erlangen, wurden zusätzlich zu den Zellkultur-basierten Experimenten *in vitro* Kinase-Assays mit verschiedenen aufgereinigten Akt1-Mutanten etabliert.

Die Arbeit zeigte erstmals, dass aktivierende Mutationen von Akt1 das Überleben der Zellen nach Bestrahlung verbessern und dabei in die DNA-PK-abhängige DNA-DSB-Reparatur via D-NHEJ eingreifen. Interessanterweise trat eine Verbesserung der DNA-Reparatur nur in den Mutanten mit erhöhter Kernlokalisation auf. Dies lässt vermuten, dass die Kernlokalisation von aktivem Akt1 für Verbesserung der DNA-Reparatur und damit die Radioresistenz essentiell ist. Eine erhöhte Aktivität von zytosolischem myrAkt1, mit starker Membranlokalisation, führte dagegen zu einer erhöhten Radioresistenz, die mit einer Verschlechterung der DNA-Reparatur einherging. Eine Inhibition der Mutanten negierte die

positiven Effekte der Mutanten auf das Überleben nach IR und die DNA-Reparatur, was auf einen direkten nicht-chronischen Effekt hinweist. Auch die Inhibition der DNA-PKcs verringerte deutlich die Unterschiede der Akt1-Varianten-exprimierenden Zellen zueinander. Dies wies auf den Einfluss von Akt1 auf das D-NHEJ hin. Auch verdeutlichten die Kinase Assays, dass Akt1 nicht in der Lage war DNA-PKcs direkt zu phosphorylieren, das Serin 473 des Akt1 allerdings eine mögliche Substratstelle der DNA-PKcs darstellte.

5.1 Mutationen des PI3K/Akt-Signalwegs in aktuellen Studien

Es ist bekannt, dass der PI3K/Akt-Signalweg einer der in malignen Neoplasien am häufigsten deregulierte Signalwege ist. Kritische Komponenten des Signalweges, die für die Pathogenese bzw. Progression vieler Malignome eine Rolle spielen, sind eine Proteinüberexpression oder Hyperaktivität von PI3K oder Akt1. Diese entstehen in einer Vielzahl der Fälle durch Genamplifikation oder eine gain-of-function-Mutationen. Andererseits sind in 30% der menschlichen Tumoren Veränderungen an PTEN zu erkennen, die zu einer herabgesetzten oder ausbleibenden Expression von PTEN führen. Der Grund für eine verminderte Aktivität oder das Fehlen von PTEN sind Genverluste, veränderte Gentranskription, Veränderungen der Methylierung, verminderte mRNA oder Proteinstabilität. [108, 126, 184, 202, 235, 237]

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit, mit Hilfe der COSMIC-Datenbank des Trust Sanger Institute, durchgeführten Datenbankanalysen hinsichtlich Mutationen in den Genen *PI3KCA*, *PTEN* und *AKT1* ergaben hierbei, dass *PIKCA* mit einer Genommutationsfrequenz von 11,1% aller, in der Datenbank hinterlegten, Tumorarten am häufigsten mutiert war. Besonders betroffen waren Mutationen an E542, E545 sowie H1047. Insbesondere waren diese Mutationen zu einem großen Anteil von 29,9% in Brusttumoren gefunden worden. Insgesamt war diese Gruppe der Mutationen mit 25,6% aller Tumoren in sekundären und primären Geschlechtsorganen sowie im Urogenitaltrakt zu finden und bei 13,0% aller Tumoren des Gastrointestinaltrakts. Dieses hohe Auftreten und die ubiquitäre Verteilung unterstreichen die Relevanz der *PI3KCA*-Mutation. Das hohe Auftreten im Urogenitaltrakt und den Geschlechtsorganen sowie im Gastrointestinaltrakt spiegelte die hohe Relevanz für weitere Forschung bezüglich zielgerichteter Therapie mit Inhibitoren insbesondere in Tumoren dieser Organe wieder.

Im Gegensatz zu der *PI3KCA*-Mutation traten die *PTEN*-Mutationen seltener mit einer Mutationsfrequenz von 6,95% auf. Es waren mehr Mutationen als bei *PI3KCA* und *AKT1* auf eine Leseraster-Mutation zurückzuführen. Besonders auffällig war das mit Abstand häufigste Auftreten im Endometrium.

Interessanterweise hatte Akt1 mit einer Gesamtmutationsfrequenz von 1,2% ein weitaus geringeres Auftreten im gesamten Tumorprobenkollektiv als PI3K und PTEN. Jedoch entfiel hierbei ein Großteil, 81,4%, aller Akt1-Mutationen auf die E17K-Mutation. Die anderen Akt1-Mutationen hatten Anteile von unter 1%. Deswegen wurde nur die somatisch relevante E17K-Mutation weitergehend analysiert. Hierbei fanden sich besonders viele E17K-Mutationen bei Tumoren an Hirnhäuten mit 7,7%. Häufig traten auch Tumore an Peritoneum, Haut, Brust, Knochen, Thymus, Urogenitaltrakt und Endometrium auf. Da die Strahlentherapie für die Behandlung von Tumoren dieser Entitäten eine Rolle spielt sind die Ergebnisse dieser Arbeit zum Einfluss der E17K-vermittelten Radioresistenz von potentieller Relevanz für die Therapie dieser Patienten.

Es wurden alle Gewebeproben mit nicht näher definierten Mutationen für die Analyse entfernt. So kann es sein, dass abhängig von den eingereichten Geweben oder den Analysefehlern manche Mutationen durch diese Analyse eine leicht geringere Häufigkeit sowie eine Verschiebung der Gewebearten im Vergleich zu anderen Studien zeigten. Bei Akt1 musste diese Bereinigung nicht durchgeführt werden. Bei *PTEN* und *PI3KCA* war nur unter 1% der Mutationen nicht definiert. Dennoch war dies notwendig, um eine aussagekräftige Einschätzung über die somatische Wirkung der Mutationen zu ermöglichen. Eine zusätzliche Unterschätzung dieser Daten könnte durch einzelne Punktmutationen bedingt sein, die teilweise einmalig auftraten oder nicht vorbekannt waren und ihr somatischer Effekt somit nicht sicher angegeben werden konnte. Hierdurch lag die mögliche Fehlermarge unter 1%, da die meisten Mutationen vorbeschrieben waren.

Eine weitere Einschränkung in der Analyse der Daten anhand der COSMIC-Analyse liegt in der fokussierten Eingabe der Gewebeproben unter bestimmten Untersuchungsgesichtspunkten, sodass z.B. vergleichsweise viele Hirnhaut- und Brust-Gewebeproben auf die Akt1-Mutation von einer Arbeitsgruppe untersucht und eingegeben wurden. Während Tumorproben des Peritoneums seltener eingereicht wurden. So können fortgeführte Analyse- und Eingabefehler durch die Arbeitsgruppen nicht ausgeschlossen werden und würden sich meist nur auf eine Gewebeart konzentrieren. Weitere Faktoren können auf Variationen bzw. Einfluss der unterschiedlichen Arbeitsgruppen zurückzuführen sein, wie die Gewinnung, Konservierung und Verarbeitung von Proben sowie die Methoden zur DNA-Isolierung [72]. Die Sequenzierungsmethoden sind teilweise noch unvollkommen, sodass Sequenzierungen selten vollständig sind. Insbesondere fällt die Analyse GC-reicher Sequenzen als fehlerbehaftet auf [96]. Daher ist es oft schwierig jede genomische Variante zu identifizieren oder zu bestimmen. In Abwesenheit von probenspezifischen Informationen geht COSMIC von der Annahme aus, dass jedes Gen in jeder Probe untersucht und anhand dessen

Mutationsraten berechnet wurde.

Die Datenbankanalyse dieser Arbeit bestätigte, trotz der genannten Einschränkungen, die Tendenzen der publizierten Daten mit einer Ausnahme der Analyse von Lebertumoren (35,6% in der Literatur gegen 9,63% in dieser Arbeit). Lebertumoren wurden jedoch nur in einer Studie analysiert [124]. Die meisten auftretenden Mutationen der *PI3KCA*, E542K und E545K sowie H1047R, wurden ebenso in dieser Datenbankanalyse gefunden [11, 99]. Ebenso zeigten die Häufigkeitsverteilungen mit der Literatur vergleichbare Werte wie für Tumoren der Mamma (8,3-40% in der Literatur gegen 29,99% in dieser Arbeit), kolorektale verglichen mit Dickdarntumoren (13,6-31,6% in der Literatur gegen 14,2% in dieser Arbeit), Gehirn verglichen mit dem zentralen Nervensystem (4,6-26,7% in der Literatur gegen 12,8% in dieser Arbeit) und Magen-Tumoren (4,3-25% in der Literatur gegen 13,1% in dieser Arbeit), Ovarien (6-12,1% in der Literatur gegen 12,0% in dieser Arbeit) von *PIK3CA* auf. Jedoch schwanken diese Werte abhängig von der Studie. Ebenso können unterschiedliche Definitionen der Organzugehörigkeit Unterschiede in Häufigkeitsverteilungen ausmachen. Darin kann auch eine Begründung dafür liegen, dass in der COSMIC-Datenanalyse leichte Abweichungen zu finden waren. *PIK3CA*-Gene sind laut Literatur etwa in 15% der menschlichen Tumoren verändert, was der Datenbankanalyse mit 11,1% nahekommt. [106]

Während *PI3KCA*- und *AKT1*-Mutationen in Tumoren hyperaktiviert sind, weist *PTEN* einen Funktionsverlust, bzw. eine herabgesetzte, oder nicht stattfindende Expression in Tumorgewebe auf und erhöht so indirekt das Überleben der Tumorzellen. Daraus leitet sich ab, dass in der Datenbankanalyse besonders Leseraster-Verschiebungen bei den *PTEN*-Mutationen gefunden wurden. Während für einen Funktionsverlust oder -gewinn eher Punktmutationen an katalytischen oder regulierenden Domänen notwendig sind. [108, 126, 202, 235, 237]

Die Häufigkeit des Auftretens der *PTEN*-Mutationen aus der COSMIC-Datenanalyse hatte Ähnlichkeit mit Ergebnissen der Literatur, insbesondere für das kolorektale Karzinom (9-45% in der Literatur gegen 8,7% in dieser Arbeit), ebenso das Auftreten von Mutationen am hämatopoetischen und lymphatischen System und die Endometrium- sowie Ovarialtumoren (22–54% gegen 38,7% und 3,2% respektive). Die mit 2,5% auffallend niedrige Werte wurden für das Auftreten von *PTEN*-Mutationen an Brusttumoren, im Vergleich zu Werten in der Literatur, 6–35%, festgestellt [41, 235].

Die Ergebnisse der Datenbankanalyse der Akt1-E17K-Mutation im Vergleich zu den publizierten Daten zeigte insgesamt niedrigere Werte, jedoch vergleichbare Tendenzen. Für *AKT1* ist eine mit 2,4% etwas höhere Gesamtmutationsfrequenz, im Vergleich zu 1,2% in dieser Analyse, publiziert [25]. E17K-Mutationen kommen laut Literatur in 5,9-8% aller

Mammakarzinome vor. Die Analyse dieser Arbeit zeigte lediglich 2,7%. [9, 25, 35, 40, 123, 137] Jedoch wurden die teilweise hohen Mutationsraten an *AKT1* in Brusttumoren wurden wegen Überschätzung früherer Häufigkeitsstudien bereits diskutiert [201, 205]. Die vergleichsweise hohen Werte der Hirnhäute entsprechen den publizierten Werten (6% gegen 7,7%). In den Daten der COSMIC-Datenbank fand sich kein Hinweis auf das Auftreten einer E49K-Mutation an Akt1, die in einer kleinen Zahl an Blasenkarzinomen gefunden wurde. [9, 25, 35, 40, 123, 137]

Trotz der vergleichsweise niedrigen Mutationsfrequenz von *AKT1*, unterstreicht das überwiegende Vorkommen der E17K-Mutation die klinische Relevanz, besonders wenn die hohen Inzidenzen- und Mortalitätsraten von Krebserkrankungen berücksichtigt werden. Dieses Ergebnis wird gestützt durch Hochrechnungen anderer Autoren, die annehmen, dass 26.000 Tumoren mit einer Akt1-Mutation pro Jahr in den USA auftreten. Des Weiteren betont das häufige Auftreten dieser Mutation, dass Akt1 ein gutes Ziel für zielgerichtete Therapie mit spezifischen Inhibitoren repräsentiert. Mehrere Veröffentlichungen haben, wie die beschriebene Datenbankanalyse gezeigt, dass die Mutation der Glutaminsäure (Position 17) zu einem Lysin (E17K, c.49G>A) in verschiedensten Krebsarten zu finden ist. Die Ergebnisse dieser Analysen unterstreichen die klinische Relevanz der in der vorliegenden Arbeit analysierten E17K-Mutation. [35]

AKT1-Mutationen werden als putativer Biomarker für eine individualisierte Medizin angesehen. Kürzlich wurde z.B. ein Mutationsanalyse-System, multi-analyte panel (MUT-MAP), entwickelt. Dies dient der Erfassung von 120 somatischen Mutationen in elf Genen von therapeutischem Interesse, hierunter waren ebenso *AKT1* und *PIK3CA* [193]. Das Testen auf Mutationen von *AKT1* findet ebenso im Rahmen von Kits wie MiSeq TSCAP Panel, PGM Cancer Panel und Sequenom Oncocarta Panel statt und ist ein Gegenstand aktueller Forschung [160]. Die klinische Relevanz von Akt1-E17K Mutationen wird ebenso durch die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren gegen diese Mutation verdeutlicht [234]. Die in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene Bedeutung von Akt1-E17K für die Strahlenresistenz von Tumorzellen impliziert, dass insbesondere bei Patienten mit dieser Mutation eine Intensivierung der Therapie durch Kombination mit spezifischen Akt-Inhibitoren sinnvoll sein könnte. Darüber hinaus ist das Verständnis von mutiertem Akt1 nicht nur essentiell für die Behandlung von Tumoren, sondern ebenso relevant für die Ergründung des physiologischen und pathophysiologischen Ablaufs an diesem zentralen Punkt der Signaltransduktion.

5.2 Generierung von Akt1-Mutanten und Zelllinien

Viele der zu Akt1 durchgeführten Studien basierten auf der Hemmung von Akt1 mittels Inhibitoren oder siRNA-Experimenten und setzten diese Verminderung anstelle einer somatischen Aktivierung des Akt1 in Verbindung zu Signalwegen, wie z.B. der DNA-Reparatur. Besonders die zelluläre Antwort auf Bestrahlung im Kontext des PI3K/Akt Signalweges ist wenig erforscht. Im diesem Projekt wurde ein neuer genetischer Ansatz zur Erforschung der Bedeutung von Akt1 für die zelluläre Strahlenantwort verfolgt. Basierend auf im Labor vorhandenen humanen Akt1-WT-Konstrukten wurden mittels Mutagenese und Klonierung in retrovirale Verpackungsplasmide (pBEC) verschiedene Akt1-Varianten erzeugt. Anhand der gewählten Varianten sollte das Verhalten von Akt1 im physiologischen sowie pathophysiologischen Zustand, wie z.B. in Tumorzellen, näher charakterisiert werden. Die Varianten wurden dabei so gewählt, dass eine erhöhte bzw. verminderte Aktivierung durch unterschiedliche Proteinmodifikationen erzielt wurde. So zeigten die Akt1-Varianten E17K, myr und TDSD eine erhöhte Kinaseaktivität; E17K und myr sollten hierzu aber auf die Aktivierung durch PDK1 und eine Kinase der PDK2-Familie angewiesen sein, während TDSD eine Aktivierungs-assoziierte Phosphorylierung imitierte. Demgegenüber sollte TDSD dieselben Bindeeigenschaften zu PIP₃ und damit zur Membran wie der WT aufweisen. Wogegen für E17K und besonders myr eine deutlich erhöhte Membran-Lokalisation postuliert wird. Die übrigen Mutanten K179A und R25C wurden ebenfalls zuvor als inaktivierend bzw. hemmend beschrieben. Keine bisherige Studie vereinte dieses Set an Akt1-Mutanten, insbesondere die Einbeziehung einer klinisch relevanten Mutante und unter Berücksichtigung der Effekte nach Bestrahlung. [5, 7, 18, 28, 165, 214, 215]

Die für das Kinase-Assay verwendeten Mutanten nutzten Daten aus der Literatur sowie der im Laufe dieser Doktorarbeit-betreuten Masterarbeit von Rabea Madel (2014). Die hier verwendete Mutante T308A schließt durch die Substitution von Threonin 308 durch Alanin eine Phosphorylierung sowie die damit assoziierte Aktivierung aus. Analog war bei der Mutante S473A das Serin 473 nicht phosphorylierbar. [5, 7, 18, 188]

Die Ergebnisse zeigten positive Transformanten für mindestens eine Probe pro Konstrukt. Diese wurden sowohl auf Grund ihres Restriktionsmusters nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen, als auch durch Sequenzierung des gesamten Akt1-Genfragments bestätigt.

Eine erfolgreiche Transduktion mit Expression der Fusionsproteine wurde durch die grüne Fluoreszenz des Proteins eGFP sichtbar und war im Fluoreszenzmikroskop und mittels Durchflusszytometrie nachweisbar. Die grüne Fluoreszenz lag mit ca. 120-fach erhöhten Werten deutlich über den nicht-transfizierten Kontrollzellen. Die Transduktion der

MEF -/- gestaltete sich erheblich schwieriger als die Transduktion der TrC1, da diese Zellen eine deutlich geringere Zellteilung hatten. Dies hatte zur Folge, dass die Integration der Viren-DNA seltener stattfand. Das Resultat war eine geringere Ausbeute positiver Zellen und eine leicht reduzierte Expression des eGFP-Fusionsproteins im Vergleich zu TrC1.

Die Expression des Fusionsproteins blieb auch in der Langzeitentwicklung stabil. So entwickelte sich lediglich bei den TrC1 nach vier Wochen in Dauerkultur ohne Puromycin eine kleine Population Zellen die kein Fluoreszenzsignal aufwiesen. Diese negativen Zellen können z.B. beim Sortieren und während der Selektion, auf Grund der Methode nicht vollständig entfernt werden. Sie vermehren sich während der langen Kulturzeit ohne Antibiotikum. Um diesem Phänomen vorzubeugen wurden die Zellsets immer wieder durch neu aufgetaute Kulturen ersetzt. Dies verhinderte auch eine mögliche Verbreitung von Zellen die ohne Selektionsdruck ein Gene-Silencing durchgeführt haben. Dies kann z.B. durch Veränderung der viralen Promotoren stattfinden. [148]

Zusätzlich zum Nachweis der Expression der gewünschten Fusionsproteine durch Fluoreszenzmessung wurde die Überexpression der eGFP-Akt Fusionsproteine mittels Western Blot Analysen überprüft. Die Western Blot-Analysen belegten die Überexpression ca. 87 kDa großer Akt1-eGFP-Fusionsproteine (Akt 60 kDa + eGFP 27 kDa); im Falle des myrAkt1-eGFP betrug die Größe des eGFP-Fusionsproteins auf Grund der fehlenden PH-Domäne nur ca. 70 kDa [204]. Diese Werte lagen sichtbar über den 60 kDa des endogenen Akt und konnten so mit Hilfe von Akt-Antikörpern deutlich identifiziert werden. Bei den Western Blot und durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich der Erfolg der Selektion und des strikten grünen Fluoreszenz-basierten Sortierens der Zellen: Alle Varianten erreichten ein nahezu gleiches zelluläres Niveau der Proteinexpression, die im Schnitt einer 10-fachen Expression des endogenen Akt in den TrC1 entsprach.

5.3 Effekte der Akt1-Mutationen auf Mutanten-exprimierende Zellen

Nach erfolgreicher Generierung der Akt1-Mutanten-überexprimierender Zellen wurden diese bezüglich ihrer Eigenschaften analysiert. Zunächst wurde mittels Western Blot die Phosphorylierung am T308 und S473 getestet. Eine deutliche Phosphorylierung beider Positionen war bei myr sowohl in TrC1 als auch in MEF $-/-$ vorhanden. Auch E17K zeigte eine gegenüber dem WT verstärkte Phosphorylierung; allerdings war hier in beiden Zelllinien die Position S473 geringer phosphoryliert als das T308. Selbst die Akt1-WT Kontrolle zeigte erhöhte Phosphorylierungs-Signale. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsstudien der Akt1-Mutanten entsprachen den postulierten Phänotypen, so sollte myr und E17K auf Grund der verbesserten Membranbindung mehr phosphoryliert werden. [5, 7, 18, 28, 165, 214, 215]

Die verstärkten Signale des WT lassen sich durch die Anwesenheit von fetalem Kälber-Serum (FCS) im Medium erklären. Dieser Mediumszusatz beinhaltet verschiedenste Wachstumsfaktoren und andere Stimuli, die über Rezeptortyrosinkinasen den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren und die Stimulierung über PI3K und PIP₃ an Akt weiterleiten können [196]. Dies gilt auch für die überexprimierten Proteine. So wird Akt1-WT auf seinem „natürlichen“ Weg phosphoryliert. Zusätzlich liegt das Protein durch den CMV-Promotor in großen Mengen in der Zelle vor. R25C zeigte, wie erwartet, keine nennenswerte Phosphorylierung. Die TDSD-Mutation imitierte zwar die Phosphorylierung an den jeweiligen Stellen, dies reichte aber nicht aus, um die primären Antikörper zu binden. Daher gab es bei dieser Mutante kein Phosphorylierungssignal in der Western Blot Analyse.

Die Phänotypisierung der Akt1-eGFP-exprimierenden Zellen wurde anhand ihrer Proliferation, Viabilität und metabolischen Aktivität (zusammengefasst als „zelluläre Aktivität“ im Folgenden) fortgeführt. Die Kontrolle mit dem Leervektor TrC1 pBEC, wies eine moderate Entwicklung der zellulären Aktivität im Zeitverlauf der Zellkultur und Zellvermehrung auf, die auf ein endogen aktives Akt1 zurückzuführen ist. Die TrC1 WT Überexpressionskontrolle war, wie zu erwarten, aktiver. In den beiden dominant aktiven Akt1-Varianten war eine gesteigerte zelluläre Aktivität zu finden. Diese war hochsignifikant in TrC1 myr, der Variante mit direktem Membrananker. Interessanterweise war die zelluläre Aktivität von TrC1 E17K, das eine erhöhte PIP₃ Koordination aufweist, signifikant gesteigert. Wie zu erwarten entsprach bei eingeschränkter PIP₃ Koordination die Proliferation der dominant negativen TrC1 R25C den Werten des pBEC. Die R25C-Variante schien aber auch keine hemmenden Eigenschaften bezüglich der Proliferation aufzuweisen. Das Ausmaß der Aktivität der TrC1 K179A war ebenso nahezu unverändert bezüglich Proliferation und metabolischer Aktivität. Überraschenderweise zeigte die TDSD-Mutation, trotz ihrer postuliert konstitutiv aktiven Kinase-Domäne, keine Steigerung der Proliferation. Diese

5 Diskussion

Beobachtung war an dieser Stelle nicht vollkommen erklärbar. Eine Vermutung ist, dass die Bindung zur Membran und damit die Nähe zu potentiellen proliferationsfördernden Substraten, eine essentielle Voraussetzung für eine Steigerung der Proliferation darstellt.

Die Beobachtungen einer gesteigerten Proliferation von TrC1 E17K bzw. TrC1 bestätigt Daten aus der Literatur, die mit MCF-7 und MC10-A Zellen erzielt wurden. Erhöhte Aktivität und Proliferation der TrC1 E17K und myr ist mit der Literatur vereinbar. [9, 15, 50]

Die Proliferation der MEF $-/-$ Zelllinien wies erhebliche Unterschiede bei der Zellkultivierung auf. Interessanterweise war MEF $-/-$ E17K die am stärksten proliferierende Zelllinie. Im Vergleich zu MEF $-/-$ myr teilten sich die Zellen ca. viermal so schnell und ca. zehnmal so schnell wie die MEF $-/-$ WT. Es fiel auf, dass MEF $-/-$ myr im Gegensatz zu TrC1 myr keinen erheblichen Proliferationsvorteil besaß.

Insgesamt war auffällig, dass die Überexpression von Proteinen mit postulierte gesteigerter Aktivität die Proliferation und Vitalität der untersuchten Zellen beeinflusste, nicht aber die inaktivierenden Mutanten. Dies suggeriert, dass die Aktivität des endogenen Akt1 möglicherweise ausreicht, einen potentiell negativen Effekt der aktivitätsgeminderten Varianten zu kompensieren.

Der ausgeprägte Effekt von E17K auf die Proliferation der MEF $-/-$ Zellen *in vitro* spiegelte sich in der deutlich erhöhten Tumorigenität dieser Zellen im Mausmodell *in vivo* wider. Die Tumorigenität und das Wachstum waren in E17K-überexprimierenden MEF $-/-$ Zellen gegenüber Akt1-profizienten murinen embryonale Fibroblasten gesteigert. Da da MEF $-/-$ pBEC und MEF $-/-$ WT keine Tumore bildeten, konnten nur diese Zellen als Kontrolle genutzt werden. Die E17K-Variante löste außerdem eine typische Fibroblasten-ähnliche Anordnung im Tumorgewebe auf und ließ diese in den Tumorschnitten deutlich dichter und ungeordneter wirken. Auch in MCF-7 und MC10-A Brustkrebs-Zelllinien, zeigten Akt1-E17K-überexprimierende Zellen ein erhöhtes Wachstum im Mausmodell [15, 50]. Interessanterweise beschleunigt eine kürzlich neu entdeckte andere Mutation der PH-Domäne, die E49K Mutation, die in Blasen-Tumoren-Zellen gemeinsam mit E17K auftrat, ebenfalls deren Proliferation, jedoch in geringerem Maße als E17K. Dies unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass die aktivierungsassoziierte PH-Domänen Mutation E17K die Zellproliferation steigert. [9]

TrC1 konnten auf Grund von fehlendem Anwachsen und nachfolgender Entzündungsreaktion nicht weiter *in vivo* untersucht werden. So schien die Tumorigenität der TrC1 Wildtyp-Zellen von vornherein nicht hoch genug zu sein, wie auch in der Literatur beschrieben.

Diese Ergebnisse unterstreichen im *in vivo* Model die die hohe Tumorigenität und erhöhte Proliferationsrate von E17K-Mutationen. Zusätzlich wird die Relevanz der E17K-Mutationen

in Bezug auf Tumorprogress und die Notwendigkeit der zielgerichteten E17K-Therapie bestätigt. [234]

5.4 Modulation der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung durch Expression der Akt1-Mutanten

Nachdem die Phänotypisierung der transduzierten Zellen abgeschlossen war, konnte unter Berücksichtigung der Aktivität und der Proliferation der Zellen mit Experimenten bezüglich der zellulären Strahlenantwort begonnen werden. Hierbei wurden besonders die Unterschiede der Mutanten bezüglich der Strahlensensitivität analysiert. Es stellte sich die Frage, ob aktivierende Akt1-Mutationen das Überleben der Zellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung modulierten. Hierzu wurden zunächst Kurzzeittests zum Zellüberleben von TrC1 mittels KV- und WST-1-Assays nach Bestrahlung durchgeführt. Diese Assays ermöglichten indirekte Aussagen über das Zellüberleben und die Zellproliferation anhand der Veränderungen der Anzahl der vitalen Zellen in den Wells der Zellkulturtestplatten. Folglich wurde das Ergebnis durch die Proliferationsrate der jeweiligen Zelllinie beeinflusst. Da die TrC1 in den Wachstumsversuchen signifikante Unterschiede in der Zellteilungsrate aufwies, mussten die Ergebnisse auf die Werte der unbehandelten Zellen derselben Zelllinie normiert werden.

Nach der Bereinigung der Werte mit denen der unbehandelten Zellen erwies sich die hochproliferative Variante TrC1 myr überraschend als signifikant empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung als TrC1 WT. Im Gegenteil dazu präsentierte sich die ebenfalls stärker als der WT proliferierende TrC1 E17K Variante im KV- und WST-1-Assay als signifikant resistenter gegenüber Bestrahlungseffekten. Auch die deutlich langsamer proliferierende TrC1 TDSD zeigte signifikant erhöhte Resistenz 72 h nach 5 Gy. Die postulierte negativen TrC1 R25C und TrC1 K179A hingegen wichen nicht signifikant von den Werten der TrC1 WT Kontrolle ab. Die negativen Varianten schienen die Zellen in Bezug auf ihre Zellteilung nach Bestrahlung nicht zu beeinträchtigen. Eine potentielle Erklärung hierfür stellt das unveränderte endogene Akt1 der Zellen dar.

Es stellte sich allerdings die Frage warum TrC1 myr im Vergleich zu TrC1 WT weniger resistent schien. Eine mögliche Erklärung hierzu wäre, dass schnell proliferierende Zellen anfälliger gegen DNA-Schäden sind und schneller zu genomischer Instabilität tendieren. Gegen diese Interpretation spricht allerdings, dass TrC1 E17K eine ähnlich hohe Proliferation zeigen wie TrC1 myr, aber dennoch eine deutlich geringere Inhibition des Zellwachstums durch Strahlen-induzierte Schäden erfuhren.

5 Diskussion

Unterschiede in der Zahl lebender Zellen kann außer durch einen Zellzyklusarrest mit verminderter Proliferation auch durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem strahleninduzierten Zelltod sein. Daher wurde getestet ob sich die Varianten im Ausmaß des strahleninduzierten Zelltodes unterscheiden. Um einen Einblick in das Ausmaß des strahleninduzierten Zelltodes zu gewinnen wurde zum einen das mitochondriale Membranpotential in TrC1 72 h nach 5 Gy gemessen. Der Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials ist ein Indikator für apoptotische Zellen. Zusätzlich wurde der Anteil an Zellen in der subG1 Phase des Zellzyklus (apoptotische Zellen) und eine Exclusion-PI-Färbung durchgeführt. Letztere diente der Analyse toter Zellen. In allen TrC1 war ein Anstieg apoptotischer und toter Zellen nach Bestrahlung zu detektieren. Insbesondere wiesen TrC1 myr und TrC1 K179A eine signifikant, annähernd vierfach, gesteigerte Anzahl toter Zellen nach Bestrahlung auf.

Die Erhöhung des Zelltodes nach Bestrahlung ist eine mögliche Erklärung für die geringere Zahl der vitalen TrC1 myr und TrC1 K179A nach Bestrahlung in den vorangegangenen Proliferationsassays.

Eine klinisch relevantere Aussage zur Strahlensensitivität kann durch sogenannte Koloniebildungs-Assays erzielt werden. Dieser Assay demonstriert das Überleben einer einzelnen Zelle und ihre Fähigkeit sich nach einer Behandlung durch Teilung eine Kolonie zu bilden. Zwar ist die Proliferation ein Bestandteil der Detektion der überlebenden Zelle (die monoklonaren Kolonien wurden ab einer Zellanzahl von 50 als Kolonie gezählt), die Größe der Kolonie wurde aber bei der Kalkulation des Gesamtüberlebens einer Anzahl von Einzelzellen nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse des klonogenen langfristigen Überlebens nach ionisierender Bestrahlung korrelierten mit den Ergebnissen des KV- und des WST-1 Assay: Während die Überexpression von WT eine geringe Resistenz-vermittelnde Wirkung in TrC1 hatte, zeigten E17K und TDSB im Vergleich zu den WT-exprimierenden Zellen eine ausgeprägte Schutzwirkung in Kurz- und Langzeitüberlebensexperimenten. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die myr Variante überraschenderweise bemerkenswert empfindlich auf ionisierende Strahlung. Die negativen Mutanten TrC1 K179A und TrC1 R25C zeigten im Vergleich zu TrC1 WT geringe Unterschiede. Möglicherweise kompensiert hier das endogene Akt1 die Auswirkungen der negativen Varianten.

Ursprünglich sollten die MEF $-/-$ genutzt werden, um Effekte des endogenen Akt1 auszublenden. Da diese Zellen kein endogenes Akt1 besaßen, sollten die Effekte der negativen Mutanten im Vergleich zum überexprimierten Akt1 WT in diesen Zellen deutlich signifikanter ausfallen. Bei dem Versuch mit den MEF $-/-$ Proliferations- oder Überlebenstests

5 Diskussion

durchzuführen, taten sich zwei Schwierigkeiten auf: Zum einen war die Proliferation der Zellen so unterschiedlich, dass die KV- und WST-1-Experimente keine verwertbaren Daten lieferten. Zum andern war die Effizienz der Plattierung der Zellen sehr gering und lag bei unbehandelten Zellen teilweise unter 3% bei den Test-Koloniebildungs-Assays. An dieser Stelle war es nicht möglich, das Überleben dieser Zellen nach Bestrahlung zu ergründen und folglich auch nicht die kombinatorische Behandlung mit Akt-Inhibitoren und IR zu untersuchen.

Es stellte sich die Frage, ob es möglich wäre die Verbesserung des Zellüberlebens der Akt1-Mutanten-exprimierenden Zellen durch kurzzeitige Inhibition von Akt aufzuheben. Diese Radioresistenz-fördernden Effekte der Akt1-Varianten könnten einen direkten oder einen chronischen Effekt darstellen. Die Hemmung der gesteigerten Radioresistenz durch eine pharmakologische Kurzzeit-Behandlung von Akt würde in diesem Fall gegen einen chronischen Effekt der Expression der mutierten Akt1-Form sprechen. Um dies zu untersuchen, wurden zwei Inhibitoren in Kombination mit verschiedenen Strahlendosen eingesetzt und das klonogene Überleben der verschiedenen Akt1-Varianten-exprimierenden TrC1 untersucht. Die hemmende Wirkung der Inhibitoren auf die Phosphorylierung von Akt-Substraten wurde zuvor in den Akt1-Mutanten-exprimierenden Zellen bestätigt. Bei MK-2206 handelt es sich um den bekanntesten allosterischen Akt-Inhibitor [15, 50]. Dieser ist in der Lage die Akt-Phosphorylierung je nach Zelltyp innerhalb von 2 h um mehr als 98% zu hemmen. Diese erholte sich 24 h nach Entfernen des Inhibitors wieder [50].

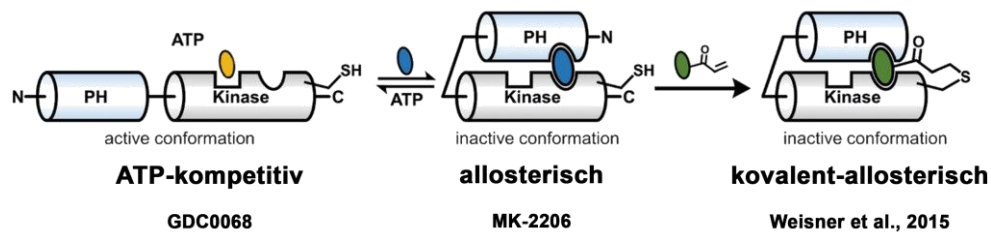


Abb. 5.4-1 Schematische Darstellung der Inhibition von Akt mit verschiedenen Wirkstoffen

Diese Abbildung verdeutlicht die Wirkmechanismen der drei Akt-Inhibitor Untergruppen. GDC0068 als ATP-kompetitiver Inhibitor verdrängt ATP aus der Substrattasche. Der allosterische Inhibitor MK-2206 fixiert die PH-Domäne an der Kinase-Domäne und erschwert so deutlich die aktivierende Phosphorylierung an der Membran. Eine Weiterentwicklung der allosterischen Inhibitoren stellen die kovalent-allosterischen Wirkstoffe dar. Als Teil einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rauh des Max-Planck-Instituts, Dortmund wurden diese im Jahr 2015 untersucht und veröffentlicht. Die Abbildung wurde basierend auf diesem Artikel erstellt. Daten aus [226]

Die Wirkung von allosterischen Inhibitoren sollte besonders bei PIP₃- bzw. PH-Domänen-abhängiger Aktivierung erheblich sein (z.B. bei einer Akt1-E17K), da dieser Inhibitor durch

die Faltung der PH-Domäne an die Kinase-Domäne das Protein hemmt (vgl. Abb. 5-4-1). Die artifizielle Akt1-TDSD ist unabhängiger von ihrer PH-Domäne und benötigt keine Phosphorylierung. Die Inhibition der TrC1 TDSD sollte daher in erster Linie Effekte durch die Inhibition des endogenen Akt entstehen.

GDC0068 konkurriert als kompetitiver Inhibitor mit ATP um die Bindetasche in der Kinase Domäne. Der Inhibitor zeigt eine vielversprechende Inhibition von Akt Tumoren. Die Inhibition durch diesen Wirkstoff findet unabhängig von Mutationen direkt an der ATP-Bindestelle statt. GDC0068 verhindert die Koordination des ATP kompetitiv und hemmt direkt die Funktion der Kinase. [24, 130, 232]

Die Effekte auf das Überleben des TrC1-Sets wurden bei 2 μ M der beiden Inhibitoren im Koloniebildungs-Assay bei bis zu 10 Gy IR verwendet. Die Inhibition von Akt zeigte in allen Zelllinien mit beiden Inhibitoren eine deutliche Verschlechterung des Langzeitüberlebens nach Bestrahlung. Die beiden Varianten (TrC1 E17K, TrC1 TDSD) die bereits verbesserte Resistenz gegen IR zeigten, hatten zwar tendenziell ein leicht erhöhtes Überleben im Vergleich zu TrC1 WT, insgesamt rückten aber die Überlebenskurven näher an die anderen Zelllinien heran. Das bedeutet dass die Inhibitoren in der Lage sind den Akt1-vermittelten resistenzfördernden Effekt der Mutanten Akt1-E17K und Akt1-TDSD zu antagonisieren.

Andererseits zeigte TrC1 myr nach Gabe der Inhibitoren nun eine dem TrC1 WT vergleichbare Resistenz wie TrC1 WT. Die Differenz des unbehandelten Überlebens der TrC1 myr in Bezug auf das Überleben mit Inhibitor nach IR fiel im Vergleich zu anderen Zelllinien kleiner aus. Ein möglicher Grund hierfür stellt die Tatsache da, dass TrC1 myr auch ohne Inhibition ein ohnehin schlechtes Überleben zeigte und eine weitere Verschlechterung nur in geringerem Umfang stattfinden konnte. Da myr eine künstliche Variante darstellt, ist diese Beobachtung allerdings für die Überlegungen zum klinischen Einsatz von Akt-Inhibitoren in Kombination mit IR weniger relevant.

Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass bei TrC1 WT, TrC1 E17K und TrC1 TDSD ein größeres Potential der Inhibition von Akt1-vermittelter Resistenz bestand und daher dort auch die größeren Unterschiede im Langzeitüberleben erreicht werden konnten. Dies spiegelten sowohl die Versuche mit MK-2206 als auch mit GDC0068 wieder. Was die Resistenzverminderung gegen IR betrifft schien MK-2206 bei gleicher Konzentration besser zu wirken. Die nur zweistündige Behandlung mit den Inhibitoren vor der Bestrahlung stellt einen ersten Hinweis für eine direkte Akt-vermittelte Strahlenresistenz durch die aktiven Mutanten E17K und TDSD dar.

Aktuelle Studien zeigen, dass der PI3K/Akt-Signalweg weiterhin ein aktuell stark beforschtes Forschungsthema in der Onkologie darstellt. Dabei stellt die Überlebenskinase Akt ein

interessantes therapeutisches Target für die Tumorbehandlung dar [53, 127, 216]. Dabei handelt es sich nicht um das Bestreben der Entwicklung von Akt-Inhibitoren für die monotherapeutische Anwendung, sondern eher die Erforschung und das Anwenden kombinatorischer Effekte mit bewährter Chemotherapie oder Bestrahlung. Es ist bereits bekannt, dass bei anderen zielgerichteten Tumorthérapien, wie gegen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit Trastuzumab, eine Kompensationsreaktion folgen kann, die die Aktivität von nachgeschalteten und parallelen Signalwegen erhöhen kann [21, 103, 198]. So würde das in vielen Signalwegen zentral verankerte Akt einen sinnvollen Ansatzpunkt für eine Kombinationstherapie mit mehreren zielgerichteten Inhibitoren darstellen, um diese Kompensationsreaktion zu mildern und die Therapie zu optimieren. Ein wichtiger Fokus liegt dabei auf dem Einsatz von Akt1 Inhibitoren kombiniert mit einer Strahlentherapie. [42, 54, 236]

Außerdem befassen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit dem Design von Inhibitoren mit neuen Wirkmechanismen e.g. E17K spezifisch oder MK-2206-ähnlichen allosterischen Inhibitoren. Interessant sind dabei möglicherweise auch kovalent-allosterische Inhibitoren. Diese werden irreversibel an Akt gebunden und weisen daher eine stärkere Inhibition auf. Die Unterstützung der FDA in der Entwicklung von Akt1 Signalweg assoziierter Inhibitoren, wie bei dem Inhibitor AR 42, unterstreicht diese Entwicklung. Somit steht zu erwarten, dass zukünftig wirksame Akt1-Inhibitoren zum kombinierten Einsatz mit ionisierender Strahlung zur Verfügung stehen werden. [76, 121, 226, 234]

5.5 Effekte der Akt1-Mutationen auf die DNA-Reparatur

Im Anschluss an die Überlebens-Assays wurden die Effekte der Mutanten auf die DNA-Reparatur überprüft. In weiteren Experimenten konnten auch die MEF $-/-$ Zelllinien genutzt werden, da die meisten Versuche auf Fluoreszenzbildern von fixierten Zellen basierten und die Proliferations- und Plattierungs-bedingten Probleme der MEF $-/-$ hier nicht ins Gewicht fielen.

Methoden zur Erfassung von DSB beruhen auf der Tatsache, dass viele Reparaturproteine und Reparatur-assoziierte Proteine, wie γ -H2.AX, 53BP1 und RAD51 sich an der Lokalisation der DNA-Schädigung ansammeln [57, 85, 112, 134, 159, 168, 176]. Die Anzahl von DNA-DSB und somit die Anzahl der Foci ist abhängig von der applizierten Strahlendosis. Pro Gray werden etwa 14,7 Foci-Anzahl pro Zellkern verursacht. Aufgrund des proportionalen Verhältnisses zwischen der Anzahl an DSB und γ -H2.AX-Foci-Anzahl bietet sich eine indirekte Möglichkeit, um die Kinetik der Reparatur der durch ionisierende Strahlen verursachten DSB zu beurteilen [159, 171, 194]. Nach einer Bestrahlung mit 1 Gy entstehen

etwa 2000 Veränderungen an Basen, 1000 DNA -Einzelstrangbrüche und 35 DSB, was 15-19 γ -H2.AX-Foci pro Zellkern entspricht [8, 141, 179, 197]. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass manuelles Zählen zeitaufwendig und durch die auswertende Person abhängig und daher ungenau ist, während automatisierte Computeranalysen eine bessere Empfindlichkeit, Vergleichbarkeit und Konsistenz erreichten [12, 26, 34, 37, 90, 91, 180, 229]. So wurde das Makro "Focinator" als ein Makro für ImageJ, einem Bildverarbeitungsprogramm, entwickelt. Es konnte bewiesen werden, dass der Focinator ein valides und schnelleres Werkzeug für die automatisierte quantitative und qualitative Analyse von Foci ist. Weitere Vorteile, Erklärungen der Bedienoberfläche und der Nachweis von Benutzerfreundlichkeit sowie Validität sind der Publikation zu entnehmen. [79, 157, 195]

Durch nicht erkannte überlappende γ -H2.AX-Foci kann es schwierig sein, diese mit DSB zu korrelieren. Besonders fehleranfällig ist diese Methode bei hohen Bestrahlungsdosen, kürzeren Reparaturzeiten und erhöhter Foci-Größe. Diese Fehlerquellen wurden durch das Einsetzen einer validen Software sowie das Einbeziehen der Intensität der Foci zur Auswertung minimiert. [26, 37]

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Akt1-Mutationen auf die DNA-Reparatur nach 3 Gy Bestrahlung mit einem γ -H2.AX-Assay im Zeitverlauf vor sowie nach 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 sowie 24 h durchgeführt. Zur Auswertung der Reparaturkinetik wurde der selbst etablierte Algorithmus „Focinator“ eingesetzt [157]. Abhängig von der untersuchten Variante waren unterschiedliche Effekte bei den Zellen zu erkennen. Alle Zellvarianten der PH-Domänen- und Kinase-Domänen-Mutationen der TrC1 erreichten 30 min nach Bestrahlung mit 3 Gy die höchste Anzahl an γ -H2.AX-Foci als Surrogatvariable für DNA-DSB. Nach 24 h waren bei allen Mutanten nahezu alle γ -H2.AX-Foci verschwunden, was als Zeichen für stattgefundene Reparatur gilt. Die γ -H2.AX-Assays wurden alle nach 3 Gy Bestrahlung durchgeführt. Zusätzlich wurden auch 0,5 und 1,5 Gy untersucht. Es stellte sich heraus, dass für die Messung der Reparaturkinetiken eine höhere Zahl initialer Schäden die Unterschiede zwischen den Mutanten besser darstellte. Die Kombination der hohen Mikroskopauflösung und der großen flachen Form der murinen Zellkerne ermöglichte auch bei 3 Gy eine klare Abgrenzung der einzelnen Foci.

TrC1 pBEC, TrC1 myr, TrC1 K179A und TrC1 R25C reparierten die Foci ähnlich wie die Kontrolle, TrC1 WT. Dagegen wies interessanterweise TrC1 E17K eine signifikant erniedrigte Anzahl an γ -H2.AX-Foci-Anzahl und somit eine beschleunigte Reparatur auf. Ebenso hatte TrC1 TDSB eine signifikant erniedrigte Anzahl an γ -H2.AX-Foci, besonders 4 h nach Bestrahlung. Insgesamt zeichneten sich die Zellen durch eine sehr langsame Reparatur der γ -H2.AX-Foci aus. Im Falle der TrC1 Zelllinien könnte dies durch genetische

Veränderungen begründet werden, da viele Tumorzelllinien Veränderungen z.B. der p53- und auch der DNA-PKcs Gene besitzen. Leider gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine Sequenzierungsdaten, Genotypisierung oder Proteomanalysen dieser Zelllinie.

Die MEF $\Delta\Delta$ Varianten MEF $\Delta\Delta$ pBEC, MEF $\Delta\Delta$ R25C, MEF $\Delta\Delta$ K179A zeigten ähnliche Reparaturkinetiken wie MEF $\Delta\Delta$ WT. MEF $\Delta\Delta$ E17K und MEF $\Delta\Delta$ TDSB hatten ebenso wie bei den TrC1-Varianten eine signifikant schnellere Reparatur. Hingegen stach MEF $\Delta\Delta$ myr nicht durch seine Reparatur hervor, sondern durch eine im Gegensatz zu allen anderen Varianten verzögerte Entwicklung der γ -H2.AX-Foci-Anzahl mit einem Maximum bei einer Stunde. Ebenso war die Abnahme der Foci langsamer. Dies könnte auf eine verlangsamte Reparatur oder mehr proliferationsbedingte DNA-DSB hinweisen.

Die Reparaturkinetiken passen zu bereits postulierten Mechanismen, bei denen abhängig von der Zelllinie entsprechend 85% der IR-induzierten DNA-DSB innerhalb von 2-4 h unabhängig von ATM repariert werden [100]. Der restliche Anteil wird langsamer, ATM-abhängig, repariert [82]. Die Validität der Daten wird weiter durch das Erreichen von publizierten Foci-Werten von etwa 15-19 Foci-Anzahl pro Nucleus pro 1 Gy unterstrichen. Zusätzlich zeigte sich die Entwicklung einer vorbeschriebenen linearen Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen der Anzahl an Foci-Anzahl pro Zelle und der angewendeten IR-Dosis. Das Eintreten von maximaler Foci-Anzahl und Intensität nach 30 min nach Bestrahlung entspricht publizierten Daten. [8, 141, 179, 197]

Hintergrundrauschen in Bildern kann Fehler in der Auswertung verursachen, dies wurde jedoch durch saubere Ausführung der Methodik sowie das individuelle Anwenden der Einstellungen des Focinators auf die jeweiligen Versuche kontrolliert. Die Parameter wurden so eingestellt, dass die Qualität des Bildes nicht eingeschränkt wurde und die Informationen des Bildes nicht verändert wurden. [26, 34, 90, 180, 229]

Betrachtet man die Kinetik der weniger aktiven Akt1-Varianten erneut, zeigt sich, dass auch hier nach 8 bzw. 24 h nahezu alle DNA-DSB repariert waren. Dies deckt sich mit der Beobachtung von DiBiase *et al.*, dass in Zellen mit Defekten im D-NHEJ die DSB-Reparatur zwar langsamer verläuft, mit der Zeit jedoch fast alle DSB repariert werden. Dies spricht dafür, dass in solchen Fällen alternative Reparaturwege wie HR oder B-NHEJ greifen. [55, 145, 192]

Der Nachteil eines Protein/Antikörper-basiertem Assays ist, dass dieses nur indirekt DNA-Schäden abbildet. So könnte beispielweise ein Experiment mit einem ATR Inhibitor und 1 Gy durchgeführt werden. Die Anzahl der Doppelstrangbrüche wäre mit und ohne Inhibitor gleich, da aber durch die Inhibition der ATR eine der Kinasen der H2-Histone fehlen würden, wären die initialen γ -H2.AX-Foci mit Inhibitor deutlich niedriger. Aushilfe schafft hier ein direktes

DNA-Schadens Assay [36, 66]. Besonders weit verbreitet sind die Methoden der Puls-Feld-Elektrophorese und des Comet Assays. Auf Grund der Probenanzahl und Vielfalt wurde in dieser Arbeit das Comet Assay genutzt.

Die Effekte der Akt1-Mutationen auf DNA-DSB-Reparatur nach Bestrahlung wurden mit Hilfe einer speziellen Variante des Comet Assays untersucht. Das neutrale Comet Assay ermöglicht mit einer Dosis von 40 Gy (ca. 1400 DNA-DSB) die Analyse der DNA-Fragmentierung, wobei in erster Linie die Menge von Doppelstrangbrüchen in die Evaluation einfließt. Der alkalische Comet Assay misst im Gegensatz dazu auch die durch Einzelstrangbrüche beeinflusste DNA-Wanderung in einem Agarosegel, da hier die Kernmembran stärker geöffnet wird.

Die Kometenschweif-Ausgangswerte waren ohne Bestrahlung bei allen Zellvarianten ähnlich ausgeprägt. Nach Bestrahlung mit 40 Gy stieg nach 30 min die Anzahl der Pixel der Kometenschweiffläche um etwa das Dreifache. Es fiel auf, dass nach 30 min TrC1 E17K die niedrigste Anzahl an Pixeln aufwies und somit die niedrigste Anzahl an DNA-DSB zu vermuten war, nicht jedoch bei MEF *-/-* E17K. Bei den Zellen fielen nach 30 min bei MEF *-/-* pBEC die niedrigsten und bei MEF *-/-* R25C die höchsten DNA-Fragmentierungen auf. Entweder hatte eine Reparatur bereits vor dem ersten Messzeitpunkt eingesetzt oder die Zellen waren resistenter gegen die Bestrahlung und es waren weniger DNA-DSB entstanden. Nach 4 h fiel wiederum eine schnellere Reparatur von TrC1 E17K auf, die nahezu Ausgangswerte erreichte. Etwas weniger schnell, dennoch signifikant schneller als der WT reparierte die TrC1 TDSB die strahleninduzierten DNA-DSB. Ebenso verhielt es sich nach 4 h bei den MEF *-/-*. Jedoch hatte MEF *-/-* myr nach 4 h kaum erkennbare Reparatur. Nach 24 h waren bei allen Zellvarianten die Ausgangswerte nahezu erreicht. Während die TrC1 keine signifikanten Unterschiede bei diesem Zeitpunkten aufwiesen, zeigten die MEF *-/-* signifikante Ergebnisse; MEF *-/-* E17K hatte bereits nach 4 h nahezu Ausgangswerte erreicht und die Größe der Kometenschweif veränderte sich nicht mehr. MEF *-/-* myr und MEF *-/-* K179A wiesen die höchste verbleibende Anzahl an DNA-DSB auf. Ebenso zeigte MEF *-/-* pBEC signifikant höhere Werte.

Die mit Hilfe des γ -H2.AX-Assay indirekt gewonnenen Ergebnisse ließen sich im Comet-Assay als Methode zum direkten Nachweis von DNA-DSB bestätigen. Lediglich myr-Akt1 zeigt hier eine noch weiter reduzierte Reparatur-Kinetik.

Der durchschnittliche Hintergrund, verdeutlicht in den unbestrahlten Proben, von 10.000 px kann aus verschiedenen Gründen entstanden sein. So kann z.B. die Agarose bei der Einbettung der Zellen zu warm gewesen sein. Dies könnte zu Hitze-bedingten Strangbrüchen geführt haben. Es stellt sich zusätzlich ein größeres Problem beim alkalischen Comet Assays

dar. Hierbei wurden verhältnismäßig wenige Strahlenschäden durch Dosen im einstelligen Bereich verursacht. Im Vergleich zu den 40 Gy beim verwendeten neutralen Comet Assay liegt es näher, dass der Lysepuffer zu hoch konzentriert war oder die Lyse zu lange durchgeführt wurde. Auch kann es sein, dass bei der Elektrophorese eine zu hohe Stromstärke genutzt wurde. Zudem war die genutzte Spannungsquelle nicht neu und möglicherweise nicht in der Lage eine so niedrige Stromstärke (5 mA) konstant zu liefern.

Um der Frage nachzugehen wie die DNA-DSB-Reparatur durch die aktiven Varianten E17K und TDSB beschleunigt wurde und warum *myr* diesen Phänotyp jedoch nicht zeigte, wurden Versuche mit Akt-Inhibitoren durchgeführt. Es wurden wie auch schon bei den Koloniebildungs-Assays der allosterische Inhibitor MK-2206 und der kompetitive Inhibitor GDC0068 verwendet.

Die Kontrollen ohne Inhibitor zeigten auch in nicht normierten Foci-Daten die observierte schnellere Reparatur bei E17K und TDSB. TrC1 E17K wies eine signifikant schnellere Reparatur bis zu 4 h nach Bestrahlung auf. Diese Tendenz wurde zwischen 4 bis 8 h nach Bestrahlung vermindert. Ein ähnlicher Reparaturverlauf war bei TrC1 TDSB zu erkennen. Nach der Inhibition mit dem allosterischen Inhibitor MK-2206 veränderte sich der Verlauf der Foci-Reduktion über die Zeit. Während TrC1 pBEC und *myr* weiterhin die gleichen Entwicklungen im Verlauf der Zeit abbildeten, veränderte sich die Antwort nach Bestrahlung, insbesondere bei TrC1 E17K. Beide Varianten zeigten bei zusätzlicher Verwendung des Inhibitors gleiche Verläufe wie die Kontrolle. Hingegen verlief die Foci-Anzahl von TrC1 TDSB ähnlich wie ohne den allosterischen Inhibitor.

Überraschenderweise führte die Inhibition mit dem kompetitiven Inhibitor GDC0068 zu einer Angleichung der Reparaturverläufe aller untersuchten Akt1-Varianten. Dieses Phänomen lässt sich durch die Wirkweise der beiden Inhibitoren erklären. MK-2206 faltet Akt und bindet die PH-Domäne an die Kinase-Domäne [92]. So kann Akt nicht mehr an die Membran koordinieren und eine Phosphorylierung wird unmöglich. Da Akt1-E17K auf seine verstärkte Phosphorylierung angewiesen zu sein scheint, war eine stark inhibierende Wirkung die Folge. Deswegen wurden die positiven Effekte in Bezug auf die DNA-Reparatur bei TrC1 E17K außer Kraft gesetzt. TrC1 TDSB hingegen erschien unberührt von der Wirkung des Inhibitors, da TDSB bereits im Vorfeld artifiziell aktiviert wurde und nicht für die Phosphorylierung an die Membran koordiniert werden musste. Dies erklärt, warum der kompetitive Inhibitor GDC0068 auch die Reparatur des TrC1 TDSB zurück auf das Niveau der TrC1 WT setzte.

Die Tatsache, dass die beschleunigte Reparatur durch Akt-Inhibitoren pharmakologisch inhibiert werden konnte, weist darauf hin, dass die DNA-Reparatur durch Akt1 beeinflusst

wurde. Darüber hinaus zeigten diese Experimente, dass die beschleunigende Wirkung des Akt1 kein chronischer Effekt zu sein scheint, da eine kurzzeitige Behandlung mit einem Akt-Inhibitor genügte, um die Reparatur zu „normalisieren“. Dies wurde bereits unter der Nutzung des Inhibitors in A549 und H460 Zellen, Lungenkarzinom-Zellen, gezeigt [214].

5.6 Subzelluläre Lokalisation von Akt

Die bislang im Rahmen des Promotionsprojektes durchgeführten Untersuchungen hatten deutliche Unterschiede in der Auswirkung der Aktivierungs-assoziierten Akt1-Varianten auf die Radiosensitivität von TrC1 gezeigt und diese mit Veränderungen in der Kinetik der DNA-DSB-Reparatur in Verbindung gebracht. Die Veränderungen der Reparatur-Kinetiken konnten auch in dem MEF -/- Set bestätigt werden. Besonders auffällig war es, dass die hoch phosphorylierten und stark proliferierenden Zelllinien mit E17K und myr nicht dieselben Phänotypen bezüglich ihrer Antwort auf Bestrahlung und ihrer Reparaturkinetiken zeigten. Diese beiden Varianten unterscheiden sich in der postulierten Interaktion mit zellulären Membranen: Während die E17K Variante mit Mutation in der PH Domäne ähnlich wie Akt1-WT nach wie vor über seine PH Domäne und damit PIP₃-abhängig zur Membran rekrutiert wird, weist myr Akt1 über eine Myristoylierung am N-Terminus einen direkten Membrananker auf. Es wird angenommen, dass E17K durch die Mutation zwar signifikant besser aber weiterhin reversibel zur Membran rekrutiert wird [40]. Die Bindung von myr Akt1 an die Membran ist dagegen wahrscheinlich irreversibel [172].

Um zu ergründen, ob die differentiellen Effekte dieser beiden Varianten auf die Strahlensensitivität durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Akt1-Varianten begründet sein könnten, wurden subzelluläre Lokalisationsexperimente durchgeführt.

Interessanterweise bestätigten die im Rahmen der vorliegenden Promotionsschrift durchgeführte Versuche mit dem TrC1- und dem MEF -/- -Set diese postulierten Phänotypen. Akt1-WT war vor der Bestrahlung ubiquitär in der Zelle inklusive des Zellkerns verteilt. Dies galt auch für E17K und TDS. Allerdings wies E17K eine erhöhte Lokalisation zur Membran auf. Dies war erkennbar durch die erhöhte Fluoreszenz entlang der Zellgrenzen, die durch die Aktin-Färbung gekennzeichnet waren. Dieser Effekt wurde bereits postuliert und als Grund und Voraussetzung der Aktivierung dieser somatischen Mutation des Akt1 beschrieben [40]. Die myr-exprimierenden Zellen wiesen hingegen deutlich weniger Fusionsprotein im Zellkern auf. Hauptsächlich war die Akt1-Variante im peripheren zytosolischen Bereich um den Zellkern zu finden. Die Vermutung lag nahe, dass das während der Translation mit einem Membrananker versehene Protein direkt an Membranstrukturen wie die des

endoplasmatischen Retikulums gebunden wurde. Diese Eigenschaft könnte auch direkt für das deutlich geringere Signal im Kern der myr-exprimierenden Zellen verantwortlich sein.

Eine Stunde nach Bestrahlung waren an der Lokalisation der Proteine keine Unterschiede zu erkennen. Nach 4 h sah man allerdings in WT und TDSD eine leichte Erhöhung der Membranlokalisation der Akt1-Varianten. E17K-exprimierenden Zellen zeigten hingegen, eine erhöhte Akkumulation im Zellkern und deutlich weniger Bindung des Proteins zur Membran. Die Erhöhung des Proteinlevels war bei den anderen getesteten Mutanten nicht erkennbar. Die Lokalisation des myr(-PH)Akt1 schien sich abhängig von der Behandlung mit IR nicht zu verändern. Dieser Unterschied der Varianten E17K und myr war bis zu diesem Punkt nicht postuliert und der erste Hinweis, weshalb myr exprimierende Zellen im Gegensatz zu E17K Zellen sensitiver gegenüber IR waren und keine verbesserte Reparaturkinetik aufwiesen. Auch die Beobachtung der im Kern vorhandenen TDSD-Mutante unterstützt diese Ergebnisse.

Interessanterweise werden E17K und myr in verschiedenen Publikationen als äquivalente Systeme beschrieben. Unsere Beobachtungen zeigten nun eindrücklich, dass keine Äquivalenz der beiden Akt1-Varianten besteht. Allerdings wird die Myristoylierung zumeist eine direkte irreversible Membranbindung beschrieben, die bereits während der Translation durchgeführt wird [172]. Dieser Unterschied kann für eine Lokalisations-abhängige Phosphorylierung von Akt1-Kinase-Substraten erhebliche Effekte besitzen. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass dies hinsichtlich der Bedeutung von Akt1 für die DNA-Reparatur essentiell ist.

Insgesamt deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch eine aktive Akt1-Variante im Nukleus positiv beeinflusst werden kann. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass Akt1-E17K in E3 Ubiquitin Proteinligase (NEDD4-1)-defizienten MEF Zellen zwar stark phosphoryliert vorliegt, aber nicht in den Kern gelangt. Erst die Expression von NEDD4-1 führte zu einem stark erhöhten Kernimport der Akt1-E17K [67]. Somit scheint die Ubiquitinylierung von Akt eine Voraussetzung für den Kern Import zu sein. Die Ubiquitin E3 Ligase NEDD4-1 ubiquitinyliert voll-phosphoryliertes Akt (Ph-T308/Ph-S473) nach der Aktivierung durch PDK1 und mTORC2 direkt an der Zellmembran und ermöglicht so den Kernimport. Dieser Vorgang könnte eine Erklärung für den gesteigerten Akt1-E17K Kernimport als Folge der aktivierenden Mutation und der Stimulation durch Bestrahlung darstellen. Zunächst steigert die Ubiquitinylierung die Bindung an die Kernmembran. Interessanterweise ist dies auch der Ort an dem Akt in erster Linie degradiert wird.

Auch für eine TDSD-Variante wäre dies denkbar. Eine interessante Frage wäre außerdem, ob das myristoylierte Akt1 stark ubiquitinyliert vorliegt, aber dennoch der Kernimport durch die Verankerung oder andere Faktoren gehemmt ist. Eine weitere These wäre, dass Akt1-E17K durch den verstärkten Kernimport, ebenso schneller DNA-DSB reparieren kann.

5.7 Einfluss von aktiven Akt1-Mutanten auf die DNA-DSB

Reparaturwege

Frühere Publikationen hatten bereits gezeigt, dass Akt1 insbesondere mit der DNA-DSB Reparatur über den D-NHEJ Weg interferiert [28, 214]. Auch die im Rahmen der vorliegenden Promotionsschrift erzielten Ergebnisse bezüglich einer durch E17K und TDSD insbesondere zeitnah nach Bestrahlung verbesserten Reparatur, unterstützten die Annahme, dass besonders der D-NHEJ Reparaturweg durch Akt1 beeinflusst wird. Dieser ist der schnellste DNA-Reparaturweg für DSB und beginnt zeitnah nach der Schädigung. Ein Großteil der Schäden wird abhängig von der Dosis bis zu 4 h nach Schädigung repariert [192]. Weitere Hinweise für diese Hypothese finden sich ebenso in der Literatur in Ergebnissen, die zeigen, dass bereits nach 2-3 h unabhängig von ATM, und damit durch den DNA-PK unabhängigen NHEJ Reparaturweg, der Großteil von DSB repariert wird. [100]

Um dies auch in unserem genetischen System der Akt1-Mutanten-exprimierenden Zellen zu bestätigen, wurden diese für Überlebens- und Reparaturassays unter Nutzung eines DNA-PKcs-Inhibitors verwendet. Des Weiteren wurde ein *in vitro* Kinase-Assay mit verschiedenen aufgereinigten Akt1-Mutanten etabliert, um die Hierarchie der Interaktion der Kinasen Akt und DNA-PKcs bei der DNA-DSB Reparatur zu ergründen. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine und die ersten Kinase-Assay-Tests waren Teil der, im Rahmen dieser Doktorarbeit betreuten Masterarbeit von Rabea Madel.

Da bereits in vorherigen Experimenten eine durch aktive Mutanten vermittelte Strahlenresistenz beobachtet wurde, war es das Ziel des nachfolgenden Experimentes, die Abhängigkeit des Mechanismus von einer funktionsfähigen DNA-PKcs zu überprüfen. Hierzu wurden die Effekte einer Inhibition der DNA-PKcs auf das Langzeitüberleben der aktivierenden Mutanten nach Bestrahlung mit Hilfe von Koloniebildungstests untersucht. Wie bei den vorangegangenen Experimenten erwiesen sich TrC1 TDSD und E17K insbesondere bei hohen Bestrahlungsdosen als resistenter und TrC1 myr sensibler gegenüber der toxischen Wirkung einer Bestrahlung. Die Behandlung der Zellen mit dem DNA-PK Inhibitor NU7441 veränderte das Zellverhalten eindrucklich. In Gegenwart des Inhibitors reagierten alle Varianten deutlich empfindlicher auf Bestrahlung, was die Bedeutung von DNA-PKcs für die DNA-DSB Reparatur mittels D-NHEJ bestätigt. In diesem Zusammenhang wird der Inhibitor

NU7441 als potenter DNA-PK-Inhibitor beschrieben und verwendet, der sowohl die Reparatur als auch das Zellwachstum nach DNA-Schädigung hemmt. [43, 86, 211, 238]

In aktueller Literatur wird auch beschrieben, dass die Inhibition mit NU7441 signifikant höhere Effekte auf die Reparatur und die zelluläre Antwort auf IR besitzt, als die Herabsenkung des Expressionslevels der DNA-PKcs durch siRNA. So scheint es, dass bereits eine geringere Menge aktiver DNA-PKcs die Reparatur maßgeblich verbessert. [86]

Interessanterweise glichen sich die Überlebenskurven der TrC1 mit Expression der verschiedenen Akt1-Varianten nach Bestrahlung an. Dies deutet darauf hin, dass der resistenzfördernde Effekt der E17K bzw. TDSO von der Aktivität der DNA-PK abhängig ist. Dies stimmt mit Beobachtungen von Toulany *et al.* überein, dass die radiosensitivierenden Effekt einer Akt-Inhibition nur in DNA-PK-profizienten Zellen auftritt. Toulany *et al.* postulierten dass eine durch Akt verstärkt aktivierte DNA-PKcs nach DNA-PK Inhibition das Signal nicht mehr weiterleiten kann. [214, 215]

Andererseits könnten, wie bereits beschrieben, durch die DNA-PKcs-abhängige Aktivierung von Akt nach Bestrahlung anti-apoptotische Signale verstärkt werden, die aber nur relevant sind, solange eine DNA-PKcs-abhängige DNA-Reparatur stattfindet. [28, 165]

Nachdem die Effekte der Akt1-Varianten durch die Inhibition der DNA-PK reduziert wurden, stellte sich die Frage, inwiefern dieser Effekt durch die Hemmung der anti-apoptotischen Wirkung nach DNA-PKcs-Phosphorylierung verursacht wurde und oder die DNA-PKcs-abhängige Reparatur verantwortlich wäre. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die beschleunigte Reparatur von TrC1 E17K und TrC1 TDSO abhängig von einer funktionsfähigen DNA-PKcs wäre. Dies wurde anhand von γ -H2.AX-Assays im Zeitverlauf mit und ohne DNA-PKcs-Inhibitor NU7441 untersucht. Nach der Inhibition mit dem DNA-PKcs-Inhibitor NU7441 zeigt sich eine insgesamt langsamere Reparatur, um etwa 25 Foci pro Nukleus, bei allen Zellvarianten. Die Zelllinien zeigten im Gegensatz zu den vorangegangenen Reparatur-Assays ohne Inhibition der DNA-PKcs keinen Unterschied der Reparatur bis 6 h nach Bestrahlung. Erst nach 8 h wurde die Reparatur der TrC1 E17K und TrC1 TDSO insignifikant schneller. Die residualen Foci waren im Vergleich zu den nicht mit Inhibitor behandelten Zellen erhöht und lagen bei TrC1 WT, E17K und TDSO bei etwa 10 Foci pro Nukleus, wobei myr mit etwa 17 Foci auffiel.

Die Einschränkungen des γ -H2.AX-Assay als indirekter Indikator für DNA-Schäden wurden bereits im Abschnitt 5.5 (Effekte der Akt1-Mutationen auf die DNA-Reparatur S.155) beschrieben. Nicht außer Acht gelassen werden sollte, dass neben ATM und ATR die DNA-PKcs als Kinase des Histon 2 maßgeblich mitverantwortlich für die Bildung von γ -H2.AX Foci in einer insgesamt geringeren Anzahl an Foci resultieren könnte. [36, 66]

Aufgrund der Ergebnisse dieses Assays liegt die Vermutung nahe, dass die Reparatur beschleunigenden Effekte des Akt1-E17K und Akt1-TDSD in der Verbesserung des D-NHEJ zu finden sind.

Die Tatsache, dass eine Reparatur an sich stattfinden konnte und insbesondere nach 8 h vermehrt zu erkennen war, kann in einer abgeschwächten Wirkung des Inhibitors nach dieser Zeit liegen. Allerdings zeigten Studien bezüglich des Inhibitors eine Stabilität des Inhibitors über fünf Tage [143]. Wahrscheinlicher ist deswegen eine vermehrte Aktivierung von B-NHEJ und HRR. Diese beiden Reparaturwege sind DNA-PK unabhängig [61, 145, 192]. Gleichzeitig ist bekannt, dass HRR später aktiviert wird und langsamer abläuft [82, 140].

Die leichte Abnahme der Foci bei TrC1 E17K und TrC1 TDSD nach 8 h weist darauf hin, dass aktiviertes Akt im Nukleus möglicherweise auch andere Reparaturmechanismen beeinflusst. So wurde eine Beeinflussung von HRR durch Akt1 bereits 2008 beschrieben. [169]

Um die direkte Interaktion der beiden Kinasen final zu ergründen wurde ein *ex vivo*-Kinase-Assay durchgeführt. Dieses Assay mit aufgereinigten Akt1-Mutanten und des DNA-PK-Komplexes ermöglichte es, die direkte Phosphorylierungshierarchie der beiden Kinasen zu verdeutlichen.

In einem Kinase Assay wurden die aufgereinigten Varianten von Akt1-WT und Akt1-TDSD auf ihre Aktivität überprüft. Hierzu wurde zum Testen der Autophosphorylierung Akt1-TDSD mit Akt1-WT vermischt. Dies zeigte im Vergleich zu Akt1-WT in Lösung keinen Unterschied, sodass von einer Autophosphorylierung des Akt1 *in vitro* nicht ausgegangen werden konnte. Allerdings sprechen die Ergebnisse dafür, dass Akt1-TDSD im Gegensatz zu Akt1-WT, *in vitro* in der Lage ist, ein Akt1-Testsubstrat hochsignifikant zu phosphorylieren. Die so als aktiv bestätigte Variante Akt1-TDSD konnte nun zur Überprüfung der Fragestellung benutzt werden, ob DNA-PKcs ein Substrat von Akt1 ist. Die Autophosphorylierung von Akt1 war vernachlässigbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Akt1-TDSD *in vitro* DNA-PK nicht direkt phosphorylieren kann. Die Ansätze mit Akt1-TDSD und DNA-PK zeigten den gleichen Grad an ATP-Verbrauch wie die Negativkontrolle Akt1-TASA, da diese Mutante sowohl durch ihre Mutationen an den Phosphorylierungsstellen zu Alanin inaktiviert, als auch nicht phosphorylierbar war.

Im DNA-PKcs-Kinase-Assay zeigte sich, wie erwartet, für die Negativkontrolle mit aktivierender DNA ein leichtes Signal. Das lässt den Schluss zu, dass DNA-PKcs eine Autophosphorylierung bei allen Kombinationen ausführte. Die Bestätigung der abgelaufenen Phosphorylierung konnte anhand der Aktivität der DNA-PKcs mit Substrat nachvollzogen

5 Diskussion

werden. Eine Phosphorylierung von Akt1-TASA sowie Akt1-SA war nicht möglich. Im Gegensatz hierzu war es möglich Akt1-TA und Akt1-WT mit der Phosphorylierungsstelle an S473 durch DNA-PKcs zu phosphorylieren.

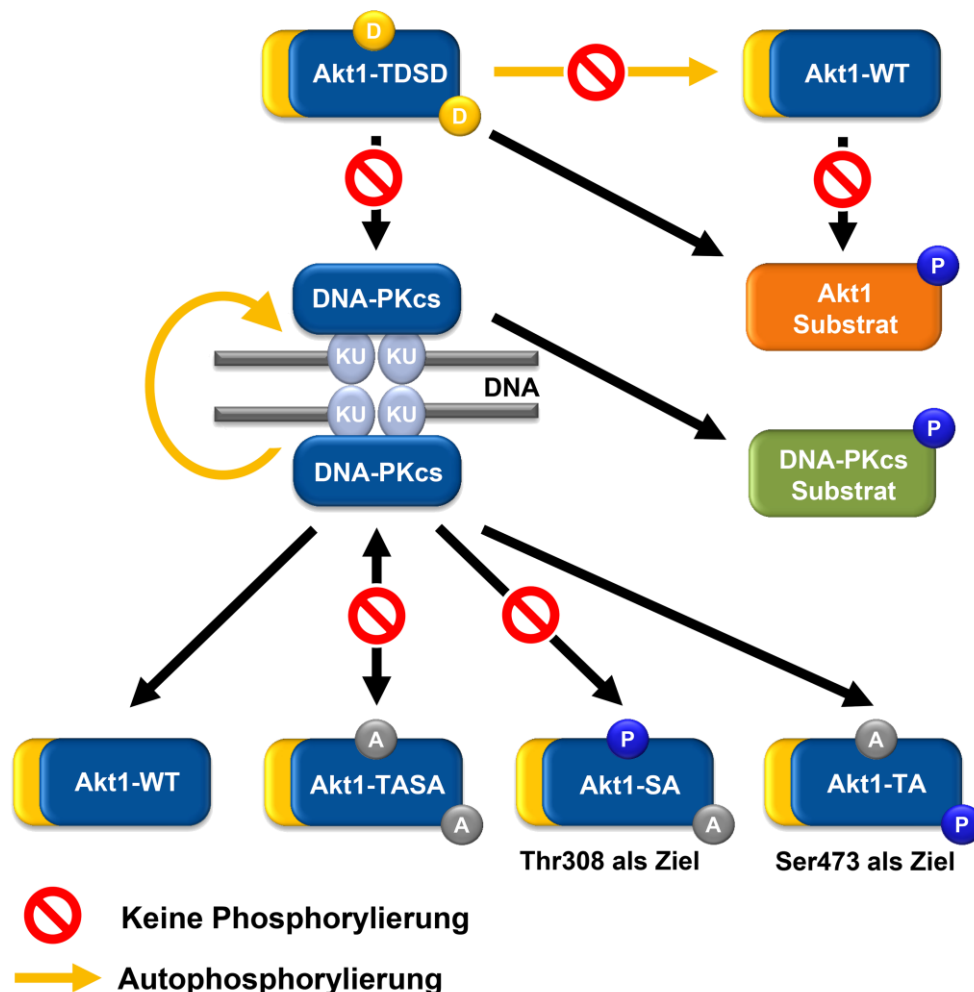


Abb. 5.7-1 Schema der erhaltenen Ergebnisse der Akt1/DNA-PKcs-Kinase-Assays

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der verschiedenen Kinase Assay zusammen. Es wurde deutlich, dass die aktive Akt1-TDSD-Variante ein Akt-Testsubstrat phosphorylieren konnte, aber nicht DNA-PKcs als Ziel besaß. Des Weiteren zeigte sich, dass DNA-PKcs in Lösung mit geschnittener DNA aktiv war und das zugehörige Testsubstrat phosphorylierte. Auch konnte DNA-PKcs Akt1 direkt an der Phosphorylierungsstelle S473 phosphorylieren und trägt damit zu dessen Aktivierung nach DNA-Schäden maßgeblich bei.

Das Schema Abb. 5.7-1 soll die Ergebnisse der verschiedenen Protein und Substrat Interaktionen verdeutlichen. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass DNA-PK Akt1-WT an Serin 473 phosphorylieren kann, jedoch selbst kein Substrat für eine Akt-vermittelte Phosphorylierung darstellt. In keinem der Ansätze konnte eine Phosphorylierung des Threonins308 durch DNA PKcs nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigen somit eindrücklich die *in silico* Analysen potentieller Phosphorylierungsstellen/Substrate von DNA-PKcs und Akt1. Diese Ergebnisse konnten auch anhand der durchgeführten

Western Blots bestätigt werden. Auch wurde hiermit der Nachweis der aktivierten Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Akt1 DNA-PKcs nicht direkt phosphoryliert.

Die Signale der Lumineszenzmessung fielen schwächer aus als vom Hersteller angegeben wurde. Eine Ursache hierfür könnte eine eingeschränkte Funktionalität der DNA-PKcs sein. Transportschäden oder eine Unterbrechung der Kühlkette könnten das sehr große und somit instabile Protein DNA-PKcs in seiner Aktivität beeinflusst haben. Ein weiterer Nachteil eines *in vitro*-Assays ist, dass Proteine in Lösung ohne unterstützende Strukturen seltener miteinander interagieren, da die räumliche Nähe fehlt. So ist es z.B. für Akt1 möglich eine Autophosphorylierung durchzuführen, unterstützt durch T-Zellen Lymphom 1 (TCL1). [119, 166]

Limitierend könnte im Vergleich zu den Testsubstraten ebenso sein, dass diese lediglich aus kurzen Aminosäureketten bestehen. Diese können leichter durch ihre Kinasen koordiniert werden als zwei größere Kinasen miteinander. Um diesen Effekten entgegenzuwirken, wurden höhere Mengen an Protein verwendet.

Die Mutante Akt1-TDSD imitierte eine T308/S473-Phosphorylierung und ist somit vollständig aktiviert. Sie wurde als mögliche Kinase der DNA-PKcs eingesetzt. Zusätzlich konnte sie jedoch nicht durch eine andere Kinase an diesen Stellen phosphoryliert werden und galt somit als zusätzliche Negativkontrolle bei der nicht stattgefundenen Phosphorylierung von DNA-PKcs zu Akt1. Akt1-TASA hingegen kann weder phosphoryliert werden noch aktiv sein und wurde als echte Negativkontrolle eingesetzt. Wie erwartet schien die TDSD eine aktive Form zu sein, während TASA inaktiv war. [7]

Mit diesem Assay konnte die Annahme von Bozulic *et al.* bestätigt werden, dass Akt1 DNA-PKcs aktivieren kann. Park *et al.* zeigte auf Grund von Sequenzvergleichen, dass DNA-PKcs Akt direkt am S473 phosphorylieren könnte. [27, 28, 70, 165].

Diese Ergebnisse lassen auch Rückschlüsse auf eine Beteiligung von Akt1 am D-NHEJ zu. Es wurde bereits vermutet, dass Akt1 durch Assoziation mit DNA-PKcs an der Initiation von D-NHEJ beteiligt ist [80, 105, 132, 214, 215]. In Glioblastomen hatte die Inhibition von Akt beispielsweise eine Reduktion von D-NHEJ zur Folge [80]. Ebenso wurde beschrieben, dass aktives Akt, Einfluss auf die Initialisierung von NHEJ durch DNA-PKcs nimmt [174, 214]. Allerdings wurde hier eine Aktivität von Akt oberhalb von DNA-PKcs angenommen. Kürzlich wurde gezeigt, dass Akt1 durch seine C-terminale Domäne mit DNA-PKcs interagiert und nach ionisierender Strahlung einen Komplex mit DNA-PKcs bildet [215]. Somit sind auch indirekte Effekte von Akt1 auf die DNA-PKcs vermittelte DNA-DSB Reparatur denkbar.

5 Diskussion

Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass Akt1 auch im Kern phosphoryliert werden kann, wobei insbesondere eine Abhängigkeit von MRE11, bzw. ATM und eine Unabhängigkeit von DNA-PKcs, PI3K und ATR beschrieben wurde [75] [223].

Allerdings bleibt die genaue Funktion von Akt1 im Rahmen des D-NHEJ bislang weiterhin unklar, auch wenn zahlreiche potentielle Mechanismen beschrieben: Einerseits könnte Akt1 die Komplexbildung von DNA-Ku-Dimeren, dem Initiationskomplex des D-NHEJ, beeinflussen. Andererseits kann Akt die Kinaseaktivität von DNA-PKcs beeinflussen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Des Weiteren wäre es möglich, dass Akt die Autophosphorylierung von DNA-PKcs unterstützt und so die Freisetzung von DNA-PKcs vom reparierten DNA-Strang beschleunigt.

Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen Ergebnisse in der Verwendung verschiedener Zelltypen begründet sind [133]. Andererseits kann ebenso vermutet werden, dass Akt1 einerseits am NHEJ beteiligt ist, andererseits auch eine Rolle im HRR spielt. [169, 216]

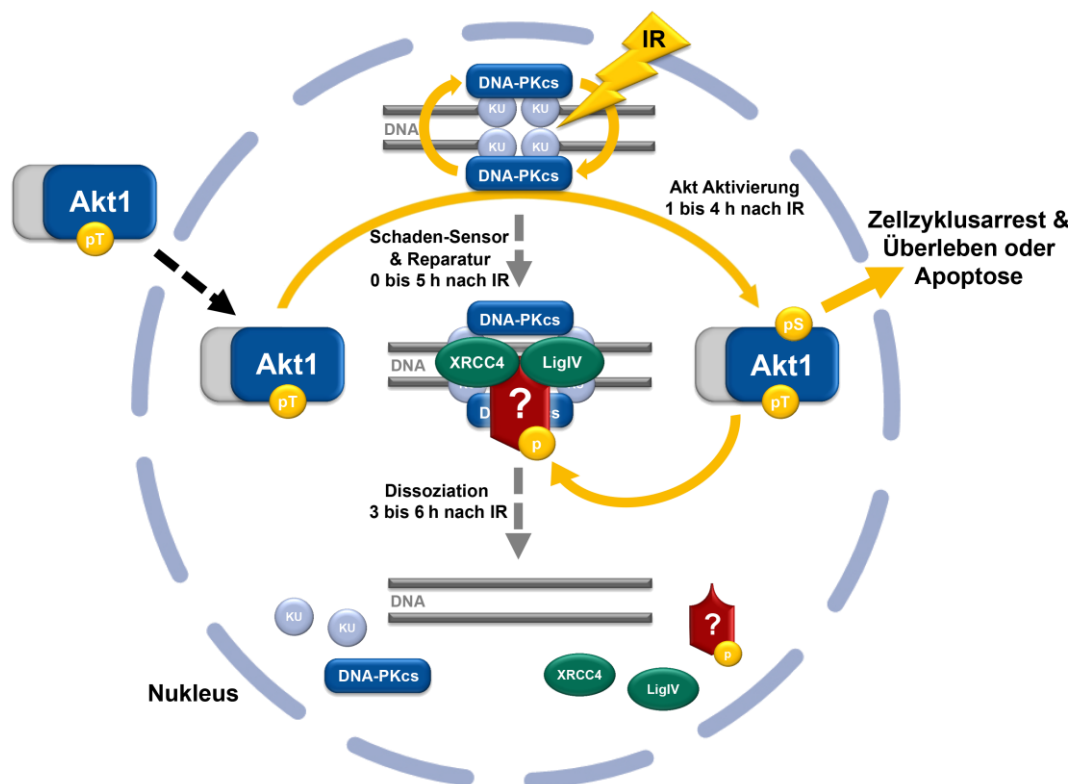


Abb. 4.7.4-2 Akt und DNA-PK Interaktion nach vorliegenden Ergebnissen und aktueller Literatur

Dieses Schema fasst die Interpretationen der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur zusammen. Es verdeutlicht die putative Aktivierung von Akt durch DNA-PKcs nach der Entstehung eines DNA-Schadens.

Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass eine Phosphorylierung von XLF durch Akt zur Dissoziation des Ligationskomplexes aus DNA Ligase IV, XRCC4 und XLF führt [132],

was zur Freisetzung des reparierten DNA-Stranges führt. In der gleichen Arbeit wurde auch gezeigt, dass Mutanten des XLF, die eine Phosphorylierung permanent imitierten, die Reparatur der DSB durch D-NHEJ maßgeblich hemmen. Erste Hinweise in der Literatur lassen ebenso auf eine Rolle von MERIT40 als Substrat von Akt1 schließen [33]. An dieser Stelle könnte das Verhältnis von aktiviertem, im Kern-lokalisiertem Akt das Gleichgewicht zwischen Apoptose oder Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur steuern. An dieser Stelle scheinen folgende Ansatzpunkte für weitere Forschung interessant. Zum Einen stellt sich die Frage, welches Zielprotein von Akt phosphoryliert wird und damit die D-NHEJ-Reparatur beeinflusst. Ein mögliches Zielprotein könnte der D-NHEJ unterstützende Faktor XLF (in der Abbildung 4.7.4 2 der rote Faktor „?“) sein. Zum Anderen stellt sich die Frage, wo Akt nach Bestrahlung phosphoryliert wird und wie Kernimport und -export von Akt1 ablaufen. Schließlich bleibt aufzuklären welche Stellung Akt in der Signalweiterleitung der DNA-Schadensantwort einnimmt, d.h. welche Akt-Substrate die Verbindung zum Zellzyklusarrest und der DNA-Reparatur einerseits und zur Apoptoseinitiation andererseits bereitstellen. Die genannten und andere Studien weisen auf ein fein eingestelltes Gleichgewicht zwischen DNA-Schadensmenge, Zellzyklushemmung, DNA-Reparatur und Apoptoseregulation, hin. [28, 104, 192, 214, 216, 228]

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Vermutung, dass Akt1 einer Rolle innerhalb dieses Gleichgewichts spielt und eine potentielle Schalter-Rolle einnimmt.

6 Zusammenfassung

Tumorassoziierte Mutationen in Proteinen des PI3K/Akt-Signalweges, einschließlich Mutationen von Akt1, können in einer Hyperaktivierung dieser Überlebenskinase resultieren, die häufig mit einer Resistenz gegenüber genotoxischen Therapien verbunden ist. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten COSMIC-Datenbankanalyse wurde das Auftreten von Mutationen in Akt1 und anderen PI3K-Signalwegskomponenten in verschiedenen Tumortypen bestätigt und auch eine der Literatur entsprechende Verteilung gefunden. Insbesondere bestätigten diese Analysen frühere Beobachtungen zur klinischen Relevanz der Aminosäuresubstitution in Akt1 von Glutaminsäure (Position 17) zu einem Lysin (E17K) in Brust-, Blasen-, Lungen-, Prostata- und kolorektalem Krebs.

Dies macht Akt zu einem wichtigen therapeutischen Angriffspunkt in der Tumorthherapie. Obwohl in den letzten Jahren viele Fortschritte zum Verständnis der Regulation und Funktionalität von Akt gewonnen wurden, ist dessen Rolle für die Strahlensensitivität und der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit war daher die Ergründung der Effekte von Akt1 auf die zelluläre Strahlenantwort.

Hierzu wurden murine Prostatakarzinomzellen und murine embryonale Fibroblasten mit Überexpression verschiedener Akt1-eGFP-Fusionsproteine generiert, die sich in ihrer PIP₃-Bindeeigenschaft und Aktivität unterschieden. Mit Hilfe dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass die aktivierungsassoziierten Akt1-E17K und myrAkt1-Varianten mit verstärkter Lokalisation an der Zytoplasmamembran eine verstärkte Zellproliferation aufweisen. Akt1-defiziente MEFs zeigten nach Überexpression von Akt1-E17K ein verstärktes Tumorstadium *in vivo*, was auf eine transformierende Aktivität dieser klinisch relevanten Akt-Veränderung hindeutet.

In Kurzzeit- und Langzeitexperimenten zum Zellüberleben nach Bestrahlung zeigten die membranaktivierte Akt1-E17K Mutation und die Phosphorylierungs-imitierende Akt1-TDSD eine erhöhte Resistenz gegen ionisierende Strahlung, während myrAkt1 Zellen durch eine erhöhte Radiosensitivität charakterisiert waren. Untersuchungen zur Kinetik der DNA-Reparatur mittels γ -H2.AX-Assay sowie einem direkten DNA-Schaden-Assay nach Bestrahlung, zeigten eine verlangsamte Reparatur strahlungsinduzierter DNA-Schäden in den myrAkt1-exprimierenden Zellen, wogegen die Mutationen TDSD und E17K die Reparatur im zeitlichen Verlauf zwischen 2 - 4 h beschleunigten. Dies deutete darauf hin, dass eine direkte Beschleunigung der DNA-Reparatur zur erhöhten Radioresistenz von Akt1-E17K- und Akt1-TDSD-überexprimierenden Zellen beiträgt.

Interessanterweise zeigten Lokalisationsstudien, dass myrAkt1 an Membranstrukturen akkumuliert und weder vor noch nach Bestrahlung in den Zellkern transloziert. Akt1-E17K

zeigte eine ausgeprägte Membran-Lokalisation; nach Bestrahlung war aber eine vermehrte Kerntranslokation zu beobachten. Akt1-TDSD hingegen zeigte keine verstärkte Membranbindung, sondern war durchgehend zu einem hohen Anteil im Kern zu finden. Der Zusammenhang von erhöhter Kernlokalisation und Radioresistenz lässt vermuten, dass die Anwesenheit von aktivem Akt1 im Nukleus für eine Veränderung der Radiosensitivität notwendig ist. Tatsächlich konnten die Radioresistenz-fördernden Effekte von Akt1-E17K und Akt1-TDSD sowohl durch Vorbehandlung mit einem allosterischen (MK-2206) als auch mit einem kompetitiven Akt-Inhibitor (GDC0068) gehemmt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Inhibitoren auch den beschleunigenden Effekt dieser Akt1-Varianten auf die DNA-Reparatur antagonisieren. Dies ließ vermuten, dass die Radioresistenz-fördernden Effekte der aktivierungsassoziierten Akt1-Varianten durch Effekte auf die DNA-Reparatur bedingt waren.

Auch die Vorbehandlung mit dem DNA-PK-Inhibitor NU7441 hatte einen Verlust der positiven Wirkung von Akt1-E17K und Akt1-TDSD auf das Zellüberleben und die DNA-Reparatur nach einer Bestrahlung zur Folge. Dies wies auf eine Beteiligung von aktivem, im Kern lokalisierten Akt1 an dem DNA-PKcs-abhängigen DNA-Reparaturweg D-NHEJ hin. Um die Hierarchie der Phosphorylierung der Kinasen DNA-PKcs und Akt1 zu ergründen, wurde ein Kinase-Assay mit diesen beiden Proteinen etabliert. Dabei stellte sich heraus, dass Akt1 direkt durch DNA-PK am Serin 473 phosphoryliert werden kann. Allerdings gab es keine direkte Phosphorylierung von DNA-PK durch aktives Akt1. Diese Ergebnisse bestätigten die *in silico* Analysen zu Konsensussequenzen und deuten auf eine indirekte Beteiligung von Akt1 bei der DNA-Reparatur mittels D-NHEJ hin. Beispielsweise ist ein Feedback-Mechanismus denkbar, in dem Akt1 nach strahleninduzierter DNA-Schädigung durch DNA-PKcs aktiviert wird und daraufhin potenziell an der DNA-Reparatur-beteiligte Proteine phosphoryliert, um so die Dynamik der Reparatur zu beeinflussen. Darüber hinaus wird so eine Verbindung von Initiation der DNA-Reparatur, Zellzyklus-Arrest und Apoptose-Hemmung hergestellt.

Aus den erzielten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Radioresistenz-steigernden Wirkung von E17K kann geschlussfolgert werden, dass diese Mutation einen potentiellen Biomarker für erhöhte Resistenz gegenüber einer Bestrahlung und anderen DNA-schädigenden Therapien darstellt und die betroffenen Patienten somit von einer Intensivierung der genotoxischen Therapie oder einer Kombinationstherapie mit Akt-Inhibitoren profitieren könnten. Dies gilt analog für Patienten mit einer aberranten Erhöhung der Akt1-Aktivität als Folge einer Mutation in *PIC3A* oder *PTEN*.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden folgende Publikationen mit Teilergebnissen veröffentlicht:

1 Oeck S, Malewicz NM, Hurst S, Rudner J, Jendrossek V. The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage. *Radiat Oncol* 2015;10(163):015-0453.

2 Weisner J, Gontla R, van der Westhuizen L, Oeck S *et al.* Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015;54(35):10313-10316.

7 Ausblick

Auf Basis der Ergebnisse ergeben sich folgende weiterführenden Fragestellungen und Ausblicke: Besonders wichtig wäre es das, in der DNA-Reparatur beteiligte, direkte Substrat oder die Substrate von Akt1 zu identifizieren. Erste Hinweise in der Literatur lassen auf eine Rolle von XLF [132] und des MERIT40 [33] schließen. Diese könnten als direkte Akt1-Zielproteine die Stabilität des D-NHEJ-Ligationskomplexes beeinflussen. [28, 80, 105, 132, 165, 214, 215]

Für Untersuchungen bezüglich der Substrate von Akt1 nach Bestrahlung wäre die Erstellung von Mutanten sinnvoll, wie beispielsweise einer Akt1-TASA bzw. Akt1-E17K-T308A bzw. Akt1-E17K-S473A, die eine Signalweiterleitung verhindern bzw. limitieren. Des Weiteren ist es von großer Wichtigkeit den Hinweisen auf eine Beteiligung von Akt1 an anderen Reparaturwegen nachzugehen. [169]

Ein weiteres interessantes Forschungsfeld stellen die beiden anderen Akt-Isoformen, Akt2 und Akt3, deren unterschiedliches Mitwirken an der DNA-Reparatur bereits in der Literatur erwähnt wurde. So scheint insbesondere Akt3 hierbei eine größere Bedeutung zuzukommen [215]. Interessanterweise findet man in humanen Tumoren auch in Akt2 oder Akt3 E17K-analoge Mutationen [51, 206].

Diese Promotionsarbeit sollte die Rolle der Proteinkinase $B\alpha$ bei der zellulären Antwort auf ionisierende Bestrahlung ergründen. Es zeigte sich, dass Akt1 nicht nur bei der anti-apoptischen Antwort nach Bestrahlung als Signalweiterleiter dient, sondern auch auf die DNA-DSB-Reparatur durch D-NHEJ direkten Einfluss nimmt. Insbesondere im Hinblick auf die in Tumoren gefundene E17K-Mutation zeigt sich die Relevanz der Forschung an Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung und Akt-Inhibitoren. Diese Erkenntnisse könnten als Grundlage für die Strahlen-sensitivierende Therapie von Tumoren mit verändertem PI3K/Akt-Signalweg dienen.

8 Literaturverzeichnis

1. Altomare, D.A. and J.R. Testa, *Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7455-64.
2. Amaral, J.D., J.M. Xavier, C.J. Steer, and C.M. Rodrigues, *The role of p53 in apoptosis*. *Discov Med*, 2010. **9**(45): p. 145-52.
3. American, *American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Atlanta: American Cancer Society; 2015;
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf>. Zugriff: 23.11.2015.
4. Anderson, L., C. Henderson, and Y. Adachi, *Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(5): p. 1719-29.
5. Andjelkovic, M., D.R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N.J. Lamb, M. Frech, et al., *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(50): p. 31515-24.
6. Antonsson, B. and J.C. Martinou, *The Bcl-2 protein family*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 50-7.
7. Aoki, M., O. Batista, A. Bellacosa, P. Tsichlis, and P.K. Vogt, *The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(25): p. 14950-5.
8. Asaithamby, A. and D.J. Chen, *Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose γ -irradiation*. *Nucleic Acids Research*, 2009. **37**(12): p. 3912-3923.
9. Askham, J.M., F. Platt, P.A. Chambers, H. Snowden, C.F. Taylor, and M.A. Knowles, *AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K*. *Oncogene*, 2010. **29**(1): p. 150-5.
10. Aylon, Y., B. Liefshitz, and M. Kupiec, *The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle*. *Embo J*, 2004. **23**(24): p. 4868-75.
11. Bachman, K.E., P. Argani, Y. Samuels, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, et al., *The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers*. *Cancer Biol Ther*, 2004. **3**: p. 772-775.
12. Barber, P.R., R.J. Locke, G.P. Pierce, K. Rothkamm, and B. Vojnovic. *Gamma-H2AX foci counting: image processing and control software for high-content screening*. 2007.
13. Barton, M.B., M. Frommer, and J. Shafiq, *Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(7): p. 584-95.
14. Barton, M.B., S. Jacob, J. Shafiq, K. Wong, S.R. Thompson, T.P. Hanna, et al., *Estimating the demand for radiotherapy from the evidence: A review of changes from 2003 to 2012*. *Radiotherapy and Oncology*. **112**(1): p. 140-144.
15. Beaver, J.A., J.P. Gustin, K.H. Yi, A. Rajpurohit, M. Thomas, S.F. Gilbert, et al., *PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(19): p. 5413-22.
16. Begg, A.C., F.A. Stewart, and C. Vens, *Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(4): p. 239-53.
17. Belka, C., P. Marini, W. Budach, K. Schulze-Osthoff, F. Lang, E. Gulbins, et al., *Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand*. *Radiat Res*, 1998. **149**(6): p. 588-95.
18. Bellacosa, A., T.O. Chan, N.N. Ahmed, K. Datta, S. Malstrom, D. Stokoe, et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain*. *Oncogene*, 1998. **17**(3): p. 313-25.
19. Bellacosa, A., C.C. Kumar, A. Di Cristofano, and J.R. Testa, *Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting*. *Adv Cancer Res*, 2005. **94**: p. 29-86.
20. Bennett, C.B., A.L. Lewis, K.K. Baldwin, and M.A. Resnick, *Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(12): p. 5613-7.
21. Berns, K., H.M. Horlings, B.T. Hennessy, M. Madiredjo, E.M. Hijmans, K. Beelen, et al., *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(4): p. 395-402.
22. Bhide, S.A. and C.M. Nutting, *Recent advances in radiotherapy*. *BMC Med*, 2010. **8**(25): p. 1741-7015.
23. Bittner, M., P. Kupferer, and C.F. Morris, *Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets*. *Anal Biochem*, 1980. **102**(2): p. 459-71.
24. Blake, J.F., R. Xu, J.R. Bencsik, D. Xiao, N.C. Kallan, S. Schlachter, et al., *Discovery and preclinical pharmacology of a selective ATP-competitive Akt inhibitor (GDC-0068) for the treatment of human tumors*. *J Med Chem*, 2012. **55**(18): p. 8110-27.
25. Bleeker, F.E., L. Felicioni, F. Buttitta, S. Lamba, L. Cardone, M. Rodolfo, et al., *AKT1(E17K) in human solid tumours*. *Oncogene*, 2008. **27**(42): p. 5648-50.

8 Literaturverzeichnis

26. Bocker, W. and G. Iliakis, *Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells*. Radiat Res, 2006. **165**(1): p. 113-24.
27. Boehme, K.A., R. Kulikov, and C. Blattner, *p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7785-90.
28. Bozulic, L., B. Surucu, D. Hynx, and B.A. Hemmings, *PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 203-13.
29. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
30. Braman, J., C. Papworth, and A. Greener, *Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates*. Methods Mol Biol, 1996. **57**: p. 31-44.
31. Bray, F., A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay, and D. Forman, *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study*. Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. 790-801.
32. Brognard, J., A.S. Clark, Y. Ni, and P.A. Dennis, *Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 3986-97.
33. Brown, K.K., L. Montaser-Kouhsari, A.H. Beck, and A. Toker, *MERIT40 Is an Akt Substrate that Promotes Resolution of DNA Damage Induced by Chemotherapy*. Cell Rep, 2015. **11**(9): p. 1358-66.
34. Brugal, G. *Pattern recognition, image processing, related data analysis and expert systems integrated in medical microscopy*. in *Pattern Recognition, 1988., 9th International Conference on*. 1988.
35. Brugge, J., M.-C. Hung, and G.B. Mills, *A New Mutational activation in the PI3K Pathway*. Cancer Cell, 2007. **12**(2): p. 104-107.
36. Burma, S., B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D.J. Chen, *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42462-7.
37. Cai, Z., K.A. Vallis, and R.M. Reilly, *Computational analysis of the number, area and density of gamma-H2AX foci in breast cancer cells exposed to (111)In-DTPA-hEGF or gamma-rays using Image-J software*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(3): p. 262-71.
38. Cancer, *Incidence in Five Continents, Vol. X (electronic version)*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://ci5.iarc.fr>, Zugriff: 23.11.2015.
39. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**: p. 1655-1657.
40. Carpten, J.D., A.L. Faber, C. Horn, G.P. Donoho, S.L. Briggs, C.M. Robbins, et al., *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 439-44.
41. Chalhoub, N. and S.J. Baker, *PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 127-50.
42. Chen, W., S. Wu, G. Zhang, W. Wang, and Y. Shi, *Effect of AKT inhibition on epithelial-mesenchymal transition and ZEB1-potentiated radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma*. Oncol Lett, 2013. **6**(5): p. 1234-1240.
43. Ciszewski, W.M., M. Tavecchio, J. Dastych, and N.J. Curtin, *DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **143**(1): p. 47-55.
44. ClinicalTrials, .gov Database, The U.S. National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, National Library of Medicine, <https://clinicaltrials.gov/>, Zugriff: 23.11.2015.
45. Cohen, S.N., A.C. Chang, and L. Hsu, *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(8): p. 2110-4.
46. Compton, S.J. and C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem, 1985. **151**(2): p. 369-74.
47. Cross, D.A., D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B.A. Hemmings, *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
48. Cummings, B., T. Keane, M. Pintilie, P. Warde, J. Waldron, D. Payne, et al., *Five year results of a randomized trial comparing hyperfractionated to conventional radiotherapy over four weeks in locally advanced head and neck cancer*. Radiother Oncol, 2007. **85**(1): p. 7-16.
49. Datta, K., A. Bellacosa, T.O. Chan, and P.N. Tsichlis, *Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30835-9.
50. Davies, B.R., N. Guan, A. Logie, C. Crafter, L. Hanson, V. Jacobs, et al., *Tumors with AKT1E17K Mutations Are Rational Targets for Single Agent or Combination Therapy with AKT Inhibitors*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(11): p. 2441-51.
51. Davies, M.A., K. Stemke-Hale, C. Tellez, T.L. Calderone, W. Deng, V.G. Prieto, et al., *A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines*. Br J Cancer, 2008. **99**(8): p. 1265-8.
52. Delaney, G., S. Jacob, C. Featherstone, and M. Barton, *The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines*. Cancer, 2005. **104**(6): p. 1129-37.

8 Literaturverzeichnis

53. Deyle, K.M., B. Farrow, Y. Qiao Hee, J. Work, M. Wong, B. Lai, et al., *A protein-targeting strategy used to develop a selective inhibitor of the E17K point mutation in the PH domain of Akt1*. Nat Chem, 2015. **7**(5): p. 455-62.
54. Diaz, R., P.A. Nguewa, J.A. Diaz-Gonzalez, E. Hamel, O. Gonzalez-Moreno, R. Catena, et al., *The novel Akt inhibitor Palomid 529 (P529) enhances the effect of radiotherapy in prostate cancer*. Br J Cancer, 2009. **100**(6): p. 932-40.
55. DiBiase, S.J., Z.C. Zeng, R. Chen, T. Hyslop, W.J. Curran, Jr., and G. Iliakis, *DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1245-53.
56. Dittrich WM, G.W., *Flow-through Chamber for Photometers to Measure and Count Particles in a Dispersion Medium*. United States Patent 1968. **3**: **76-187**.
57. DiTullio, R.A., Jr., T.A. Mochan, M. Venere, J. Bartkova, M. Sehested, J. Bartek, et al., *53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 998-1002.
58. Dolezalova, D., M. Mraz, T. Barta, K. Plevova, V. Vinarsky, Z. Holubcova, et al., *MicroRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2012. **30**(7): p. 1362-72.
59. Dorlo, T.P., M. Balasegaram, J.H. Beijnen, and P.J. de Vries, *Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(11): p. 2576-97.
60. Douglas, P., G.P. Sapkota, N. Morrice, Y. Yu, A.A. Goodarzi, D. Merkle, et al., *Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 1): p. 243-51.
61. Dueva, R. and G. Iliakis, *Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer*. Translational Cancer Research; Vol 2, No 3 (June 2013): Translational Cancer Research (DNA Damage and Repair), 2013.
62. Dugle, D.L., C.J. Gillespie, and J.D. Chapman, *DNA strand breaks, repair, and survival in x-irradiated mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(3): p. 809-12.
63. Durocher, D. and S.P. Jackson, *DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?* Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**(2): p. 225-231.
64. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
65. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 663-9.
66. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
67. Fan, C.D., M.A. Lum, C. Xu, J.D. Black, and X. Wang, *Ubiquitin-dependent regulation of phospho-AKT dynamics by the ubiquitin E3 ligase, NEDD4-1, in the insulin-like growth factor-1 response*. J Biol Chem, 2013. **288**(3): p. 1674-84.
68. Farber, E., *Programmed cell death: necrosis versus apoptosis*. Mod Pathol, 1994. **7**(5): p. 605-9.
69. Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
70. Feng, J., J. Park, P. Cron, D. Hess, and B.A. Hemmings, *Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 41189-96.
71. Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. 9.
72. Forbes, S.A., D. Beare, P. Gunasekaran, K. Leung, N. Bindal, H. Boutselakis, et al., *COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. 29.
73. Forman, D.B.F., Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J, *Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J eds (2013) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X (electronic version) Lyon, IARC. <http://ci5.iarc.fr> Zugriff: 23.11.2015*.
74. Franke, T.F., S.I. Yang, T.O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D.K. Morrison, et al., *The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase*. Cell, 1995. **81**(5): p. 727-36.
75. Fraser, M., S.M. Harding, H. Zhao, C. Coackley, D. Durocher, and R.G. Bristow, *MRE11 promotes AKT phosphorylation in direct response to DNA double-strand breaks*. Cell Cycle, 2011. **10**(13): p. 2218-32.

76. Fruman, D.A. and C. Rommel, *PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(2): p. 140-56.
77. Ghafoori, P., L.B. Marks, Z. Vujaskovic, and C.R. Kelsey, *Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention*. Oncology, 2008. **22**(1): p. 37-47.
78. Giobuin, S.M., D.O. Kavanagh, E. Myers, A.O. Doherty, C.M. Quinn, T. Crotty, et al., *The significance of immunohistochemistry positivity in sentinel nodes which are negative on haematoxylin and eosin in breast cancer*. Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(12): p. 1257-60.
79. Girish, V. and A. Vijayalakshmi, *Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ*: Indian J Cancer. 2004 Jan-Mar;41(1):47.
80. Golding, S.E., R.N. Morgan, B.R. Adams, A.J. Hawkins, L.F. Povirk, and K. Valerie, *Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(8): p. 730-8.
81. Gonzalez, E. and T.E. McGraw, *Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7004-9.
82. Goodarzi, A.A., P. Jeggo, and M. Lobrich, *The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax*. DNA Repair, 2010. **9**(12): p. 1273-82.
83. Gudkov, A.V. and E.A. Komarova, *The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(2): p. 117-29.
84. Guldberg, P., P. thor Straten, A. Birck, V. Ahrenkiel, A.F. Kirkin, and J. Zeuthen, *Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3660-3.
85. Gupta, A., C.R. Hunt, S. Chakraborty, R.K. Pandita, J. Yordy, D.B. Ramnarain, et al., *Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. Radiat Res, 2014. **181**(1): p. 1-8.
86. Gustafsson, A.S., A. Abramenkova, and B. Stenerlow, *Suppression of DNA-dependent protein kinase sensitize cells to radiation without affecting DSB repair*. Mutat Res, 2014. **769**: p. 1-10.
87. Hall, EJ, Giaccia AJ. In: *Radiobiology for the radiologist*. Hall EJ, editor. Lippincott Williams and Wilkins Publishing; PA, USA. 2006.
88. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
89. Hennessy, B.T., D.L. Smith, P.T. Ram, Y. Lu, and G.B. Mills, *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**: p. 988-1004.
90. Herbert, A.D., A.M. Carr, and E. Hoffmann, *FindFoci: a focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis*. PLoS One, 2014. **9**(12).
91. Hernandez, L., M. Terradas, M. Martin, L. Tusell, and A. Genesca, *Highly sensitive automated method for DNA damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(8): p. 15810-26.
92. Hirai, H., H. Sootome, Y. Nakatsuru, K. Miyama, S. Taguchi, K. Tsujioka, et al., *MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(7): p. 1956-67.
93. Hoffman, R.M., *In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis*. J Clin Lab Anal, 1991. **5**(2): p. 133-43.
94. Hubenak, J.R., Q. Zhang, C.D. Branch, and S.J. Kronowitz, *Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review*. Plast Reconstr Surg, 2014. **133**(1).
95. Hudis, C., C. Swanton, Y.Y. Janjigian, R. Lee, S. Sutherland, R. Lehman, et al., *A phase I study evaluating the combination of an allosteric AKT inhibitor (MK-2206) and trastuzumab in patients with HER2-positive solid tumors*. Breast Cancer Research : BCR, 2013. **15**(6): p. R110-R110.
96. Hudson, A.M., T. Yates, Y. Li, E.W. Trotter, S. Fawdar, P. Chapman, et al., *Discrepancies in cancer genomic sequencing highlight opportunities for driver mutation discovery*. Cancer Res, 2014. **74**(22): p. 6390-6.
97. Ittmann, M.M., *Chromosome 10 alterations in prostate adenocarcinoma (review)*. Oncol Rep, 1998. **5**(6): p. 1329-35.
98. James, S.R., C.P. Downes, R. Gigg, S.J. Grove, A.B. Holmes, and D.R. Alessi, *Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation*. Biochem J, 1996. **315**(Pt 3): p. 709-13.
99. Janku, F., J.J. Wheler, A. Naing, V.M. Stepanek, G.S. Falchook, S. Fu, et al., *PIK3CA mutations in advanced cancers: characteristics and outcomes*. Oncotarget, 2012. **3**(12): p. 1566-75.
100. Jeggo, P.A., V. Geuting, and M. Lobrich, *The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair*. Radiother Oncol, 2011. **101**(1): p. 7-12.
101. Jendrossek, V. and R. Handrick, *Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. **3**(5): p. 343-53.
102. Jendrossek, V., M. Henkel, J. Hennenlotter, U. Vogel, U. Ganswindt, I. Muller, et al., *Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples*. BJU Int, 2008. **102**(3): p. 371-82.

8 Literaturverzeichnis

103. Junttila, T.T., R.W. Akita, K. Parsons, C. Fields, G.D. Lewis Phillips, L.S. Friedman, et al., *Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(5): p. 429-40.
104. Kakarougkas, A. and P.A. Jeggo, *DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism*. *Br J Radiol*, 2014. **87**(1035): p. 20130685.
105. Kao, G.D., Z. Jiang, A.M. Fernandes, A.K. Gupta, and A. Maity, *Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(29): p. 21206-12.
106. Karakas, B., K.E. Bachman, and B.H. Park, *Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(4): p. 455-459.
107. Kastan, M.B., D.S. Lim, S.T. Kim, B. Xu, and C. Canman, *Multiple signaling pathways involving ATM*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2000. **65**: p. 521-6.
108. Keniry, M. and R. Parsons, *The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy*. *Oncogene*, 2008. **27**(41): p. 5477-85.
109. Kennedy, S.G., A.J. Wagner, S.D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P.N. Tsichlis, et al., *The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal*. *Genes Dev*, 1997. **11**(6): p. 701-13.
110. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
111. Kim, D. and J. Chung, *Akt: versatile mediator of cell survival and beyond*. *J Biochem Mol Biol*, 2002. **35**(1): p. 106-15.
112. Kinner, A., W. Wu, C. Staudt, and G. Iliakis, *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(17): p. 5678-94.
113. Knuefermann, C., Y. Lu, B. Liu, W. Jin, K. Liang, L. Wu, et al., *HER2//PI-3K//Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(21): p. 3205-3212.
114. Kolesnick, R. and Z. Fuks, *Radiation and ceramide-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5897-906.
115. Kumar, C.C. and V. Madison, *AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7493-501.
116. Kumari, A., S.S. Simon, T.D. Moody, and C. Garnett-Benson, *Immunomodulatory effects of radiation: what is next for cancer therapy?* *Future Oncol*, 2015. **1**: p. 1.
117. Kunkel, T.A., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(2): p. 488-92.
118. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
119. Laine, J., G. Kunstle, T. Obata, M. Sha, and M. Noguchi, *The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator*. *Mol Cell*, 2000. **6**(2): p. 395-407.
120. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome* 1992: *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
121. Lassen, A., M. Atefi, L. Robert, D.J. Wong, M. Cerniglia, B. Comin-Anduix, et al., *Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma*. *Mol Cancer*, 2014. **13**(83): p. 1476-4598.
122. Latt, S.A., G. Stetten, L.A. Juergens, H.F. Willard, and C.D. Scher, *Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence*. *J Histochem Cytochem*, 1975. **23**(7): p. 493-505.
123. Lee, J.H., M. Huynh, J.L. Silhavy, S. Kim, T. Dixon-Salazar, A. Heiberg, et al., *De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly*. *Nat Genet*, 2012. **44**(8): p. 941-5.
124. Lee, J.W., Y.H. Soung, S.Y. Kim, H.W. Lee, W.S. Park, S.W. Nam, et al., *PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas*. *Oncogene*, 2005. **24**(8): p. 1477-80.
125. Lee, S.E., J.K. Moore, A. Holmes, K. Umez, R.D. Kolodner, and J.E. Haber, *Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage*. *Cell*, 1998. **94**(3): p. 399-409.
126. Leslie, N.R. and M. Foti, *Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes*. *Trends Pharmacol Sci*, 2011. **32**(3): p. 131-40.
127. Leszczynska, K.B., I.P. Foskolou, A.G. Abraham, S. Anbalagan, C. Tellier, S. Haider, et al., *Hypoxia-induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity via AKT*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2015. **125**(6): p. 2385-2398.
128. Li, G., F.W. Alt, H.L. Cheng, J.W. Brush, P.H. Goff, M.M. Murphy, et al., *Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination*. *Mol Cell*, 2008. **31**(5): p. 631-40.
129. Lieber, M.R., U. Grawunder, X. Wu, and M. Yaneva, *Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks*. *Curr Opin Genet Dev*, 1997. **7**(1): p. 99-104.

130. Lin, J., D. Sampath, M.A. Nannini, B.B. Lee, M. Degtyarev, J. Oeh, et al., *Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(7): p. 1760-72.
131. Lindl, T., B. Lewandowski, S. Schreyogg, and A. Staudte, *An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays*. Altern Lab Anim, 2005. **33**(6): p. 591-601.
132. Liu, P., W. Gan, C. Guo, A. Xie, D. Gao, J. Guo, et al., *Akt-mediated phosphorylation of XLF impairs non-homologous end-joining DNA repair*. Mol Cell, 2015. **57**(4): p. 648-61.
133. Liu, Q., K.M. Turner, W.K. Alfred Yung, K. Chen, and W. Zhang, *Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy*. Neuro Oncol, 2014. **16**(10): p. 1313-23.
134. Lord, C.J. and A. Ashworth, *The DNA damage response and cancer therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 287-294.
135. Los, G.V. and K. Wood, *The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis*. Methods Mol Biol, 2007. **356**: p. 195-208.
136. Lote, K., T. Moller, E. Nordman, J. Overgaard, and T. Sveinsson, *Resources and productivity in radiation oncology in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden during 1987*. Acta Oncol, 1991. **30**(5): p. 555-61.
137. Malanga, D., *Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung*. Cell Cycle, 2008. **7**: p. 665-669.
138. Mandel, M. and A. Higa, *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. J Mol Biol, 1970. **53**(1): p. 159-62.
139. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
140. Mao, Z., M. Bozzella, A. Seluanov, and V. Gorbunova, *Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells*. DNA Repair, 2008. **7**(10): p. 1765-71.
141. Markova, E., N. Schultz, and I.Y. Belyaev, *Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival*. Int J Radiat Biol, 2007. **83**(5): p. 319-29.
142. Maskey, D., S. Yousefi, I. Schmid, I. Zlobec, A. Perren, R. Friis, et al., *ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy*. Nature Communications, 2013. **4**: p. 2130.
143. Menon, J.U., V. Tumati, J.T. Hsieh, K.T. Nguyen, and D. Saha, *Polymeric nanoparticles for targeted radiosensitization of prostate cancer cells*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(5): p. 1632-9.
144. Meric-Bernstam, F., A. Akcakanat, H. Chen, K.A. Do, T. Sangai, F. Adkins, et al., *PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1777-89.
145. Mladenov, E. and G. Iliakis, *Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 61-72.
146. Mladenov, E., S. Magin, A. Soni, and G. Iliakis, *DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy*. Front Oncol, 2013. **3**(113).
147. Modesti, M. and R. Kanaar, *DNA repair: Spot(light)s on chromatin*. Current Biology. **11**(6): p. R229-R232.
148. Montini, E., D. Cesana, M. Schmidt, F. Sanvito, C.C. Bartholomae, M. Ranzani, et al., *The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 964-75.
149. Moretto, F., M. Rampino, F. Munoz, M.G. Ruo Redda, A. Reali, V. Balcet, et al., *Conventional 2D (2DRT) and 3D conformal radiotherapy (3DCRT) versus intensity-modulated radiotherapy (IMRT) for nasopharyngeal cancer treatment*. Radiol Med, 2014. **119**(8): p. 634-41.
150. Morgenstern, J.P. and H. Land, *Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(12): p. 3587-96.
151. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura, *Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses*. Gene Ther, 2000. **7**(12): p. 1063-6.
152. Mullis, K.B. and F.A. Faloon, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
153. Murphy, M.P. and M.D. Brand, *Membrane-potential-dependent changes in the stoichiometry of charge translocation by the mitochondrial electron transport chain*. Eur J Biochem, 1988. **173**(3): p. 637-44.
154. Muzio, M., B.R. Stockwell, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit, *An induced proximity model for caspase-8 activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2926-30.
155. Nicoletti, I., G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi, *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.

156. O'Brien, C., J.J. Wallin, D. Sampath, D. GuhaThakurta, H. Savage, E.A. Punnoose, et al., *Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(14): p. 3670-83.
157. Oeck, S., N.M. Malewicz, S. Hurst, J. Rudner, and V. Jendrossek, *The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage*. Radiat Oncol, 2015. **10**(163): p. 015-0453.
158. Okano, J., I. Gaslightwala, M.J. Birnbaum, A.K. Rustgi, and H. Nakagawa, *Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30934-42.
159. Olive, P.L. and J.P. Banath, *Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(2): p. 331-5.
160. Ong, M., S. Carreira, J. Goodall, J. Mateo, I. Figueiredo, D.N. Rodrigues, et al., *Validation and utilisation of high-coverage next-generation sequencing to deliver the pharmacological audit trail*. Br J Cancer, 2014. **111**(5): p. 828-36.
161. Palm, A. and K.A. Johansson, *A review of the impact of photon and proton external beam radiotherapy treatment modalities on the dose distribution in field and out-of-field; implications for the long-term morbidity of cancer survivors*. Acta Oncol, 2007. **46**(4): p. 462-73.
162. Panganiban, R.A., A.L. Snow, and R.M. Day, *Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(8): p. 15931-58.
163. Panier, S. and D. Durocher, *Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(10): p. 661-72.
164. Paques, F. and J.E. Haber, *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(2): p. 349-404.
165. Park, J., J. Feng, Y. Li, O. Hammarsten, D.P. Brazil, and B.A. Hemmings, *DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of protein kinase B requires a specific recognition sequence in the C-terminal hydrophobic motif*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6169-74.
166. Pekarsky, Y., A. Koval, C. Hallas, R. Bichi, M. Tresini, S. Malstrom, et al., *Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(7): p. 3028-3033.
167. Peskin, A.V. and C.C. Winterbourn, *A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)*. Clin Chim Acta, 2000. **293**(1-2): p. 157-66.
168. Pilch, D.R., O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig, and W.M. Bonner, *Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites*. Biochem Cell Biol, 2003. **81**(3): p. 123-9.
169. Plo, I., C. Laulier, L. Gauthier, F. Lebrun, F. Calvo, and B.S. Lopez, *AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9404-12.
170. Rappold, I., K. Iwabuchi, T. Date, and J. Chen, *Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways*. J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 613-20.
171. Redon, C.E., J.S. Dickey, W.M. Bonner, and O.A. Sedelnikova, *gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin*. Adv Space Res, 2009. **43**(8): p. 1171-1178.
172. Resh, M.D., *Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(11): p. 584-590.
173. Richter, E., Feyerabend, T., *Allgemeine Strahlentherapie*. In: RICHTER E., FEYERABEND T., Grundlagen der Strahlentherapie, Springer Verlag, Berlin., 2002: p. 139-178. .
174. Rodemann, H.P., K. Dittmann, and M. Toulany, *Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair*. Int J Radiat Biol, 2007. **83**(11-12): p. 781-91.
175. Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner, *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 905-16.
176. Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner, *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
177. Rombi, B., C. Ares, E.B. Hug, R. Schneider, G. Goitein, A. Staab, et al., *Spot-scanning proton radiation therapy for pediatric chordoma and chondrosarcoma: clinical outcome of 26 patients treated at paul scherrer institute*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **86**(3): p. 578-84.
178. Röntgen, W. C Ueber eine neue Art von Strahlen. (Vorläufige Mittheilung.) In: Aus den Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft, Würzburg, 1895.
179. Rothkamm, K. and M. Löbrich, *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(9): p. 5057-5062.
180. Runge, R., R. Hiemann, M. Wendisch, U. Kasten-Pisula, K. Storch, K. Zoepfel, et al., *Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced gammaH2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®*. International Journal of Radiation Biology, 2012. **88**(5): p. 439-447.

8 Literaturverzeichnis

181. Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich, *Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. Nature, 1986. **324**(6093): p. 163-6.
182. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
183. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. , *Gel electrophoresis of DNA*. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA,, 1989. **chapter 6**. .
184. Samuels, Y. and V.E. Velculescu, *Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers*. Cell Cycle, 2004. **3**(10): p. 1221-4.
185. San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein, *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 229-57.
186. Sangai, T., A. Akcakanat, H. Chen, E. Tarco, Y. Wu, K.A. Do, et al., *Biomarkers of response to Akt inhibitor MK-2206 in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5816-28.
187. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977. Biotechnology, 1992. **24**: p. 104-8.
188. Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini, *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
189. Sarker, D., A.H. Reid, T.A. Yap, and J.S. de Bono, *Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(15): p. 4799-805.
190. Scaduto, R.C., Jr. and L.W. Grotyohann, *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*. Biophys J, 1999. **76**(1 Pt 1): p. 469-77.
191. Schaefer, L.H., D. Schuster, and J. Schaffer, *Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach*. J Microsc, 2004. **216**(Pt 2): p. 165-74.
192. Schipler, A. and G. Iliakis, *DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(16): p. 7589-605.
193. Schleifman, E.B., R. Tam, R. Patel, A. Tsan, T. Sumiyoshi, L. Fu, et al., *Next generation MUT-MAP, a high-sensitivity high-throughput microfluidics chip-based mutation analysis panel*. PLoS One, 2014. **9**(3).
194. Schmid, T.E., O. Zlobinskaya, and G. Multhoff, *Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation*. Curr Genomics, 2012. **13**(6): p. 418-25.
195. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
196. Schrödel, A., *Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(5): p. 289-289.
197. Schultz, L.B., N.H. Chehab, A. Malikzay, and T.D. Halazonetis, *p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks*. J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1381-90.
198. She, Q.B., S. Chandarlapaty, Q. Ye, J. Lobo, K.M. Haskell, K.R. Leander, et al., *Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. 0003065.
199. Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff, *Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 134-47.
200. Simonsen, A. and S.A. Tooze, *Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes*. J Cell Biol, 2009. **186**(6): p. 773-82.
201. Sjoblom, T., S. Jones, L.D. Wood, D.W. Parsons, J. Lin, T.D. Barber, et al., *The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers*. Science, 2006. **314**(5797): p. 268-74.
202. Song, M.S., L. Salmena, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(5): p. 283-96.
203. Sonoda, E., H. Hohegger, A. Saberi, Y. Taniguchi, and S. Takeda, *Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair*. DNA Repair, 2006. **5**(9-10): p. 1021-9.
204. Stabile, V., M. Russo, and P. Chieffi, *17beta-estradiol induces Akt-1 through estrogen receptor-beta in the frog (Rana esculenta) male germ cells*. Reproduction, 2006. **132**(3): p. 477-84.
205. Stemke-Hale, K., A.M. Gonzalez-Angulo, A. Lluch, R.M. Neve, W.L. Kuo, M. Davies, et al., *An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6084-91.
206. Stephens, P.J., P.S. Tarpey, H. Davies, P. Van Loo, C. Greenman, D.C. Wedge, et al., *The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 400-4.
207. Stiewe, T., *The p53 family in differentiation and tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 165-8.

8 Literaturverzeichnis

208. Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich, and P.A. Jeggo, *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation*. *Cancer Res*, 2004. **64**(7): p. 2390-6.
209. Stokoe, D., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. *Science*, 1997. **277**: p. 567-570.
210. Stronach, E.A., M. Chen, E.N. Maginn, R. Agarwal, G.B. Mills, H. Wasan, et al., *DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance*. *Neoplasia*, 2011. **13**(11): p. 1069-80.
211. Tavecchio, M., J. Munck, C. Cano, D. Newell, and N. Curtin, *Further characterisation of the cellular activity of the DNA-PK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2012. **69**(1): p. 155-164.
212. Thornberry, N.A., A. Rosen, and D.W. Nicholson, *Control of apoptosis by proteases*. *Adv Pharmacol*, 1997. **41**: p. 155-77.
213. Torre, L.A., F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, *Global cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
214. Toulany, M., R. Kehlbach, U. Florczak, A. Sak, S. Wang, J. Chen, et al., *Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(7): p. 1772-81.
215. Toulany, M., K.J. Lee, K.R. Fattah, Y.F. Lin, B. Fehrenbacher, M. Schaller, et al., *Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair*. *Mol Cancer Res*, 2012. **10**(7): p. 945-57.
216. Toulany, M. and H.P. Rodemann, *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35**: p. 180-90.
217. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
218. Tsoutsou, P.G. and M.I. Koukourakis, *Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(5): p. 1281-93.
219. Tyldesley, S., G. Delaney, F. Foroudi, L. Barbera, M. Kerba, and W. Mackillop, *Estimating the need for radiotherapy for patients with prostate, breast, and lung cancers: verification of model estimates of need with radiotherapy utilization data from British Columbia*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **79**(5): p. 1507-15.
220. Valerie, K. and L.F. Povirk, *Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5792-812.
221. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. *Nature*, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
222. Veuger, S.J., N.J. Curtin, C.J. Richardson, G.C. Smith, and B.W. Durkacz, *Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 6008-15.
223. Viniegra, J.G., N. Martinez, P. Modirassari, J. Hernandez Losa, C. Parada Cobo, V.J. Sanchez-Arevalo Lobo, et al., *Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4029-36.
224. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**: p. 489-501.
225. Wallace, R.B., M.J. Johnson, T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima, and K. Itakura, *The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit beta-globin DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1981. **9**(4): p. 879-94.
226. Weisner, J., R. Gontla, L. van der Westhuizen, S. Oeck, J. Ketzer, P. Janning, et al., *Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015. **54**(35): p. 10313-6.
227. West, C.M., S.E. Davidson, S.A. Roberts, and R.D. Hunter, *Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the Zervix*. *Br J Cancer*, 1993. **68**(4): p. 819-23.
228. Weterings, E. and D.J. Chen, *The endless tale of non-homologous end-joining*. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 114-24.
229. Wiesmann, V., D. Franz, C. Held, C. Munzenmayer, R. Palmisano, and T. Wittenberg, *Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs*. *J Microsc*, 2015. **257**(1): p. 39-53.
230. Withers, H.R., J.M. Taylor, and B. Maciejewski, *The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy*. *Acta Oncol*, 1988. **27**(2): p. 131-46.
231. Wu, W., M. Wang, T. Mussfeldt, and G. Iliakis, *Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ*. *Radiat Res*, 2008. **170**(4): p. 512-20.

8 Literaturverzeichnis

232. Yan, Y., V. Serra, L. Prudkin, M. Scaltriti, S. Murli, O. Rodriguez, et al., *Evaluation and clinical analyses of downstream targets of the Akt inhibitor GDC-0068*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(24): p. 6976-86.
233. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 124-31.
234. Yu, Y., R.E. Savage, S. Eathiraj, J. Meade, M.J. Wick, T. Hall, et al., *Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092*. PLoS One, 2015. **10**(10).
235. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
236. Zhang, T., G.B. Cui, J. Zhang, F. Zhang, Y.A. Zhou, T. Jiang, et al., *Inhibition of PI3 kinases enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation*. Oncol Rep, 2010. **24**(6): p. 1683-9.
237. Zhao, L. and P.K. Vogt, *Class I PI3K in oncogenic cellular transformation*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5486-96.
238. Zhao, Y., H.D. Thomas, M.A. Batey, I.G. Cowell, C.J. Richardson, R.J. Griffin, et al., *Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441*. Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 5354-62.
239. Zhou, H., S.A. Summers, M.J. Birnbaum, and R.N. Pittman, *Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 16568-75.
240. Zhuang, H., X. Zhao, L. Zhao, J.Y. Chang, and P. Wang, *Progress of clinical research on targeted therapy combined with thoracic radiotherapy for non-small-cell lung cancer*. Drug Des Devel Ther, 2014. **8**: p. 667-75.

9 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Verena Jendrossek für die Möglichkeit danken meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe mit allen notwendigen Notwendigkeiten durchzuführen. Dank ihr durfte ich an einem spannenden und aktuellen Thema arbeiten. Außerdem danke ich Verena für Förderung und Lehre zusätzlich zum Rahmen des DFG Graduiertenkollegs 1739. Danken möchte ich ihr auch für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Projektdurchführung, den Veröffentlichungen und dem Komplettieren der Doktorarbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank meinem Mentor und Zweitgutachter Prof. Dr. George Iliakis in dessen Institut für medizinische Strahlenbiologie ich die notwendigen Bestrahlungen durchführen durfte. Ich möchte mich außerdem dafür bedanken, dass ich bei ihm immer Rat und Unterstützung nicht nur im Bereich der DNA-Reparatur fand.

Dr. Helena Riffkin möchte ich an dieser Stelle unter anderem für die geleisteten Vorarbeiten an meinem Projekt, ihr offenes Ohr, viele Gespräche und die Einführung in die zellbiologischen Methoden danken.

Ich danke für die Unterstützung von Klaudia Al-Refae, sowie meiner RISE-, Master- und Bachelor-Studenten mit denen ich nicht nur viel Spaß im Labor hatte, sondern auch viele nützliche Daten produzieren konnte. Dies gilt auch für die gesamte Arbeitsgruppe der „Molekularen Zellbiologie“ des Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung). Besonders sei hier Angelika „Angie“ Warda erwähnt, die mir immer mit Rat, Tat, und Humor zur Seite stand. Dr. Diana Klein und Mohamed Benchellal möchte ich für die große Unterstützung bei den Tierexperimenten danken.

Großer Dank gilt Dr. Nathalie Malewicz für gemeinsames Durchhalten, ihre Unterstützung, Korrekturen der Doktorarbeit, Schinkie sowie Aufmunterung in der anstrengenden Zeit. Ohne sie wären neben unserer gemeinsamen Veröffentlichung auch viele andere Dinge in den letzten dreieinhalb Jahren erheblich schwieriger gewesen.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Familie und die Mitglieder des HC Bochums für die Unterstützung in allen erdenklichen Bereichen von Motivation, über Fachsimpen bis hin zur Fehlersuche in meiner Doktorarbeit.

10 Anhang

10.1 DNA- und Proteinmarker

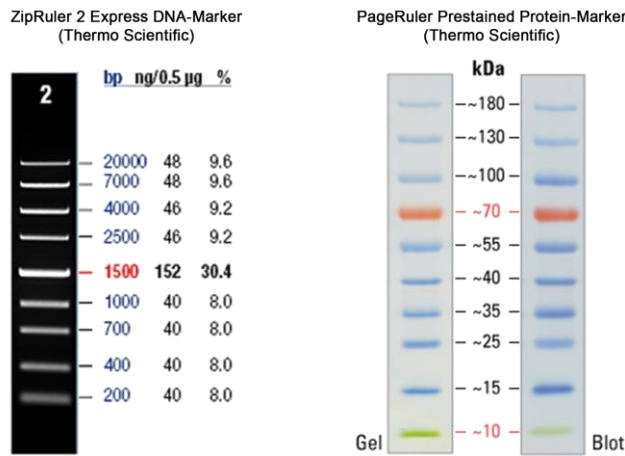


Abb. 10.1 -1 Die in dieser Arbeit genutzten DNA- und Protein-Marker

Diese Abbildung zeigt den verwendeten Agarosegel-DNA-Marker Zip2 Express und den für SDS-Gele benutzten Protein-Marker PageRuler Prestained.

10.2 Plasmidkarten

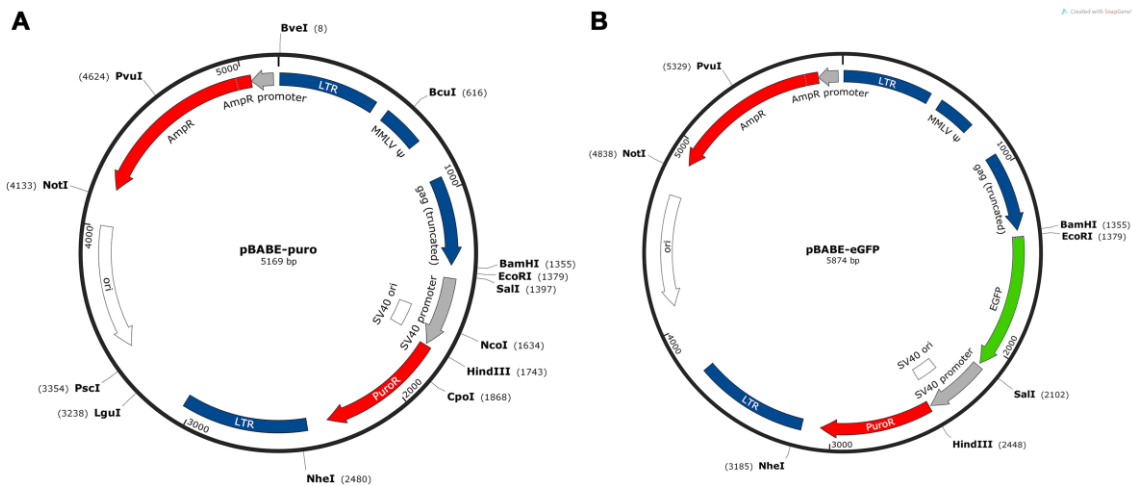


Abb. 10.2-1 pBABE-puro und pBABE-eGFP

Diese Abbildung zeigt die Plasmidkarten des Ursprungsplasmids pBABE-puro (A) und die des erzeugten Plasmids pBABE-eGFP (B). Durch Hinzufügen eines EGFP Genabschnittes mittels Klonierung wurde aus pBABE-puro pBABE-eGFP angefertigt.

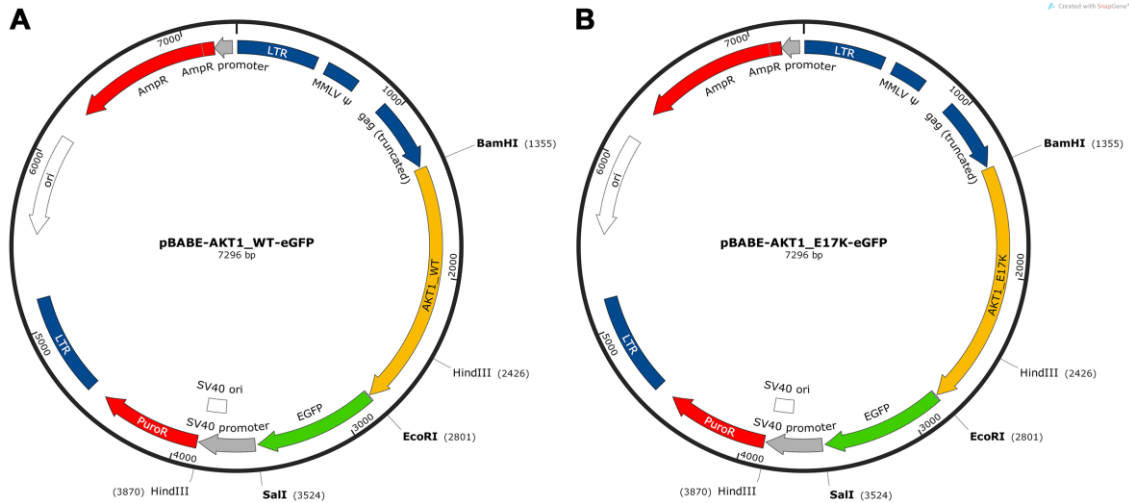


Abb. 10.2-2 pBABE-AKT1_WT-eGFP und pBABE-AKT1_E17K-eGFP

Diese Abbildung zeigt die Plasmidkarten des pBABE-AKT1_WT-eGFP (A) und des pBABE-AKT1_E17K-eGFP (B). pBABE-AKT1_WT-eGFP wurde durch Klonierung eines humanen AKT1-Gens in pBABE-eGFP erstellt. pBABE-AKT1_E17K-eGFP hingegen wurde durch eine Mutagenese-PCR aus pBABE-AKT1_WT-eGFP erzeugt.

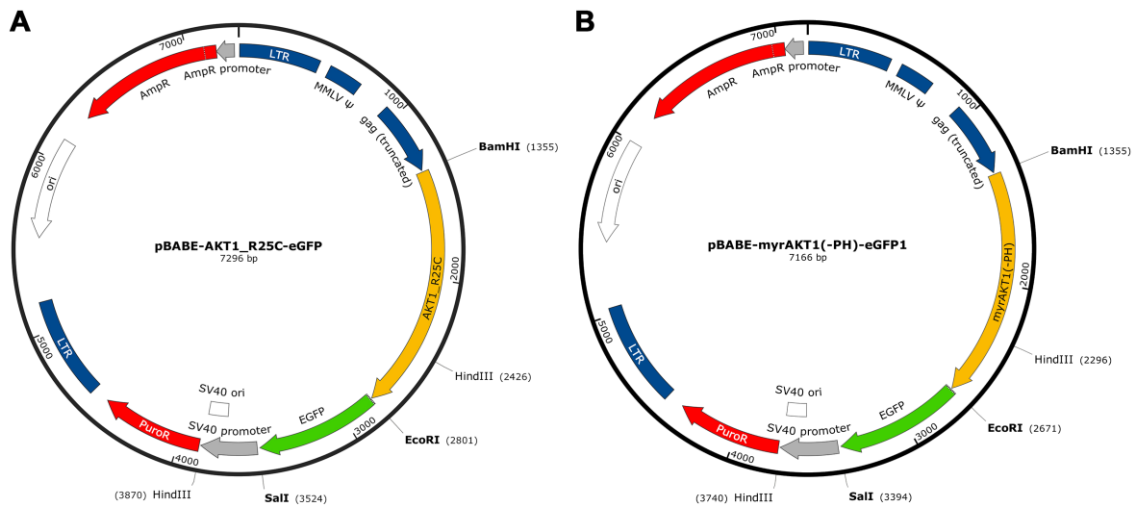


Abb. 10.2-3 pBABE-AKT1_R25C-eGFP und pBABE-myrAKT1(-PH)-eGFP

Diese Abbildung zeigt die Plasmidkarten des pBABE-AKT1_R25C-eGFP (A) und des pBABE-myrAKT1(-PH)-eGFP (B). pBABE-AKT1_R25C-eGFP wurde durch eine Mutagenese-PCR aus pBABE-AKT1_WT-eGFP erzeugt. Das myrAKT1(-PH) Gen wurde mit Hilfe von PCR auf pBABE-AKT1_WT-eGFP als Vorlage und eines speziellen Vorwärts-Primers amplifiziert. Durch Klonierung des myrAKT1(-PH)-Gens in pBABE-eGFP wurde pBABE-myrAKT1(-PH)-eGFP erstellt.

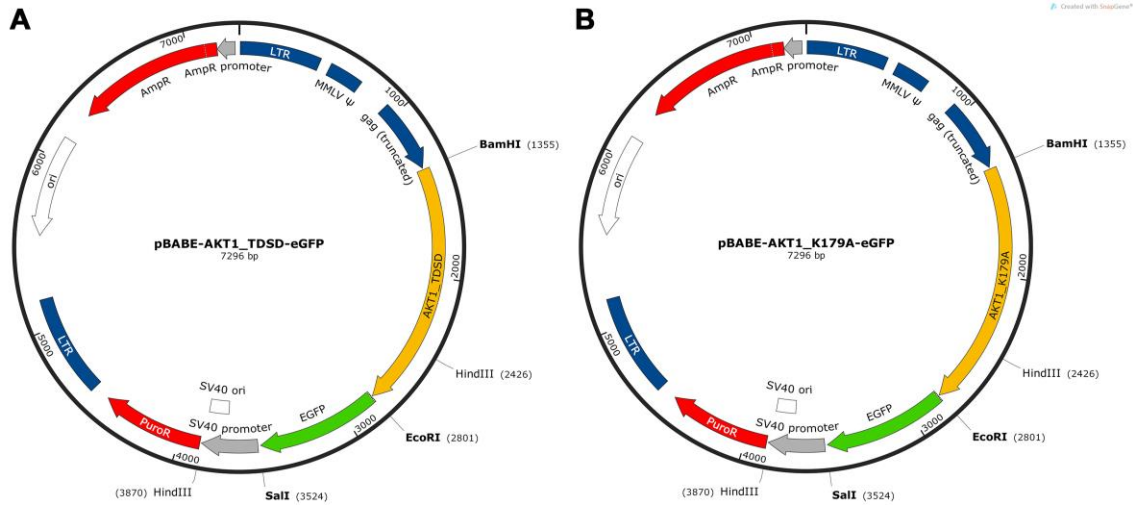
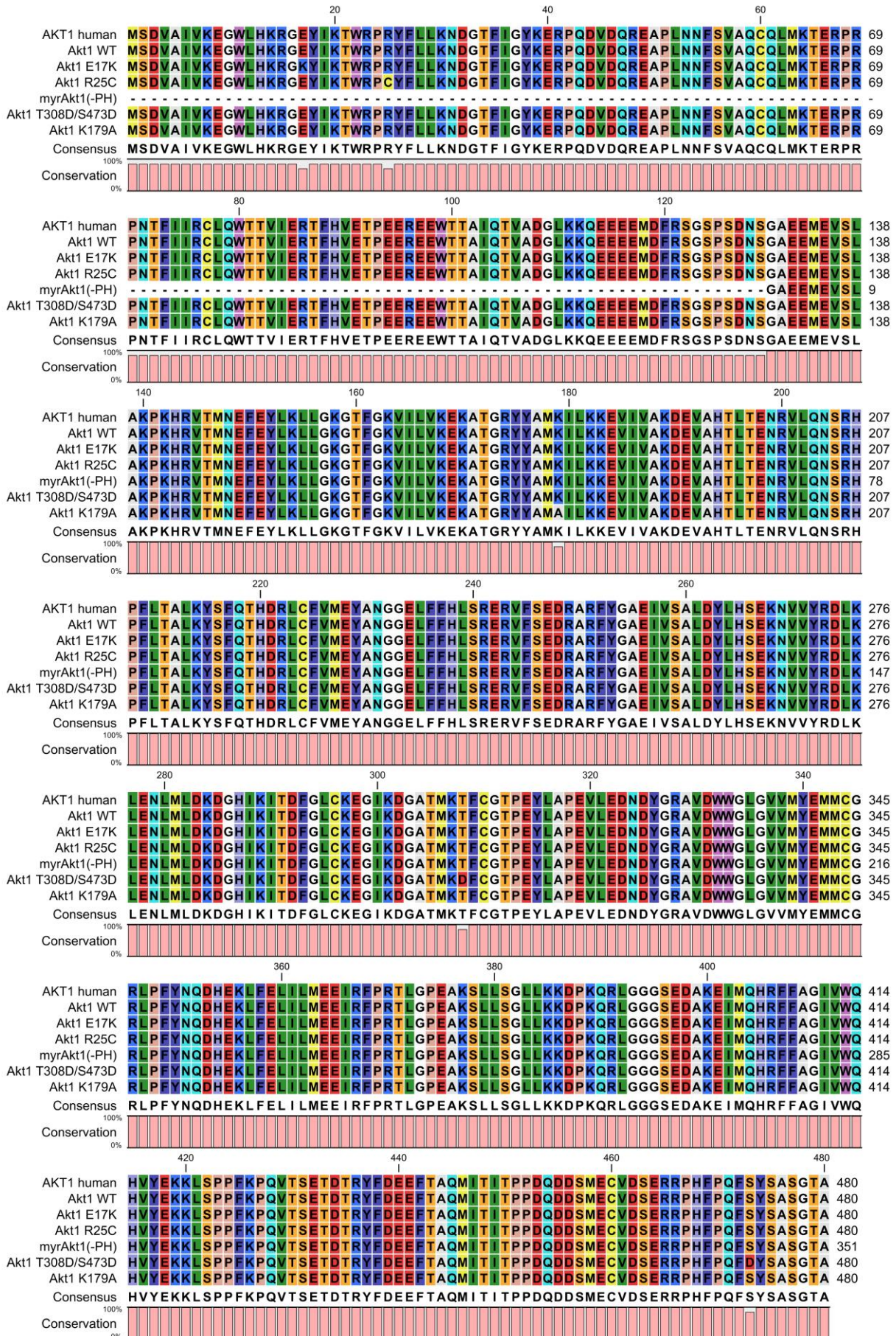


Abb. 10.2-4 pBABE-AKT1_TDSID-eGFP und pBABE-AKT1_K179A-eGFP

Diese Abbildung zeigt die Plasmidkarten des pBABE-AKT1_TDSID-eGFP (A) und des pBABE-AKT1_K179A-eGFP (B). Beide Plasmide wurden mittels Mutagenese-PCR mit pBABE-AKT1_WT-eGFP als Vorlage erzeugt.

10.3 Sequenzvergleich der AKT1-Varianten



Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Die Rolle der Proteinkinase B (Akt) bei der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Sebastian Oeck befürworte.

Essen, den _____
Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden