

Die Deubiquitinase USP9X stabilisiert das antiapoptotische Protein  
Mcl-1 in Prostatakarzinomzellen und vermittelt Strahlenresistenz

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Hogh-Binder, Sophia Alexandra

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ullrich

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Entstehung von Malignomen .....	1
1.2 Das Prostatakarzinom .....	2
1.2.1 Epidemiologie.....	3
1.2.2 Stadieneinteilung .....	4
1.2.3 Therapiestrategien .....	5
1.3 Apoptose .....	7
1.3.1 Relevanz der Apoptose in der Strahlentherapie .....	8
1.3.2 Abgrenzung der Apoptose zu anderen Zelltodformen .....	8
1.3.3 Morphologie der Apoptose.....	10
1.3.4 Der extrinsische Signalweg .....	11
1.3.5 Der intrinsische Signalweg.....	11
1.3.6 Die Caspase-Kaskade .....	13
1.3.7 Die Bcl-2-Familie .....	14
1.3.8 Die Regulierung der Bcl-2-Proteine .....	17
1.4 Das antiapoptotische Bcl-2-Protein Mcl-1 .....	17
1.4.1 Die Regulierung von Mcl-1 .....	18
1.4.2 Die Ubiquitinierung von Mcl-1 .....	19
1.5 Fragestellung.....	21
2 Material und Methoden .....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.4 Medien, Lösungen und Puffer .....	27
2.1.5 Antikörper.....	28
2.1.6 Zelllinien.....	29
2.2 Methoden .....	31
2.2.1 Zellkultur .....	31

2.2.2	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien .....	31
2.2.3	Zellzahlbestimmung .....	32
2.2.4	Bestrahlung der Zellen.....	32
2.2.5	Transfektion mit siRNA .....	32
2.2.6	Koloniebildungstest .....	33
2.2.7	Durchflusszytometrie.....	33
2.2.7.1	Zellzyklusanalyse nach Nicolettimethode.....	34
2.2.7.2	Messung des mitochondrialen Potentials mittels TMRE.....	36
2.2.8	Western Blot.....	37
2.2.8.1	Lysierung von Zellen .....	37
2.2.8.2	Lyse von Gewebeprobe.....	38
2.2.8.3	SDS-Gelelektrophorese .....	39
2.2.8.4	Blotting.....	39
2.2.8.5	Immunologische Markierung spezifischer Proteine.....	40
2.2.10	Auswertung.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Bcl-2-Proteinlevel in Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zur Lymphomzelllinie Jurkat.....	41
3.2	Apoptoseinduktion nach Bestrahlung.....	42
3.2.1	Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung.....	43
3.2.2	DNA-Degradierung nach Bestrahlung .....	44
3.2.3	Caspaseaktivierung nach Bestrahlung.....	45
3.3	Klonogenes Überleben nach Bestrahlung.....	46
3.4	Regulierung der pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung.....	48
3.6	USP9X-Herunterregulierung mittels siRNA .....	49
3.6.2	Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und DNA-Degradierung nach USP9X-Herunterregulierung .....	50
3.6.3	Mcl-1-Abundanz nach USP9X-Herunterregulierung.....	52
3.6.4	Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und DNA-Fragmentierung nach USP9X-Herunterregulierung und Bestrahlung.....	54

3.6.5	Klonogenes Überleben nach USP9X-Herunterregulierung.....	56
3.7	Abundanz von Mcl-1 und USP9X in in-vivo-Präparaten.....	58
4	Diskussion .....	61
4.1	Die Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC3 sind radioresistent .....	61
4.2	Stabilisierung des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung in LNCaP-Zellen.....	62
4.3	USP9X-vermittelte Mcl-1-Stabilisierung in Prostatakrebszellen .....	63
4.4	Vermehrtes Zellsterben und reduzierte Überlebensfraktion nach USP9X- Herunterregulierung in bestrahlten LNCaP- und PC3-Zellen .....	64
4.5	USP9X erhöht Zellsterben in PC3-Zellen unabhängig von Mcl-1-Abundanz	66
4.6	Bestrahlungsinduzierte Noxa-Hochregulation in PC3-Zellen .....	67
4.7	Mcl-1- und USP9X-Expression in Prostatakarzinompräparaten .....	68
4.8	Ausblick .....	70
5	Zusammenfassung .....	72
6	Literaturverzeichnis .....	74
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	84
8	Danksagung .....	85
9	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Micromol
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-associated X- protein
Bcl-2	B- cell- lymphoma 2
Bcl-x <sub>L</sub>	Lange Splicevariante des Bcl-x -Gens
BH 1-4	Bcl-2 Homology Domain
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim <sub>s, L, XL</sub>	Bim small, large, extra large
BP	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Casp.	Caspase
Caspasen	Cystein- Aspartat spezifische Proteasen
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
DUBs	Deubiquitinasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FSC	Forward Scatter
Gy	Gray
H	Stunden
HECT	Homologous to the E6- AP Carboxyl-Terminus (E6-AP ist eine Ubiquitin-Ligase)
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LDR-	Low dose rate-
Mcl-1	Myleoid cell leukemia sequence 1
min	Minuten
ml	Milliliter
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
MULE	Mcl-1 ubiquitin ligase E3
nM	Nanomol
nt	Non targeting
PARP	Poly- ADP- Ribose- Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCa	Prostatakarzinom
PI	Propidiumiodid
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
PSA	Prostataspezifisches Antigen
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RING	Really Interesting New Gene

RNA	Ribonucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
SSC	Sidewards Scatter
TBS	TRIS Buffered Saline
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked
$\beta$ - TrCP	$\beta$ -Tranducin repeat containing Protein
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Bcl-2-Proteine .....	14
Abbildung 2: Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die intrinsische Apoptose. .....	16
Abbildung 3: Durchflusszytometrie mittels FACScan am Beispiel der PC3-Zellen .....	36
Abbildung 4: Auftrennung der Zellen nach PI-Aufnahme am Beispiel der PC3-Zellen	36
Abbildung 5: Western Blot Analyse der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 im Vergleich zur Lymphomzelllinie Jurkat .....	42
Abbildung 6: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung.....	43
Abbildung 7: Bestimmung des Zellanteils mit fragmentierter DNA. ....	44
Abbildung 8: Messung der DNA-Degradierung in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 10 Gy.....	45
Abbildung 9: Western-Blot-Analyse der Caspase-3-Aktivität der Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 10 Gy.....	46
Abbildung 10: Klonogenes Überleben von bestrahlten LNCaP- und PC3-Zellen.....	47
Abbildung 11: Western Blot-Analyse der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie sowie der Deubiquitinase USP9X in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung.....	49
Abbildung 12: Effekt der USP9X-Herunterregulierung auf den Anteil der LNCaP- und PC3-Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ). .	51
Abbildung 13: Effekt der USP9X-Herunterregulierung auf die DNA-Fragmentierung in LNCaP- und PC3-Zellen .....	52
Abbildung 14: Einfluss von USP9X auf die strahleninduzierte Herunterregulierung des Mcl-1-Proteinlevels. ....	53
Abbildung 15: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in LNCaP- und PC3-Zellen nach USP9X-Herunterregulierung und Bestrahlung .....	55
Abbildung 16: DNA-Fragmentierung in LNCaP- und PC3-Zellen nach USP9X- Herunterregulierung und Bestrahlung .....	56
Abbildung 17: Koloniebildungstest nach Transfektion mit USP9X-siRNA.....	57
Abbildung 18: Mcl-1 und USP9x-Proteinlevel in Prostata-Proben von Patienten.....	59

## **1 Einleitung**

Die Strahlentherapie ist eine der wichtigsten therapeutischen Maßnahmen in der Behandlung von Tumoren. Besonders bei Prostatakarzinomen, die zu den häufigsten malignen Tumoren bei Männern zählen, wird die Strahlentherapie erfolgreich angewendet [Palacios et al., 2013]. Es werden dabei die antiproliferativen und zytotoxischen Effekte der ionisierenden Strahlen genutzt. Trotz der Möglichkeit der präzisen Eingrenzung des bestrahlten Gebiets wird auch immer gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen [Dreizen et al., 1977]. Um gravierende Schäden zu vermeiden, wird daher die maximale Strahlendosis und damit die erwünschte Wirkung auf das Tumorgewebe reduziert. Ein weiteres Problem ist das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegen ionisierende Strahlung bei malignen Tumoren [Ghotra et al., 2013]. Diese Resistenzen entstehen durch unterschiedliche Mechanismen, die den antiproliferativen und zytotoxischen Effekten der Strahlentherapie entgegen wirken. Eine besondere Rolle spielt dabei der programmierte Zelltod (Apoptose) der Tumorzellen, der in vielen Tumorzellen durch Bestrahlung nicht mehr initiiert werden kann [Bergman & Harris, 1997]. Das genauere Verständnis dieser Mechanismen und potenzieller Interventionsmöglichkeiten ist daher von besonderem Interesse für eine adäquate Krebstherapie. In dieser Arbeit sollen diese am Beispiel des Prostatakarzinoms untersucht werden.

In der Einleitung werden zunächst die allgemeine Entstehung von Malignomen und das Krankheitsbild des Prostatakarzinoms sowie dessen Behandlungsstrategien dargestellt. Darauf folgend werden die Mechanismen der Apoptose sowie der antiapoptotischen Vorgänge in Tumorzellen erklärt. Anschließend werden die verwendeten Methoden erklärt sowie die Forschungsergebnisse dargestellt und diskutiert.

### **1.1 Entstehung von Malignomen**

Der Begriff „Tumor“ (lat.: Wucherung) ist ein Überbegriff für eine Gewebsschwellung oder –vermehrung. Er bezeichnet prinzipiell auch gutartige (benigne) Zellvorgänge, wird jedoch im allgemeinen Sprachgebrauch mit bösartigen (malignen) Wucherungen assoziiert. Als Tumor wird ein Gewebeneubildung (Neoplasie) bezeichnet. In der weiteren Entwicklung kommt es zu einem unkontrollierten Wachstum einer Zellart.

Maligne Tumoren sind dabei - in Abgrenzung zu benignen Tumoren - in der Lage, in umliegendes Gewebe zu infiltrieren und zerstörend zu wachsen. Die Ursache dafür ist ein Ungleichgewicht von Zellwachstum und Zelltod zugunsten des Zellwachstums. Auslöser für dieses Missverhältnis können unter anderem ionisierende Strahlung, UV-Strahlung und Viren (u.v.a.) sein, die das zelluläre Genom so verändern, dass es zu einer Proliferation und nicht zum Absterben der geschädigten Zelle kommt.

Hanahan und Weinberg fassten im Jahr 2000 die Eigenschaften von malignen Tumorzellen in sechs „hallmarks of cancer“ (engl.: Markenzeichen des Krebses) zusammen. Trotz der hohen Diversität von Malignomen gelten diese Markenzeichen für alle Tumorentitäten [Hanahan & Weinberg, 2011].

Diese sechs Merkmale unterscheiden maligne Zellen von Normalgewebe:

1. die Fähigkeit der Aufrechterhaltung von Proliferationssignalen (engl. sustaining proliferative signaling),
2. die Umgehung von Wachstumsinhibitoren (engl. evading growth suppressors),
3. die Aktivierung der Invasion in andere Gewebe sowie die Streuung von Tochterzellen an andere Stellen im Körper, die Metastasierung (engl. activating invasion and metastasis),
4. die Ermöglichung der Unsterblichkeit der Zelle durch unendliche Replikation (engl. enabling replicative immortality),
5. die Herbeiführung der Angiogenese, der Neubildung von versorgenden Gefäßen (engl. inducing angiogenesis) sowie
6. die Resistenz gegenüber dem Zelltod (engl. resisting cell death)

Das sechste Merkmal, die Resistenz gegenüber dem Zelltod, ist nicht nur Grundlage der Entwicklung von Tumoren. Auch Resistenzen gegenüber Therapien werden durch die Verhinderung des Zelltodes hervorgerufen [Bergman & Harris, 1997]. Da diese Arbeit im Besonderen die Radioresistenz bei Prostatakarzinomen erforscht, wird im folgenden Kapitel zunächst das Krankheitsbild des Prostatakarzinoms mit Konzentration auf die Therapiestrategien vorgestellt.

## **1.2 Das Prostatakarzinom**

Das Prostatakarzinom ist eine maligne Erkrankung der Vorsteherdrüse. Sie betrifft viele Patienten und führt häufig zum Tode, besonders wenn sie erst spät diagnostiziert wird

oder die Progression der Erkrankung beziehungsweise entstandene Resistenzen gegenüber Therapien eine erfolgreiche Behandlung unmöglich machen. Die hohe Inzidenz sowie die Schwere der Erkrankung führen dazu, dass eine Erforschung der Pathomechanismen und der Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung sind. In diesem Abschnitt sollen das Krankheitsbild und die Therapiemöglichkeiten des Prostatakarzinoms vorgestellt werden, wobei bei den Therapien im Besonderen auf die Strahlentherapie eingegangen wird.

### **1.2.1 Epidemiologie**

Das Prostatakarzinom ist mit einem Anteil von über 25% aller diagnostizierten Krebserkrankungen in Deutschland die häufigste maligne Tumorentität des Mannes. Es ist die dritthäufigste Krebstodesursache und die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland ist seit 1999 um etwa 50% auf über 100 pro 100.000 angestiegen [Ferlay et al., 2013]. Der Anstieg der Neuerkrankungsraten ist am ehesten mit den vermehrten Vorsorgeuntersuchungen und Kontrollen des PSA-Wertes (PSA =Prostata-spezifisches Antigen) zu erklären, welcher bei Vorliegen einer Tumorerkrankung der Prostata meist erhöht ist und bei wiederholt erhöhten Werten Hinweis auf einen Tumor sein kann [D'Amico et al., 2008; Catalona et al., 1991]. Durch das Mehrangebot an Vorsorgeuntersuchungen werden heute Prostatakarzinome häufiger und früher diagnostiziert. Trotzdem befindet sich ein bedeutender Anteil der neu diagnostizierten Prostatakarzinome in fortgeschrittenen Stadien, da Frühsymptome ausbleiben können. Stärkster Risikofaktor für die Erkrankung ist das Alter. So liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 70 Jahren. Das Prostatakarzinom ist ein Tumor, der sich schleichend entwickelt und langsam wächst und daher oft erst viele Jahre nach Tumorbildung entdeckt wird. Einen weiteren wichtigen Faktor bei der Entstehung stellen auch die männlichen Geschlechtshormone dar, was im Rahmen der Therapie genutzt wird [Robert Koch Institut (Hrsg), 2012].

Die Einteilung der Karzinome ist vor allem für die Wahl der Therapie sowie für die Einschätzung der Prognose des Patienten bedeutend und wird im nächsten Absatz erläutert.

### 1.2.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms erfolgt nach der internationalen TNM-Klassifikation (für engl. tumor, node, metastasis) [Sellers, 1973]. Dabei werden folgende Kriterien bewertet:

- die Ausdehnung des Primärtumors (T1 = mikroskopischer Tumor, T2 = Tumor begrenzt auf die Prostata, T3 = Ausbreitung des Tumors auf die Prostatakapsel oder die Samenblasen, T4 = Ausbreitung auf benachbarte Strukturen und Organe),
- der Befall von Lymphknoten (N0 = keine Lymphknoten befallen/ N1 = regionärer Lymphknotenbefall), sowie
- das Vorhandensein von Fernmetastasen (M0 = keine Fernmetastasen / M1 = Fernmetastasen in andere Organe bzw. nicht regionäre Lymphknoten vorhanden).

Tumoren der Stadien T1-2N0M0 werden als lokal begrenzte Prostatakarzinome bezeichnet, die der Stadien T3-4N0M0 als lokal fortgeschrittene Prostatakarzinome. Liegt ein Befall der Lymphknoten vor (N1-4) oder besteht eine Metastasierung (M1), werden die Tumoren als fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Prostatakarzinom bezeichnet [Schroder et al., 1992].

Für die histologische Einteilung (engl.: grading) des Prostatakarzinoms hat sich der Gleason-Score international durchgesetzt. Dabei wird bestimmt, wie sehr sich die Tumorzellen von gesundem Gewebe unterscheiden, sprich wie entdifferenziert sie bereits sind.

Dabei werden zwei in einer Gewebeprobe sichtbare Tumorzellareale mit Punkten von 1 bis 5 bewertet, wobei die Probe mit niedriger Zahl gut differenziertes Gewebe bezeichnet. Die beiden Zahlen der Gewebeproben werden dann addiert, z. B. 2+3 ergibt den Gleason-Score 5 [Gleason, 1966]. In Kombination mit der Stadieneinteilung nach TNM gibt der Gleason Score Auskunft über die Prognose der Krankheit. Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich maßgeblich nach dem Stadium der Erkrankung, das vor Beginn der Therapie durch eine Untersuchung der Ausdehnung des Tumors, der Suche nach Fernmetastasen sowie einer Biopsie ermittelt wird. Daher ist die Kenntnis

der TNM-Klassifikation und dem Grading nach Gleason wichtig für das Verständnis der im Folgenden vorgestellten Therapien.

### **1.2.3 Therapiestrategien**

Die Therapie des Prostatakarzinoms erfolgt je nach Stadium und Metastasierungsstatus. Die Therapiemöglichkeiten bestehen aus einer chirurgischen Intervention, Chemotherapien, antihormonellen Therapien sowie der Strahlentherapie.

Bei lokal begrenztem Befund kann eine radikale Prostatektomie, eine externe perkutane Strahlentherapie und die Brachytherapie genutzt werden, um einen kurativen Ansatz zu verfolgen. Je nach Alter und Anzahl der Komorbiditäten kann aber auch das Konzept der „Active Surveillance“ verfolgt werden, bei dem zunächst keinerlei Therapie begonnen wird und der Befund in regelmäßigen Abständen kontrolliert wird.

Die Therapieempfehlung des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms reicht von radikaler Prostatektomie, kombiniert mit Lymphadenektomie und adjuvanter Strahlentherapie, über kombinierte perkutane Strahlentherapie mit antihormoneller Therapie [Akakura et al., 2006], bis hin zum „Watchful Waiting“, bei der keinerlei Therapie begonnen wird, wenn die Lebenserwartung des Patienten unabhängig des Befundes der Prostata kleiner zehn Jahren beträgt.

#### **Radikale Prostatektomie**

Die radikale Prostatektomie sollte vor allem bei Patienten erwogen werden, bei denen eine vollständige Entfernung erreicht werden kann. Komplikationen dieser Therapie können der Verlust der Harnkontinenz sowie der Erektionsfunktion sein [Swindle et al., 2005]. Sie wird in Kombination mit einer Lymphadenektomie und einer antihormonellen Therapie auch bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom empfohlen [Akakura et al., 2006].

#### **Hormonablative Therapie**

Bei Patienten mit lokal begrenztem sowie fortgeschrittenem Tumor wird zusätzlich zur perkutanen Strahlentherapie eine vorausgehende oder begleitende hormonablative Therapie empfohlen. Sie führt zu einer Verbesserung des Überlebens verglichen mit einer alleinigen Strahlentherapie bei Patienten, die nicht an schweren Komorbiditäten leiden [D'Amico et al., 2008].

### **Androgendeprivation**

Die Androgendeprivation im Rahmen einer medikamentösen oder operativen Kastration stellt bei einem metastasierten Prostatakarzinom eine wirksame Behandlungsmethode dar [Uzzo et al., 2008].

Es gibt auch Prostatakarzinome, die kastrationsresistent sind und trotz suffizienter antiandrogener Therapie eine Krankheitsprogression zeigen. Diese sind in der Regel nicht heilbar und können nur symptomatisch durch eine zusätzliche Therapie mit Steroiden oder Chemotherapeutika behandelt werden.

### **Brachytherapie**

Bei der Brachytherapie wird eine Strahlenquelle unmittelbar in oder neben dem zu behandelnden Gewebe platziert, wodurch eine verbesserte Schonung des gesunden umgebenden Gewebes erreicht wird. Es werden zwei Formen der Brachytherapie unterschieden. Der Einsatz von LDR- (engl. low dose rate) Brachytherapie (bis zu 2 Gy/h) wird vor allem für Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom aller Risikogruppen empfohlen. Die HDR- (engl. high dose rate)-Afterloading-Brachytherapie (bis zu 12 Gy/h) wird als wirksamere Form bei der Behandlung des Prostatakarzinoms angesehen. Es werden dabei, über vorher eingeführte Katheter, Strahlenquellen im Gewebe platziert, welche dort über eine individuell berechnete Zeitspanne verbleiben [Koukourakis et al., 2009].

### **Perkutane Strahlentherapie**

Die perkutane Strahlentherapie auf Basis der dreidimensionalen (3D-konformalen) Bestrahlungsplanung ist eine primäre Therapieoption beim lokal begrenzten Prostatakarzinom [Wang et al., 2005]. Bei der 3D-CRT (engl. three dimensional conformal radiation therapy) handelt es sich um eine perkutane Strahlentherapie, bei der möglichst genau die als therapeutisch erachtete Zieldosis modelliert werden und gleichzeitig eine verbesserte Schonung umliegender Gewebe erreicht werden kann. Sie ersetzt die konventionelle Radiotherapie aufgrund signifikant reduzierter Morbidität [Morris et al., 2005]. Die empfohlene Behandlungsdosis von 74-80 Gy wird in einer Standardfraktionierung (1,8-2,0 Gy Einzeldosen) appliziert. In manchen Fällen kann auch eine Dosiserhöhung mit Ziel der verbesserten Tumorkontrolle in Abwägung der

strahlenbedingten Toxizität verabreicht werden. So wird die Dosis von 60-70 Gy zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms als zu gering angesehen [Akakura et al., 2006]. Eine valide alternative Fraktionierungsmethode ist die Hypofraktionierung, bei der eine niedrigere Gesamtdosis über höhere Einzeldosen verabreicht wird.

Im Rahmen der Strahlentherapie sind radioresistente Formen des Prostatakarzinoms ein schwerwiegendes Problem, bei denen vermutet wird, dass es durch Abweichungen in der Regulierung der Apoptosewege zu einem verminderten Zellsterben nach Bestrahlung kommt [Uzzo et al., 2008]. Die Erforschung der Mechanismen, die zu einer Strahlenresistenz führen, ist von zentraler Bedeutung für Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen. In etwa 20- 30% der primär bestrahlten Prostatatumoren zeigen sich Radioresistenzen oder Rezidive [Nakajima et al., 2014]. Da es durch die Therapie mit ionisierender Strahlung in den Zellen durch DNA-Schädigung zur Induktion der Apoptose kommen kann, ist die Verhinderung der Apoptose eine mögliche Erklärung für die Entstehung von Therapieresistenzen [Uzzo et al., 2008]. Daher sollen die morphologischen und zytochemischen Prozesse der Apoptose im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

### **1.3 Apoptose**

Der programmierte Zelltod in Form der Apoptose ist eine besondere Form des Zelluntergangs, bei dem es beispielsweise aufgrund von Schädigungen durch eine Strahlentherapie, die von der Zelle nicht mehr repariert werden können, zu einem programmierten Zellsterben kommt. Die Apoptose spielt aber auch während der Embryogenese und bei der Gewebshomöostase eine zentrale Rolle. Hier ist nicht eine Zellschädigung ausschlaggebend für ihre Initiation, sondern ein genetisch kodiertes Programm. Ein wichtiges Merkmal der Apoptose ist, dass es durch sie zu keiner Beeinträchtigung von umliegenden Zellen kommt. Fresszellen entsorgen apoptotische Zellen durch Phagozytose und vermeiden so Immunreaktionen, die bei nekrotischem Zelltod auftreten würden.

Die Untersuchung der zellulären Vorgänge während der Apoptose ist in der onkologischen Forschung von großer Bedeutung, da diese eine natürliche Barriere

gegenüber der Krebsentstehung darstellt [Adams & Cory, 2007; Green & Evan, 2002]. Auch die Entwicklung von Therapieresistenzen kann auf einer fehlerhaften oder verhinderten Apoptose beruhen [Uzzo et al., 2008]. Deshalb sollen in diesem Kapitel die Bedeutung der Apoptose für die Strahlentherapie erörtert werden. Es wird ein Überblick über die zellulären Vorgänge während der Apoptose in Abgrenzung zu anderen Zelltodformen gegeben. Insbesondere wird auf die Mitglieder der Bcl-2-Familie eingegangen, welche die Apoptose begünstigen oder verhindern können.

### **1.3.1 Relevanz der Apoptose in der Strahlentherapie**

Der Wirkmechanismus der Strahlentherapie beruht auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und apoptotischem bzw. nekrotischem Zelltod [Uzzo et al., 2008]. Manche Karzinome weisen verstärkte antiapoptotische Mechanismen auf, die zur Ausbildung einer Apoptoseresistenz führen können und somit die Erfolge der Strahlentherapie beeinträchtigen. Vor allem Mitglieder der Bcl-2-Familie sind hierfür verantwortlich [Anai et al., 2007; Adams & Cory, 2007; Streffer et al., 2002; Adams & Cory, 2007]. Diese regulierenden Proteine spielen wichtige Rollen in den apoptotischen Signalwegen. Ihre Modulierung kann eventuell zu einem verbesserten Ansprechen auf Strahlentherapie führen [Craig, 2002].

### **1.3.2 Abgrenzung der Apoptose zu anderen Zelltodformen**

Der Tod einer Zelle kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Man unterscheidet dabei zwischen zwei programmierten Zelltodformen: der Apoptose und der programmierten Nekrose [McCall, 2010]. Weitere Zelltodformen, deren Bedeutung bei der Entstehung und Behandlung von Krebs noch nicht geklärt ist, werden ebenfalls vorgestellt: die mitotische Katastrophe und die Seneszenz [Okada & Mak, 2004]. Die Autophagie (gr. „auto“ = selbst, „phagy“ = essen), die in Stress- und Mangelsituationen das Überleben der Zelle sichern soll, kann ebenfalls zum Zelltod führen. Folgend werden kurz die nichtapoptotischen Zelltodformen erläutert.

#### **Autophagie**

Die Autophagie beschreibt einen katabolen Vorgang in der Zelle, bei welchem Organellen oder Proteine durch das Lysosom abgebaut werden können. Dabei bilden sich Vesikel in der Zelle, in welche Teile des Zytoplasmas und Organellen eingeschlossen sind. Diese „Autophagosomen“ fusionieren dann mit dem Lysosom

[Levine & Klionsky, 2004]. Der Zusammenhang zwischen Autophagie und Tumorentstehung wird unter anderem bei Mammakarzinomen erforscht [Liang et al., 1999]. Ob Autophagie bei Malignomen eher tumorprotektiv oder tumorsuppressiv wirkt, bleibt dabei jedoch unklar. Einerseits kann übermäßige Autophagie die Tumorzellen umbringen. Andererseits kann sie in Stress- und Mangelsituationen durch Bereitstellen von Energie und Struktur molekülen das Überleben der Tumorzellen gewährleisten und so zu Therapieresistenzen beitragen [Shintani & Klionsky, 2004].

### **Nekrose**

Nekrose und programmierte Nekrose führen im Gegensatz zur Apoptose zum Anschwellen und Platzen der Zellen [McCall, 2010]. Nekrosen können zu einer Immunantwort führen, da durch das Aufplatzen der Zelle antigen wirkende zytoplasmatische Moleküle freigesetzt werden. Letztere können Immunzellen aktivieren und die Freisetzung entzündungsfördernder Botenstoffe, den proinflammatorischen Zytokinen stimulieren [Kepp et al., 2009].

### **Seneszenz**

Mit Seneszenz (von lateinisch senescere = „alt werden, altern“) wird ein Zustand der Zelle beschrieben, in welchem sich die Zelle in einem permanenten Zellzyklusarrest befindet. Dieser Effekt wurde vor allem bei in-vitro Zellkulturen beobachtet, es wird aber vermutet, dass die Seneszenz sowohl beim Altern der Zellen in vivo sowie bei der Tumorsuppression eine Rolle spielt. Mittels eines spezifischen Biomarkers, einer  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), können seneszente Zellen angefärbt werden [Dimri et al., 1995]. Die Seneszenz tritt ein, da sich bei jeder Replikation die Telomere der DNA kürzen, bis es schließlich zu keiner Teilung mehr kommt [Hayflick & Moorhead, 1961]. Die Telomere können so stark gekürzt sein, dass es ebenso zur Bindung von Proteinen kommt, die DNA-Schäden erkennen, und damit zur Induktion des programmierten Zelltodes [Kong et al., 2011]. Die seneszenztypischen morphologischen Veränderungen wurden aber auch bei Zellen, die unter verschiedenem zellulären Stress standen, beobachtet, obwohl diese keine verkürzten Telomere aufwiesen [Okada & Mak, 2004]. Auch in Verbindung mit Tumorzellen wird die Seneszenz diskutiert, die unabhängig von der Telomerlänge ist. Entartete Zellen können im Gegensatz zu gesunden Zellen eine stark erhöhte Telomeraseaktivität aufweisen. Diese Enzyme können die Telomere

der replizierten DNA-Abschnitte verlängern und so die limitierte Lebensdauer von Zellen überschreiten. Sie können zu deren Immortalisierung führen [Kong et al., 2011].

### **Mitotische Katastrophe**

Die mitotische Katastrophe ist ein durch Fehler in der Mitose angeregter Vorgang. Vor der Mitose wird zuletzt am G<sub>2</sub>-Checkpoint des Zellzyklus die Qualität der DNA überprüft. DNA-Schäden werden während eines G<sub>2</sub>/M-Arrests repariert. Ist der Schaden jedoch nicht zu beheben, erfolgt normalerweise die Initiation der Apoptose. Unter bestimmten Umständen kann die Mitose trotz residueller DNA-Schäden eingeleitet werden und zur mitotischen Katastrophe führen, in deren Folge die Tochterzellen verzögert absterben oder seneszent werden. Dabei scheint das Protein Survivin (BIRC5), das in vielen Tumorzellen hochreguliert wird, eine wichtige, protektive Rolle zu spielen, indem es sowohl die mitotische Katastrophe als auch die Apoptose der Zellen verhindert [Lamers et al., 2011; Fujie et al., 2005].

Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die Resistenz gegen den apoptotischen Zelltod bei Prostatakarzinomen für das verminderte Ansprechen auf die Strahlentherapie verantwortlich sein könnte [Ghotra et al., 2013; Krajewska et al., 1996; McKenzie & Kyprianou, 2006]. Diese Arbeit untersucht deswegen Mechanismen, die für diese Apoptoseresistenz verantwortlich sind. Im nachstehenden Kapitel soll diese Form des Zelltodes genauer dargestellt werden.

### **1.3.3 Morphologie der Apoptose**

Die Apoptose ist essenziell für die Entwicklung des menschlichen Körpers. Durch sie wird beispielsweise die Formung der Finger in der Embryonalentwicklung, die Erneuerung von Schleimhäuten sowie der Blutzellen im adulten Organismus geregelt. Gelangt diese Homöostase von Zelltod und -überleben aus dem Gleichgewicht, können Tumoren die Folge sein [Cotter, 2009]. Die Apoptose ist ATP-abhängig, erfordert also Energie, und geschieht in Zellen, deren Zellmembran intakt bleibt. Weitere morphologische Charakteristika sind ein Schrumpfen der Zellen, eine Kondensation und Fragmentierung der DNA und das Abschnüren (Blebbing) von leicht phagozytierbaren, zytoplasmagefüllten Membranvesikeln, den sogenannten „Apoptotic Bodies“ [Kerr et al. 1972; Corvo, 1996].

Grundlage der durch Kerr et al. beschriebenen morphologischen Veränderungen sind intrazelluläre Signalkaskaden [Kerr et al., 1972]. Seit über vierzig Jahren werden die intrazellulären Signalwege immer weiter entschlüsselt und die wichtigsten Moleküle der Apoptose identifiziert. Die Initiation der Apoptose kann aufgrund von extrazellulären Signalen (extrinsisch) erfolgen oder durch intrazelluläre Schäden (intrinsisch) verursacht werden. Die Einleitung (Initiationsphase) der Apoptose erfolgt also auf verschiedenen Wegen, die Ausführung (Exekutionsphase) hingegen nach gleichen Mechanismen. Im Zentrum der Exekutionsphase stehen die Effektorcaspasen, die die zellulären Strukturen auflösen, indem sie viele Strukturproteine proteolytisch schneiden [Chowdhury et al., 2006]. Die Vorgänge der extrinsischen beziehungsweise intrinsischen Apoptoseinitiation werden in den folgenden Kapiteln erläutert. Im Anschluss werden die gemeinsame Exekutionsphase und damit die Aktivierung der Caspasen beschrieben.

#### **1.3.4 Der extrinsische Signalweg**

Bei der *extrinsischen*, also von außen induzierten Apoptose binden Todesliganden an so genannte Todesrezeptoren der TNF- (engl.: tumor necrosis factor-) Rezeptorfamilie und aktivieren diese. Die Todesrezeptoren weisen eine intrazelluläre Todesdomäne (engl.: death domain) auf, durch welche Caspase-8 zum aktivierten Rezeptorkomplex rekrutiert und an diesem auch aktiviert wird. Dadurch kommt es zur nachfolgenden Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6 und -7 [Youle & Strasser, 2008]. Diese Aktivierung der Effektorcaspasen und damit die Exekutionsphase ist die gemeinsame Endstrecke der extrinsischen und intrinsischen Apoptose.

#### **1.3.5 Der intrinsische Signalweg**

Die intrinsische Initiation der Apoptose erfolgt rezeptorunabhängig aufgrund von beispielweise DNA-Schäden oder Wachstumsfaktorentzug. In der onkologischen Strahlentherapie versucht man diesen Mechanismus auszunutzen. Durch die Bestrahlung entstehen DNA-Schäden in den Tumorzellen, die die Initiation der Apoptose induzieren können [Deng et al., 2012; Belka et al., 2004; Corvo, 1996]. Ein wichtiger Modulator und Induktor dieses Apoptosewegs ist der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53. Dieser kann zu einem Zellzyklusarrest führen und so der

Zelle die Reparatur von DNA-Schäden ermöglichen. Ist das Genom zu stark geschädigt und die Reparatur nicht mehr möglich, führt er zur Induktion der Apoptose. Dadurch verhindert er eine Replikation des geschädigten Genoms und somit die Entstehung von entarteten Zellen [Corvo, 1996].

Kommt es zu einer Apoptoseinduktion infolge einer nicht reparierbaren DNA-Schädigung, so werden durch eine Konformationsänderung und Oligomerisierung die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak aktiviert. Bax ist im Zytosol lokalisiert und wird nach Aktivierung zum Mitochondrium transloziert. Bak befindet sich bereits am Mitochondrium und unterliegt dort nach Aktivierung einer Konformationsänderung. Durch diese Vorgänge kommt es zur Destabilisierung und Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Dies resultiert in der Freilassung von Cytochrom c und SMAC (engl. second mitochondrial activator of caspases), sowie weiteren Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum [Tait & Green, 2010; Lomonosova & Chinnadurai, 2008]. Dieser Vorgang wird MOMP (engl. mitochondrial outer membrane permeabilization) genannt und steht im Zentrum des mitochondrialen Apoptosewegs. Er wird als „point of no return“ gesehen und ist daher gut kontrolliert. Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wirken dieser Permeabilisierung entgegen. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> die intrinsische Apoptose nach Bestrahlung inhibieren kann [Belka et al., 2000] .

Das im Zytosol freigesetzte Cytochrom c bindet anschließend an APAF1 (engl. apoptotic protease-activating factor 1) und formt das Apoptosom, ein heptamerischer Proteinkomplex, der sieben Bindungsstellen für Procaspase-9 aufweist. Durch die Bindung an die Caspase-Rekrutierungsdomäne von Apaf-1 wird Caspase-9 aktiviert. Die aktive Caspase-9 kann wiederum Effektorcaspasen aktivieren und somit eine Caspasen-Kaskade initiieren [Li et al., 1997; Chowdhury et al., 2006].

Der intrinsische, auch mitochondrial genannte, und der extrinsische Signalweg der Apoptose sind miteinander durch das proapoptotische Bcl-2-Protein Bid vernetzt. Die am Todesrezeptorkomplex aktivierte Caspase-8 kann Bid spalten. Es entsteht ein verkürztes Bid, tBid (engl. truncated Bid) genannt, welches durch die Bindung an die proapoptotischen Proteine Bax und Bak diese aktivieren und so nachfolgend die

Cytochrom c-Freisetzung aus dem Mitochondrium und die nachfolgende Caspasenaktivierung induzieren kann [Wang et al., 1996]. Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Rudner in der Experimentellen Radioonkologie an der Universität Tübingen konnte zeigen, dass das durch die extrinsische Apoptose aktivierte Bid durch Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 neutralisiert wird und somit die extrinsische Apoptose in Zellen mit hohen Bcl-2-Level abgeschwächt sein kann [Rudner et al., 2005].

### **1.3.6 Die Caspase-Kaskade**

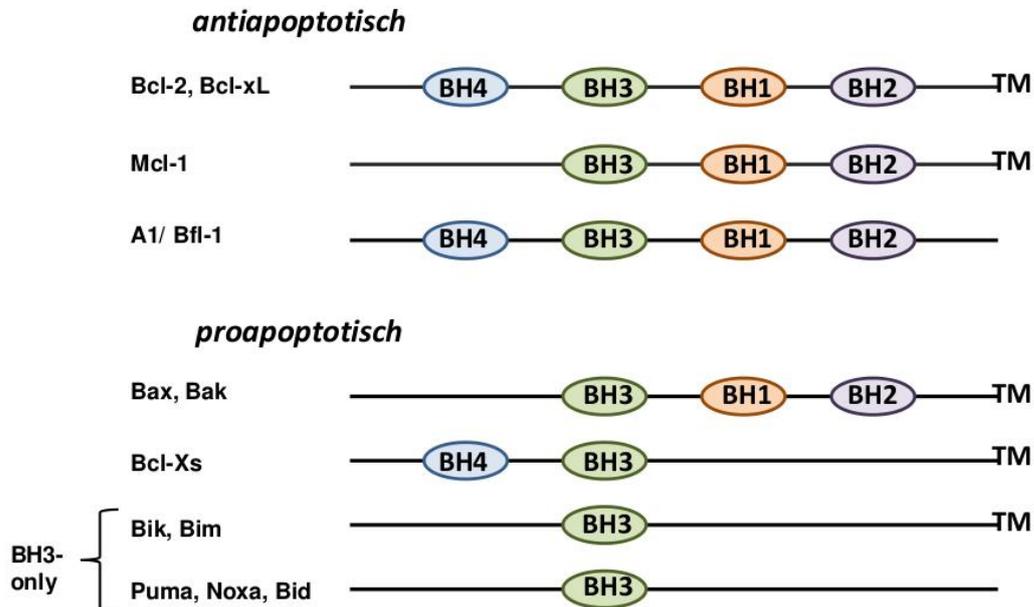
Eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielen die Caspasen, die sowohl an der Initiation sowie der Exekution beteiligt sind [Aslan & Thomas, 2009]. Als Caspasen werden Proteasen bezeichnet, die die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum aufweisen und Proteine oder andere Caspasen nach Aspartatresten spalten [Nicholson & Thornberry, 1997]. Im Rahmen der Apoptose werden Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8 und -9) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterschieden. Die verschiedenen Mitglieder der Caspasenfamilie sind durch eine Kaskade miteinander verknüpft. Initiatorcaspasen werden während der Initiationsphase der Apoptose aktiviert. Im Rahmen der extrinsischen Initiation kommt es zur initialen Aktivierung von Caspase-8 und -10, im Rahmen der intrinsischen Initiation zur Aktivierung von Caspase-9. Effektorcaspasen werden durch Initiatorcaspasen aktiviert [Riedl et al., 2001]. Diese Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung an der Carboxylseite von Aspartatresten. Caspase-3 und -7 selbst sind nach Aktivierung an der Auflösung der Zellkernmembran und des Zytoskeletts beteiligt, aktivieren jedoch auch weitere Moleküle, wie etwa DNAsen oder weitere Caspasen. Die aktivierende Spaltung kann mit Hilfe des Immunoblots nachgewiesen werden und dient als Nachweis der Apoptose in den Zellen [Chowdhury et al., 2006].

Neben der zentralen Rolle der Caspasen bei der Ausführung der Apoptose ist die strenge Regulierung der Initiation durch andere Proteine entscheidend. Eine sehr wichtige Rolle, insbesondere bei der Regulierung der intrinsischen Apoptose, spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 1.3.7 Die Bcl-2-Familie

Die Kontrolle der Apoptose wird durch eine Reihe komplexer Interaktionen geregelt, unter anderem durch die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (Abk. für engl. B-cell-lymphoma 2) [Kim et al., 2006; Yip & Reed, 2008; Gross et al., 1999]. Die ersten beschriebenen Mitglieder der Bcl-2-Proteine wurden in B-Zell-Lymphomen entdeckt - davon abgeleitet ist die Namensgebung dieser Proteinfamilie - und später auch in anderen Geweben nachgewiesen. Das Molekül Bcl-2 ist das erste identifizierte Onkogen, das den Zelltod inhibiert. Es wurde in erhöhten Mengen in B-Zell-Lymphomen gefunden [Reed et al., 1988].

Es sind mittlerweile mehrere gut charakterisierte Bcl-2-Proteine bekannt, die in drei Untergruppen unterteilt werden. Alle Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie teilen sogenannte BH- (engl. Bcl-2 Homology)-Domänen. Entscheidend für die Zuordnung der Gruppen ist die Zusammensetzung der Bcl-2-Proteine aus den vier homologen Domänen und ihre Funktion. Bildlich dargestellt ist diese strukturelle Einteilung in Abbildung 1.



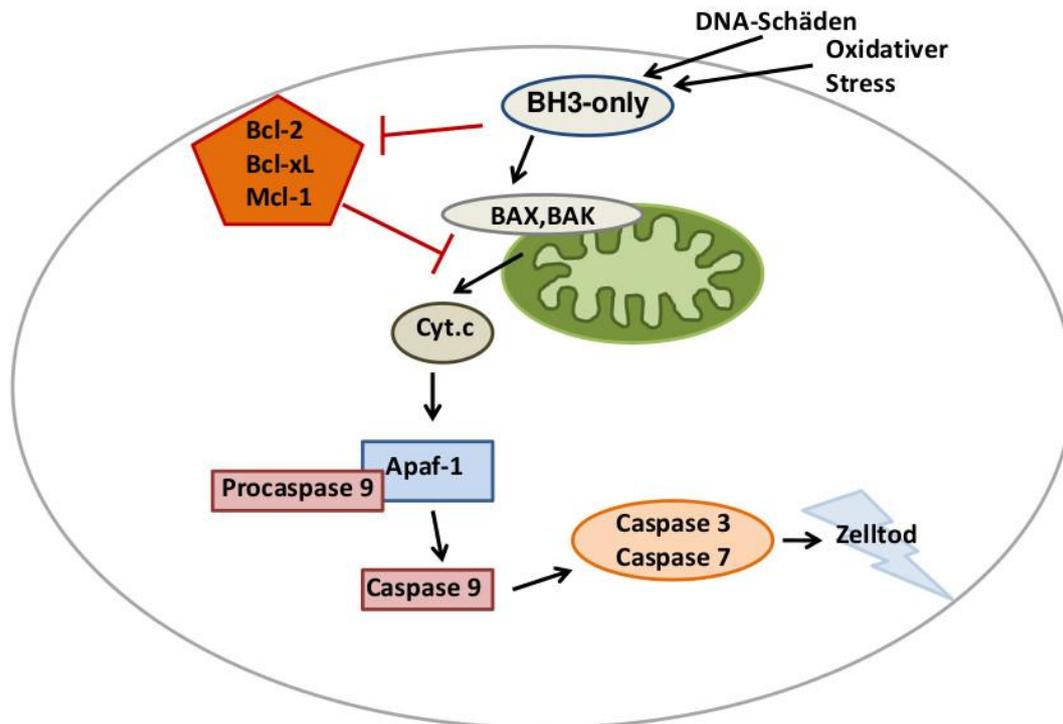
**Abbildung 1: Aufbau der Bcl-2-Proteine**

Entsprechend ihrer pro- und antiapoptotischen Funktion sind die wichtigsten Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie in ihrem Aufbau schematisch dargestellt. Sie bestehen aus einer oder mehreren BH-Domänen (Bcl-2 homologue, BH1-BH4). Auch können sie eine Transmembrandomäne aufweisen. Innerhalb der proapoptotischen Mitglieder werden noch die Bcl-2-Proteine mit nur einer BH3-Domäne (BH3-only) von den anderen unterschieden [nach Youle & Strasser 2008].

Zur ersten Gruppe gehören die antiapoptotischen Mitglieder, die in der Regel aus allen vier BH-Domänen bestehen (BH1- 4): Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (Bcl-extra large), A1/ Bfl-1. Das antiapoptotische Protein Mcl-1 (engl. myeloid leukemia cell differentiation 1) bildet hier eine strukturelle Ausnahme, da es nur drei der vier BH-Domänen besitzt [Quinn et al., 2011]. Die proapoptotische Gruppe wird weiter unterteilt in eine Gruppe, deren Mitglieder drei BH-Domänen haben (BH1-3) und eine Gruppe, deren proapoptotischen Mitglieder nur eine BH3-Domäne besitzen. Zur ersteren gehören Bax (engl. Bcl-2-associated X protein) und Bak (engl. BCL-2 antagonist or killer) sowie Bok (engl. Bcl-2 related ovarian killer), zur letzteren die BH3-only-Proteine Bid (engl. BH3-interacting domain death agonist), Puma (engl. p53 upregulated modulator of apoptosis), Noxa bzw. PMAIP1 (engl. phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) und Bim (engl. BCL-2 interacting mediator of cell death) [Lomonosova & Chinnadurai, 2008].

Es wurden bereits einige wichtige Mechanismen der Modulierung durch Bcl-2-Proteine beschrieben. Ist eine Zelle geschädigt, z.B. durch Schäden an der DNA, kann das Tumorsuppressorprotein p53 die Transkription von Noxa oder Puma induzieren. Das erhöhte Proteinlevel der BH3-only-Proteine resultiert in der Aktivierung von Bax und Bak und setzt so die mitochondriale Apoptose in Gang [Youle & Strasser, 2008].

Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 können Bax und Bak hemmen [Wang & Youle, 2012; Youle & Strasser, 2008]. Sie können an die BH3-Domäne dieser proapoptotischen Proteine binden und diese dadurch neutralisieren. Dadurch wird deren Oligomerisierung und Aktivierung sowie die Initiation von MOMP verhindert [Rudner et al., 2011]. Durch direkte Bindung der BH3-only-Proteine an die antiapoptotischen Proteine kann deren Hemmung von Bax und Bak aufgehoben werden [Wensveen et al., 2011; Yuan et al., 2011; Chen et al., 2005]. Eine weitere Theorie beschreibt eine direkte Aktivierung von Bax und Bak durch die BH3-only-Proteine Bim und tBid [Youle & Strasser, 2008; Kim et al., 2006]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Regulierung der intrinsischen Apoptose durch Bcl-2-Proteine.



**Abbildung 2: Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die intrinsische Apoptose.**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der intrinsischen Apoptose und deren Regulierung durch Bcl-2-Proteine. Gezeigt ist der figurative Aufbau einer Zelle (grauer Kreis) mit der für die intrinsische Apoptose zentrale Zellorganelle des Mitochondriums (grüne Figur). Gezeigt wird die Interaktion der Bcl-2-Proteine und Caspasen während der intrinsischen Apoptose, wobei die schwarzen Pfeile die Aktivierung eines Proteins durch das vorangehende anzeigen und die roten Pfeile eine Inhibierung.

Durch einen Trigger wie oxidativen Stress oder DNA-Schäden kommt es zur Aktivierung der BH3-only Proteine, welche die proapoptotischen Bax und Bak aktivieren. Dadurch kommt es zur Cytochrom c-Freisetzung aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Dieser Vorgang wird durch die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie verhindert. Diese Hemmung wiederum kann durch eine Interaktion mit den BH3-only-Proteinen abgeschwächt werden. Ist Cytochrom c in das Zytoplasma freigegeben, setzt es die Caspasekaskade in Gang, indem es die Bindung von Procaspase-9 an Apaf-1 vermittelt und so diese Initiatorcaspase aktiviert. Die aktive Caspase-9 wiederum aktiviert dann die Effektorcaspasen-3 und -7, welche den Tod der Zelle unwiderruflich in Gang setzen [nach Youle & Strasser, 2008].

Diese strenge Regulierung erklärt, warum eine Störung des Gleichgewichts der Bcl-2-Proteine bei der Apoptoseregulation zu einer Apoptoseresistenz in Tumoren führen kann. Der Zusammenhang zwischen einer Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen und einer Therapieresistenz wurde im Rahmen vieler Studien untersucht. Eine Überexpression von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 kann zu Therapieresistenz, im Besonderen zu Radioresistenz führen [Streffer et al., 2002; Anai et al., 2007; Nguyen et al., 2007]. Deshalb sind die Vorgänge, die zu erhöhten Proteinmengen solcher Bcl-2-Proteine

führen, ein wichtiger Forschungsschwerpunkt in der Radioonkologie. Eine mögliche Ursache für hohe Proteinlevel ist nicht nur eine gesteigerte Transkription und Translation, sondern auch ein verminderter Abbau des Proteins. Die Funktion der Bcl-2-Proteine wird auch nach deren Bildung streng überwacht und reguliert. Dies erfolgt durch die im Folgenden beschriebenen Mechanismen.

### **1.3.8 Die Regulierung der Bcl-2-Proteine**

Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie werden auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene durch Proteinmodifikation reguliert [Huber et al., 2011; Deng et al., 2004]. Diese Modifizierung kann unter anderem das Spalten der Proteine in bestimmten Sequenzen, die Phosphorylierung oder das Anhängen von anderen Polypeptiden betreffen. Da sich diese Arbeit auf das antiapoptotische Mcl-1 konzentriert, werden im Folgenden dessen spezifische Regulationsmechanismen vorgestellt.

### **1.4 Das antiapoptotische Bcl-2-Protein Mcl-1**

Mcl-1 ist ein aus 350 Aminosäuren bestehendes, etwa 37 kDa großes, antiapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie. Es setzt sich aus den BH-Domänen 1-3 zusammen und wurde ursprünglich 1993 in differenzierenden Myeloidzellen entdeckt [Kozopas et al., 1993]. Mit einer Transmembrandomäne am C-Terminus kann es sich unter anderem in die äußere Mitochondrienmembran integrieren [Yang et al., 1995]. Es erniedrigt in vielen Tumorentitäten die Apoptoseneigung [Akagi et al., 2013].

Analog zu den anderen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen verhindert Mcl-1 die Cytochrom c-Freisetzung aus dem Mitochondrium und somit die Aktivierung der Caspasekaskade [Wang & Studzinski, 1997]. Neben Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> stellt auch Mcl-1 in vielen Tumoren einen wichtigen Schutzmechanismus gegen Therapien dar und ist die Ursache für Chemo- und Radioresistenzen. Malignome, deren Mcl-1-Menge erhöht ist, sind resistent auf die Behandlung mit BH3-Mimetika wie ABT-263 und ABT-737, welche die Sequestrierung der proapoptotischen Bcl-2-Proteine durch die antiapoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w, nicht aber Mcl-1, verhindern [Albershardt et al., 2011; Boiani et al., 2013]. Aufgrund dessen ist die Forschung an den

Proteinen, die Mcl-1 stabilisieren oder mit ihm interagieren, von äußerster Wichtigkeit. Durch Kombinationstherapien könnte die Apoptose in jenen Tumoren erhöht werden, deren Resistenz nicht nur von Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> sondern auch von Mcl-1 abhängig sind.

#### **1.4.1 Die Regulierung von Mcl-1**

Mcl-1 unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie vor allem durch seine kurze Halbwertszeit. Die Regulierung der Mcl-1-Proteinlevels geschieht auf verschiedenen Ebenen. Die Expression von Mcl-1 wird zum einen auf Ebene der Transkription und Translation reguliert [Mott et al., 2007; Subramaniam et al., 2008]. Für den schnellen Umsatz von Mcl-1 andererseits spielt aber vor allem die post-translationale Regulation eine entscheidende Rolle. Zu dieser zählt unter anderem die Phosphorylierung, die die Degradierung von Mcl-1 beschleunigt. Die Phosphorylierung an Serin 159 durch die Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) markiert Mcl-1 für den proteasomalen Abbau [Maurer et al., 2006]. Die post-translationale Phosphorylierung von Mcl-1 kann aber auch gegenteilige Auswirkungen haben: Domina et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Mcl-1 in der PEST-Region an Threonin 163 durch die Kinasen ERK-1/-2 (engl. extracellular regulated kinases-1/-2) den schnellen Umsatz von Mcl-1 verzögert und so zu dessen Stabilisierung führt [Domina et al., 2004].

Die Interaktion mit den BH3-only-Proteinen kann zu einer Hemmung der Mcl-1-Funktion führen. Noxa interagiert spezifisch mit Mcl-1, nicht aber mit Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>, und hebt dessen Bindung an Bak und Bax auf, wodurch es zu der Oligomerisierung dieser proapoptotischen Proteine und der Fortführung der intrinsischen Apoptose kommt [Kim et al., 2006; Gomez-Bougie et al., 2011]. Puma kann ebenso wie Noxa Mcl-1 inhibieren, kann aber zudem zur Herunterregulierung von Mcl-1 und somit zu einer Chemosensitivierung führen [Yuan et al., 2011].

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist der Abbau von Mcl-1, welcher durch proteasomale Degradierung erfolgt. An Mcl-1 muss dazu eine Polyubiquitinkette angehängt werden, um so das antiapoptotische Protein für den Abbau zu markieren. Polyubiquitiniertes Mcl-1 wird dann durch das Proteasom erkannt und degradiert. Die Polyubiquitinierung ist reversibel und wird im nachstehenden Absatz genauer erklärt.

### 1.4.2 Die Ubiquitinierung von Mcl-1

Eine wichtige Regulationsebene bildet der Abbau von Mcl-1 durch die proteasomale Degradierung nach Ubiquitinierung. Das 76 Aminosäuren umfassende Protein Ubiquitin kann an die Proteine kovalent binden und sie so destabilisieren und für die proteasomale Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) markieren [Hershko et al., 1980; Ciechanover et al., 1980]. Das UPS setzt sich zusammen aus Enzymen, die Ubiquitine an die Proteine heften, den sogenannten Ubiquitinligasen, aus weiteren Enzymen, die diese Bindung wieder auflösen können, den sogenannten Deubiquitinasen (DUBs), sowie aus dem Proteasom, das die markierten Proteine degradiert [Vucic et al., 2011].

In den Vorgang der Ubiquitinierung sind drei Enzymgruppen involviert: E1- (engl. ubiquitin-activating-enzymes), E2- (engl. ubiquitin-conjugating-enzymes) und E3-Enzyme (engl. ubiquitin-ligases), die je einen der drei Schritte der Ubiquitinierung katalysieren. Es sind momentan zwei E1-, zehn E2- und mehrere hundert E3-Enzyme bekannt, welche spezifisch für bestimmte Proteine sind. Die fünf E3-Ligasen, die Mcl-1 ubiquitinieren können, sind MULE (engl. Mcl-1 ubiquitin ligase E3), SCF<sup>β-TrCP</sup> (engl. β-transducin repeat-containing-protein) und SCF<sup>FBW7</sup>, APC/C<sup>Cdc20</sup> und Trim17 [Ding et al., 2007; Inuzuka et al., 2011; Mojsa et al., 2014]. MULE enthält eine BH3-Domäne, durch welche es mit Mcl-1 interagiert. Die Hemmung von MULE stabilisiert Mcl-1 und schwächt die durch DNA-Schäden verursachte Apoptose [Zhong et al., 2005]. Die Bindung von MULE an Mcl-1 kann durch die BH3-only-Proteine beeinflusst werden [Zhong et al., 2005]. Die Ubiquitinierung von Mcl-1 durch SCF<sup>β-TrCP</sup> und SCF<sup>FBW7</sup> wird durch vorangehende Phosphorylierung des antiapoptotischen Proteins durch GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) reguliert. FBW7, ein Teil des SCF<sup>FBW7</sup>-Ubiquitinligase-Komplexes, ist ein gut charakterisierter Tumorsuppressor, der in vielen verschiedenen Tumoren fehlt. Ein Verlust an FBW7 führt zu einer Mcl-1-Akkumulation und so zu Therapieresistenz [Mojsa et al., 2014].

Wie bereits zuvor erwähnt, handelt es sich bei der Ubiquitinierung um einen reversiblen Vorgang. Es sind etwa einhundert Deubiquitinasen (DUBs) bekannt, die die angehängten Ubiquitinreste von den Substraten wieder entfernen können [Wilkinson, 1997]. Die verschiedenen Deubiquitinasen regulieren unterschiedliche Zellfunktionen.

Die Deubiquitinase USP9X (engl. ubiquitin specific peptidase 9 X-linked) erhöht das Zellüberleben, indem es antiapoptotische Proteine deubiquitiniert und so vor Abbau schützt [Sacco et al., 2010]. Es wurde gezeigt, dass Mcl-1 durch USP9X stabilisiert wird und es somit zu Therapieresistenz und einer schlechteren Prognose kommen kann [Schwickart et al., 2010; Trivigno et al., 2012].

Das Zusammenspiel von Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen, die die proteasomale Degradierung von Mcl-1 steuern, gerät zunehmend in den Fokus der Forschung. Die Regulierung des Mcl-1-Levels via proteasomalen Abbau könnte von therapeutischer Relevanz in der Tumorthherapie sein. Die Arbeitsgruppe um Gomez-Bougie konnte 2011 zeigen, dass Noxa nicht nur die Ubiquitinierung von Mcl-1 über die Ubiquitinligase MULE fördert sondern auch die Deubiquitinierung durch USP9X hemmen kann. Nach der Überexpression von Noxa wurde eine verminderte USP9X/Mcl-1-Interaktion gesehen, was mit einer vermehrten Menge an Mcl-1 in der ubiquitinierten Form einherging und somit mit vermehrtem proteasomalen Abbau von Mcl-1 [Gomez-Bougie et al., 2011; Mojsa et al., 2014]. Die Arbeitsgruppe Schwickart et al. konnte zeigen, dass das USP9X-Proteinlevel mit erhöhten Mcl-1-Mengen in humanen folliculären Lymphomen und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen korreliert [Schwickart et al., 2010]. Weiter wurden auch in verschiedenen soliden Tumoren so wie in duktalem Adenokarzinomen, kleinzelligen Lungentumoren und Kolonadenokarzinomen sowohl erhöhte USP9X- wie auch Mcl-1-Mengen gefunden. Auch assoziieren hohe USP9X-mRNA-Werten mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit multiplem Myelom [Schwickart et al., 2010]. Schwickart et al. konnten außerdem nachweisen, dass eine Herunterregulierung von USP9X durch siRNA zu erniedrigten MCL-1-Proteinmengen in HEK293T-, HeLa- und HCT116-Zellen führte, nicht jedoch zu erniedrigten Mcl-1-mRNA-Mengen, was die These der posttranslationalen Regulierung stützt [Schwickart et al., 2010]. Die Herunterregulierung führte in den HeLa-Zellen auch zu einer verkürzten Halbwertszeit von Mcl-1 sowie zu einem erhöhten Anteil von ubiquitiniertem Mcl-1. Schwickart et al. beschreiben, dass die Polyubiquitinketten an der Lys-48-Stelle von Mcl-1 durch USP9X entfernt werden [Schwickart et al., 2010].

Die Gruppe Trivigno et al. der Experimentellen Radioonkologie Tübingen haben gezeigt, dass erhöhtes Mcl-1 in Jurkat-Lymphom-Zellen zu Radioresistenz führt

[Trivigno et al., 2012]. Sie konnten auch zeigen, dass USP9X durch ionisierende Strahlung aktiviert wurde und aktiviertes USP9X in radioresistenten Jurkat-Zellen die schnelle Abnahme der Mcl-1-Proteinmenge verhindert hat. Nach Herunterregulierung von USP9X wurde bei unbestrahlten Zellen kein Effekt auf die Mcl-1-Menge beobachtet, nach Bestrahlung konnte aber eine erhöhte Apoptoserate sowie eine schnellere Abnahme von Mcl-1 gesehen werden [Trivigno et al., 2012].

## **1.5 Fragestellung**

Die Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung ist ein bedeutender Regulierungsmechanismus des Mcl-1-Levels. Die Deubiquitinase USP9X kann das Mcl-1-Protein stabilisieren und dadurch eine Apoptoseresistenz vermitteln. Eventuell ist sie für eine Therapieresistenz in Tumoren verantwortlich. Bisher wurden diese Zusammenhänge vor allem in hämatologischen Malignomen untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob auch in soliden Tumoren, hier dem Prostatakarzinom, Apoptoseresistenz und Therapieresistenz auf erhöhten Mcl-1-Werten basiert, und ob diesen erhöhten Werten eine Stabilisierung durch USP9X zugrunde liegt. Da eine der wichtigsten therapeutischen Maßnahmen beim Prostatakarzinom die Behandlung mit ionisierender Strahlung ist, soll hier die Sensitivität von Prostatakarzinomzellen auf Bestrahlung in Abhängigkeit von Mcl-1 und USP9X untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Nalgene <sup>®</sup> Mr. Frosty zur Cryoconservierung von Zellen	Nalgene <sup>®</sup> Labware
Anthos <sup>®</sup> 2010 Microplate Reader	Anthos <sup>®</sup> Labtec Instruments GmbH
Zellinkubator	Heraeus- Kendro <sup>®</sup> / HERAcell <sup>®</sup> 240
Bestrahlungsgerät	Siemens/ Linearbeschleuniger LINAC <sup>®</sup> G
FACSCalibur <sup>™</sup> Durchflusszytometer	Becton Dickinson <sup>®</sup>
Filmentwickler	Agfa Curix AC002
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Mikroskop	Hund Wetzlar/ Wilovert S
pH-Meter Seven Compact	Mettler /Toledo

Pipetboy	Integra Biosciences/ Pipetboy acu/ Pipetboy comfort
Pipette	Eppendorf/ Research Pipette
SDS-Gelelektrophoresekammer	Bio Rad
Spannungsgenerator	Bio- Rad/ PowerPac 300, Biometra/ Standard Powerpack P25
Sterile Werkbank	Labotect/ SterilGARD III, Modell SG 403DIN
Thermoschüttler	Eppendorf/ Thermomixer compact
Transferkammer	Trans- Blot ® Electrophoretic Transfer Cell
Waage	Kern/ Präzisionswaage
Wasserbad	Thermo Scientific/ Haake DC10-P21
Wipptisch	Biometra/ Mini- Taumel- Wipptisch WT17/ Rocky 3D
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf/ Centrifuge 5417R, Centrifuge 5804R</li> <li>• Hettich/ Rotanda RPC Laborzentrifuge</li> <li>• Sorvall® SUPER T21, Rotor SL- 50T</li> </ul>

Scanner	HP ScanJet 4c/T
Autoclav	
Kühlschrank	
Gewebshomogenisator	Ultra-Turrax

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalie	Hersteller
β- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiporese Gel 30	Roth
Ammoniumperoxidsulfat	Roth
Aprotinin	Roth
Bromphenolblau	Merck
DMSO (Dimethyl Sulphoxide)	Sigma-Aldrich®
ECL Western- Blotting detection reagents	GE Healthcare UK Limited
EDTA (Ethylenediaminetetraactic acid)	Sigma-Aldrich®
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich®
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
HCl (Salzsäure)	Merck
HEPES Buffer Solution	PAA
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck
Leupeptin	Sigma-Aldrich®
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Di- Natriumhydrogenphosphat)	Merck

Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)	Merck
NaCl (Natriumchlorid)	VWR Prolabo <sup>®</sup>
NaF (Natriumfluorid)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Pepstatin A	Roth
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Page Ruler Prestained Proteinmarker für SDS-Page	Fermentas
Spectra Proteinmarker für SDS-Page	Fermentas
PMSF (Phenyl-methylsulfonyl-fluorid)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Ponceau- S- Lösung	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
NaPP (Natriumpyrophosphat)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Protein Farbkonzentrat)	Biorad
Rotiphorese <sup>®</sup> 10x SDS-Page Laufpuffer	Roth
TEMED (Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
TMRE (Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat)	Mobitech
Trizma Base	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Tris HCl	Roth
TritonX-100	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Tween20	Roth
NaCl (Natriumchlorid)	Applichem
2-Propanol (Isopropanol)	AnalaR NORMAPUR
Ethanol	Merck
DTT (DL-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Milchpulver	Roth

Trans-IT TKO Lipofektamin	Mirus
Trans-IT siQuest Lipofektamin	Mirus
ECL Anti-mouse IgG	GE Healthcare UK Limited
ECL Anti-rabbit IgG	GE Healthcare UK Limited
5x siRNA Buffer	Thermo scientific
Trypsin-EDTA	PAA
CHX (Cycloheximid)	Sigma-Aldrich®
PBS-Tabletten	Invitrogen®

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
CryoPure Röhrchen zur Cryokonservierung der Zellen	Sarstedt
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml	Sarstedt
Mikrozentrifugenröhrchen 0,2 ml, RNase free	Sarstedt
Round Bottom Tubes für FACS-Analyse	BD-Falcon
Zellkulturschale 100x20 mm	Sarstedt
Zellschaber	Costar
Stangenpipetten: 1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Costar
Pipettenspitzen	Eppendorf
FACS- Röhrchen	Sarstedt
Filterpapier Whatman	Roth
Kopierfolien	Impega
Neubauer Einwegzählkammer	Biochrom
PVDF- Membran	Roth
Entwicklerfilm für WB	GE Healthcare
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175	Sarstedt

cm <sup>2</sup>	
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Sarstedt

## 2.1.4 Medien, Lösungen und Puffer

**Tabelle 4: Zellkulturmedien**

Medium	Firma
Zellkulturmedium für Kurz- und Langzeitkulturen, RPMI 1640 [L-] Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Zellkulturmedium für Kurz- und Langzeitkulturen, RPMI 1640 [L-] Glutamin ohne Phenolrot	PAA Laboratories GmbH
+ 10 % FCS (Fetal bovine serum)	Biochrom AG

**Tabelle 5: Lösungen und Puffer**

Lösungen	Chemikalien	Endkonzentration/ Volumen/ Masse
4x Sample Buffer (gelöst in Aqua dest.)	Tris-HCl	200 nM
	SDS	8 %
	Bromphenolblau	0,2 %
	Glycerol	40 %
APS (Ammoniueroxidsulfat) (gelöst in Aqua dest.)	APS	438 mM
Blocking-Puffer	Milchpulver TBS- Tween	5 %
Lysepuffer (gelöst in Aqua dest.)	HEPES	50 mM
	NaCl	150 mM
	NaPP	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaF	10 mM

	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Aprotinin Leupeptin Pepstatin A PMSF TritonX-100	2 mM 5 µg/ml 5 µg/ml 3 µg/ml 1 mM 1 %
Nicoletti- Färbelösung	Na- Citrat Triton X-100 Propidiumiodid	0,1 % in PBS 0,1 % 5 µg/ml
PBS (PBS-Tabletten von Invitrogen®) gelöst in Aqua dest.	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	140 mM 2,68 mM 10 mM
Sammelgelpuffer (Puffer zur Gelherstellung für WB)	Trizma Base SDS (10%) pH 6,80	6,06 g/ 100 ml 4 ml/100 ml Einstellung mit 32 % HCl
TBS- Tween (gelöst in Aqua dest.)	Tris HCl NaCl Tween20 pH 8,0	1,57 g/l (10 mM) 8,76 g/l (150 mM) 1 ml/l Einstellung mit 5 M NaOH
Transferpuffer für Westernblot	Trizma Base Glycin Methanol Aqua dest	3,03 g/l 14,40 g/l 200 ml/l 800 ml/l
Trennpuffer(Puffer zur Gelherstellung für WB)	Trizma Base SDS (10%) pH 8,80	18,17/ 100 ml 4ml/100ml Einstellung mit 32 % HCl

### 2.1.5 Antikörper

Alle Antikörper wurden je nach Verdünnung in 5% Milchpulver/ TBS-Tween gelöst.

**Tabelle 6: Antikörper zur Western Blot Analyse**

Antikörper	Klonalität	Quelle	Verdünnung	Firma
Bak	polyklonal	rabbit	1:1.000	Upstate (Millipore)
Bax	polyklonal	rabbit	1:1.000	Cell signalling
Bcl-x <sub>L</sub>	polyklonal	rabbit	1:1.000	Cell signaling
Bcl-2	monoklonal	mouse	1:400	Santa Cruz Biotechnology
Bim	monoklonal	rabbit	1:500	Epitomics
Caspase-3	polyklonal	rabbit	1:1.000	Cell signalling
GAPDH	Amnion	mouse	1:20.000	ABCAM
Mcl-1	polyklonal	rabbit	1:1.000	Cell signalling
Mcl-1	monoklonal	rabbit	1:1.000	Cell signalling
Noxa	monoklonal	mouse	1:500	Calbiochem
PARP	polyklonal	rabbit	1:1.000	Cell signalling
Puma	monoklonal	rabbit	1:2.000	Epitomics
β-Aktin	monoklonal	mouse	1:30.000	Sigma
USP9X	polyklonal	rabbit	1:2.000	Novus Biologicals
β-Catenin	monoklonal	rabbit	1:1.000	Cell signalling
<b>Zweitanti- körper</b>				
ECL-Anti- mouse IgG		Horseradish	1:2.000	GE Healthcare
ECL-Anti- rabbit		Horseradish	1:2.000	GE Healthcare

### 2.1.6 Zelllinien

Die humane LNCaP-Zelllinie wurde 1977 etabliert aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines fünfzigjährigen Kaukasiers mit metastasiertem Prostata-Adenokarzinom. Die Zellen exprimieren Androgenrezeptoren und sind hormonsensitiv [Horoszewicz et al., 1983]. PC3-Zellen sind aus einer Knochenmetastase eines GradIV-Prostata-Adenokarzinoms eines 62-jährigen kaukasischen Mannes entnommene Zellen

[Kaighn et al., 1979]. Es sind androgen-Rezeptor-negative und androgenunabhängige Zellen [Umekita et al., 1996]. Bei den PC3-Zellen handelt es sich einer Studie von Tai et al. zufolge wahrscheinlich um eine besondere Form des Prostatatumors. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass es sich bei den PC3-Zellen wahrscheinlich um entartete neuroendokrine Zellen der Prostata handelt. Diese können nach einer Hormonentzugstherapie eines Adenokarzinoms der Prostata entstehen oder de novo. Es handelt sich bei der genannten Unterform der Prostatatumoren um eine hochmaligne aggressive Form [Tai et al., 2011].

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert mit RPMI1640 (+L-Glutamin) Kulturmedium und 10% FCS. Sie wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zelllinien wurden zwischen Passage 10 und 30 verwendet. Bei Erreichen von 80-90% Konfluenz wurden die Zellen verdünnt und neu ausgesät, um einen Wachstumsstopp aufgrund einer Kontaktinhibition zu verhindern. Zum Passagieren wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit sterilem PBS zwei Mal gewaschen und anschließend mit 2,5 ml Trypsin-EDTA 5 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die abgelösten Zellen mit 10 ml RPMI1640/10% FCS aufgenommen, um die Proteaseaktivität durch im Serum enthaltene Trypsininhibitoren zu beenden. Das Gemisch wurde nun bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 10 ml RPMI1640/10%FCS resuspendiert und in entsprechenden Verdünnungen in neue Zellkulturflaschen überführt. Die LNCaP-Zelllinie wurde im Verhältnis 1:10 gesplittet, die PC3-Zellen im Verhältnis 1:20.

### **2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien**

Im flüssigen Stickstoff ist es möglich, die Zellen über lange Zeit zu lagern. Um die Bildung von Kristallen während des Einfrierprozesses zu verhindern, wird DMSO zur Lösung hinzugefügt. Etwa  $1-2 \cdot 10^6$  Zellen pro Einfrierrohrchen wurden in 1,5 ml RPMI1640 mit 20% FCS und 10% DMSO zunächst über Nacht mithilfe des „Mr.Frosty“, einem Behältnis zur Kryokonservierung, bis zu -80 °C heruntergekühlt und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen zügig im Wasserbad bei 37 °C gewärmt, anschließend wurde das Zellpellet im Medium aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt um das toxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in RPMI1640 mit 10% FCS resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche überführt. Im Anschluss wurde 24 Stunden nach dem Auftauen das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert.

### **2.2.3 Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsiniert, im Medium gelöst und mit dem Farbstoff Trypanblau 1:2 verdünnt, um abgestorbene von lebenden Zellen zu unterscheiden. 10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die in den Quadranten gezählte Menge an Zellen wurde mit dem Faktor  $2 \cdot 10^4$  multipliziert, was der Zellzahl pro ml Suspension entsprach.

### **2.2.4 Bestrahlung der Zellen**

Die Zellen wurden mithilfe des Linearbeschleunigers Linac<sup>®</sup> der Firma Siemens bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Gesamtdosis betrug je nach Experiment zwischen 1 Gy und 10 Gy. Um bei den Versuchen einen Effekt der Temperaturunterschiede auszuschließen, wurden die nicht zu bestrahlenden Zellen zur gleichen Zeit aus dem Inkubator genommen.

### **2.2.5 Transfektion mit siRNA**

Mittels dieser Methode kann auf Translationsebene die Expression eines spezifischen Proteins unterdrückt werden. Die siRNA (engl. small interfering RNA) ist eine doppelsträngige RNA, die mit der mRNA, die das zu untersuchende Protein kodiert, in der Zelle interagiert. Durch die Interaktion mit der siRNA wird die mRNA schnell degradiert und die Translation des entsprechenden Proteins wird gehemmt. Der Transport der siRNA in die Zelle kann auf physikalische Weise (Elektroporation) oder durch chemische Substanzen (Lipofektion) herbeigeführt werden. Hier erfolgte die Transfektion der Zellen via Lipofektion mittels des Transfektionsreagenzes Trans-IT siQuest. Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät in einer Konzentration von etwa  $1 \cdot 10^6$  (LNCaP) bzw.  $3 \cdot 10^5$  (PC3) Zellen pro Well (3 ml). Nach 24 Stunden, bei etwa 80% Konfluenz, wurden 1,75 ml des Volumens pro Well entfernt. Im Anschluss wurden zunächst 250 µl phenolrotfreies, serumfreies RPMI1640, 4 µl siQuest und 37,5 µl 1M siRNA vermischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert zur Bildung von Komplexen der siRNA mit dem Transfektionsreagenz. Danach wurde dies tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit non targeting-siRNA transfiziert, welche ebenfalls in die Zellen eingeschleust wird, aber nicht auf die Expression eines Proteins wirken soll. Im Anschluss erfolgte die Inkubation im Brutschrank.

### **2.2.6 Koloniebildungstest**

Mit dem Koloniebildungstest wurde die Radiosensibilität der Zelllinien untersucht. Es wurde der Anteil der Zellen bestimmt, welche nach Behandlung in der Lage sind, eine Kolonie zu bilden (engl. survival fraction). Eine Kolonie ist dabei definiert als eine gruppierte Ansammlung von mindestens 50 Zellen. Bei der alleinigen Behandlung mit ionisierender Strahlung wurden die Zellen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 50-3200 Zellen/Well ausgesät. Zunächst wurden die Zellen 24 Stunden inkubiert. Bei zusätzlicher Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 3000 Zellen/Well (LNCaP) bzw. 1000 Zellen/Well (PC3) ausgesät und nach 24 Stunden, wie oben beschrieben, mit siRNA transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und die Bestrahlung.

Die Zellen wurden mit Dosen zwischen 1-8 Gy bestrahlt. Nach etwa zwei Wochen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Formaldehyd (3,75% in PBS) 10 min lang fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 10% Ethanol gewaschen und mit Kristallviolettlösung (0,1% in PBS) eine Stunde gefärbt. Danach wurden die 6-Well-Platten mit Wasser gewaschen und getrocknet, und die Kolonien wurden gezählt. Es wurde für jede Behandlung eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Das relative Überleben der bestrahlten Zellen im Verhältnis zum Überleben der nicht bestrahlten Zellen wurde wie folgt berechnet: Die PE (engl. plating efficiency) beschreibt die Koloniebildungsfähigkeit der unbestrahlten Zellen und wird berechnet durch den Quotient aus der Anzahl der gebildeten Kolonien (Mittelwert aus 6 Ansätzen) geteilt durch die Anzahl der ausgesäten Zellen.

Die SF (engl. survival fraction) bezeichnet die Überlebensfraktion, also das relative Überleben der behandelten Zellen im Verhältnis zum Überleben der nicht behandelten Zellen. Sie wird berechnet als Quotient aus der Anzahl der gebildeten Kolonien geteilt durch die Anzahl der ausgesäten Zellen bei bestrahlten Zellen geteilt durch die PE der nicht behandelten Zellen. Die Regressionskurve wurde mit Sigma Plot berechnet, einem Programm zur wissenschaftlichen Datenanalyse der Firma Systat Software Inc.

### **2.2.7 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Zellanalyse. Die Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung in hoher Geschwindigkeit perlschnurartig

aufgereiht und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. So entsteht das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. forward scatter), das direkt durch die Zelle durchgeht, nicht abgelenkt wird und ein Maß für das Volumen der Zelle ist sowie das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. side scatter), das die Ablenkung des Lichtes im rechten Winkel darstellt und ein Maß für die Granularität der Zelle ist. Weiterhin können die Zellen auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Durch den Laserstrahl in bestimmter Wellenlänge angeregt, emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe Licht mit etwas längerer Wellenlänge, das anhand der Intensität analysiert werden kann. Dank der hohen Geschwindigkeit des Durchflusses können in kurzer Zeit sehr viele Zellen anhand ihrer Größe und Granularität analysiert werden.

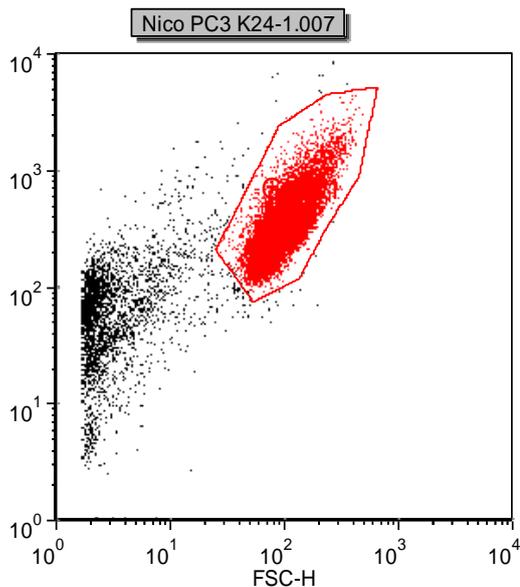
Der von uns verwendete Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert mit der DNA. Um zur intrazellulär gelegenen DNA zu gelangen, muss die Zellmembran durchlässig sein. Tote Zellen sind aufgrund ihrer fehlenden Membranintegrität nicht mehr im Stande, den Transport des Fluoreszenzfarbstoffes PI in die Zelle zu verhindern. Da PI die intakte Zellmembran nicht passieren kann, färbt es keine lebenden und frühapoptotischen Zellen, weshalb es zur Messung der Zellviabilität im Rahmen der PI-Ausschlussfärbung genutzt werden kann [Belloc et al., 1994]. Durch die Färbung mit PI kann der DNA-Gehalt jeder Zelle gemessen werden, wenn diese zuvor permeabilisiert wurden. Diese Färbung ermöglicht somit eine Zellzyklusanalyse und die Bestimmung der zellulären Fraktion mit fragmentierter DNA.

#### **2.2.7.1 Zellzyklusanalyse nach Nicolettimethode**

Der Physiker Ildo Nicoletti stellte 1991 ein nach ihm benanntes neues Messverfahren zur Bestimmung des DNA-Gehaltes vor, welches er 2006 optimierte [Nicoletti et al., 1991]. Das Prinzip beruht auf der Färbung mit Propidiumiodid und der zusätzlichen Gabe von Triton X-100, das die Zellmembran eukaryoter Zellen permeabilisiert. Durch das hinzugefügte Triton X-100 kann PI auch in apoptotische und gesunde Zellen mit intakter Membran gelangen und dort mit der DNA interkalieren. Die DNA wird während der Apoptose durch zelluläre Endonukleasen fragmentiert. Mit Hilfe der hier genutzten Methode lassen sich Zellen mit diploiden und hypoploiden Kernen auftrennen. Zur Bestimmung der hypoploiden Zellfraktion erfolgte eine Inkubation der Zellen mit einem Propidiumiodid und Triton X-100 enthaltenden isotonen Puffer (PBS, 0,1% Natriumcirtat, 0,1% Triton X-100 und 10µg/ml PI) für 30 min bei

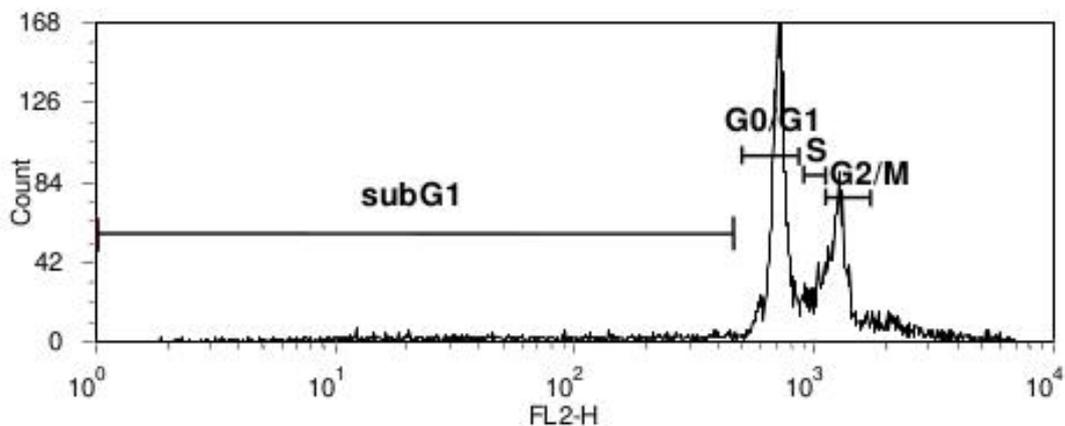
Raumtemperatur. Hernach wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden im FACS mit monochromatischem Laserlicht angeregt und die Emissionen im Bereich größerer Wellenlängen im Filter FL-2 oder FL-3 (roter Bereich) detektiert. Außerdem wurde das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht analysiert. Um Zellen von Zellschrott zu unterscheiden, wurden die gemessenen Werte im ersten Schritt der Zellanalyse im Durchflusszytometer nach Größe und Granularität aufgetrennt und die identifizierte Zellpopulation für die weitere Auswertung gated (siehe Abbildung 3). In der Folge wurden die Messwerte in einem Dotplot anhand ihrer Größe (FSC) und Intensität des reflektierten Lichtes (FL-2) aufgetrennt [Fernald & Kurokawa, 2013]. Die Messpunkte ließen sich auch nach der Intensität von  $10^0$  bis  $10^4$  und nach Häufigkeit in einem Histogramm darstellen, das eine Übersicht über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus darstellt (siehe Abbildung 4). Dieses zeigte zwei Peaks, Zellen in der G1-Phase (einfacher Chromosomensatz) und G2-Phase (zweifacher Chromosomensatz). Die Messpunkte mit FL2-Werten unterhalb des G1-Peaks wurden als subG1 bezeichnet und stellten hypoploide Zellen dar, die einen geringeren DNA-Gehalt als den einfachen Chromosomensatz im Kern haben. Apoptotische Zellen sind hypoploid, da die bei der Apoptose entstandenen DNA-Fragmente von den apoptotischen Zellen verloren werden. Eine repräsentative Auftrennung der Zellen nach Zellzyklen zeigt Abbildung 4.

Zur Messung der Zelllinien LNCaP und PC3 wurden die Zellen mit 1 ml CDP abgelöst und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 200-400 µl Nicoletti-Färbelösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden die gefärbten Zellen mit dem FACSCalibur™ Durchflusszytometer gemessen.



**Abbildung 3: Durchflusszytometrie mittels FACScan am Beispiel der PC3-Zellen**

Die Abbildung stellt einen sogenannten Dotplot dar. Die Messpunkte werden logarithmisch nach Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC-H) sowie nach Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-H) aufgetrennt. Die Auswahl der Zellpopulation erfolgt mittels eines „Gate“, hier zu sehen an den eingegrenzten roten Messpunkten. Der Zellschrott ist links bei niedrigeren FSC-Werten zu sehen.



**Abbildung 4: Auftrennung der Zellen nach PI-Aufnahme am Beispiel der PC3-Zellen**

PC3-Zellen wurden mit PI nach Nicoletti gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Messpunkte wurden nach der Intensität des emittierten Lichts (FL-2-H) und Zellzahl im Histogramm aufgetragen. Dadurch erfolgte eine Auftrennung der Zellen nach Zellphasen. Die dabei entstandenen Höchstwerte zeigen die Zellzyklusphasen G1 und G2/M. Die Zellen unterhalb des G1-Peaks (subG1-Fraktion) kennzeichnen die apoptotischen Zellen.

### 2.2.7.2 Messung des mitochondrialen Potentials mittels TMRE

Während der Apoptose kommt es unter anderem auch zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ). Dies kann mittels Färbung mit TMRE

(Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat) gemessen werden. Es handelt sich dabei um einen Farbstoff, der in Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential im Mitochondrium akkumuliert und nur wenn dieses zusammenbricht, aus dem Mitochondrium austritt [Perry et al., 2005].

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 h wurden sie mit 10 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 - 72 Stunden erfolgte die Ablösung der Zellen aus den Platten und die Zentrifugation. Der Überstand wurde entfernt und zum verbleibenden Zellpellet 200 µl TMRE- Färbelösung zugegeben (Endkonzentration 25 nM in PBS). Es folgte die Inkubation bei 37 °C für 30 min und im Anschluss die Messung der Fluoreszenzintensität der Zellen mit dem FACSCalibur™ Durchflusszytometer im Kanal FL-2. Hoher TMRE-Gehalt und somit Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential zeigten sich bei hoher FL-2-Fluoreszenzintensität. Diese wurde in Abhängigkeit des SSC in einem Dotplot aufgetragen. Die Population mit geringer FL2-Intensität stellten Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential dar.

### **2.2.8 Western Blot**

Der Western Blot dient der Analyse von Zellproteinen. Die Proteine wurden aus den Zellen extrahiert und denaturiert. Daraufhin wurden sie reduziert mittels Dithiothreitol (DTT) und mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das darauf folgende Übertragen der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran stellt das eigentliche „Blotting“ dar. Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgt dann mittels einer antikörperabhängigen Reaktion und dem Umsatz von Chemilumineszenz-Reagenzien. Dieser Umsatz wird mittels lichtempfindlicher Filme aufgenommen.

#### **2.2.8.1 Lysierung von Zellen**

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen abgelöst, mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und zentrifugiert. Das PBS wurde anschließend entfernt und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Dies ermöglichte das Sammeln einzelner Zellproben von unterschiedlichen Tagen. Die Zelllyse wurde dann an einem Tag durchgeführt. Hierfür wurde das Zellpellet mit 200 – 400 µl eiskaltem Lysepuffer für 30 min auf Eis lysiert. Mit Hilfe des Lysepuffers wurden die Zellmembranen permeabilisiert und die Proteine extrahiert. Die Zellen wurden in 1,5

ml-Reaktionsgefäße überführt, 30 min auf Eis gelagert und bei 13.000 rpm 15 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt.

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Biorad-Farbkonzentrat. Dazu wurden in einer 96-Well-Platte 1 µl des Lysats in 200 µl des mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnten Proteinfarbstoffkonzentrats gegeben. Ebenfalls wurde auf dieselbe Platte eine Standardverdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) pipettiert. Durch das vorhandene Protein kam es zu einem Farbumschlag des Farbkonzentrates. Dieser Umschlag war proportional zur vorhandenen Proteinmenge und wurde photometrisch mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Anhand der Extinktionswerte und der angefertigten BSA-Eichgeraden wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben errechnet. Die Punkte auf der Eichgeraden ergaben einen linearen Verlauf. Durch den linearen Bereich konnte eine Regressionsgerade gelegt werden. Mit Hilfe der zugehörigen Geradengleichung konnte die Proteinkonzentration der Proben in den einzelnen Wells bestimmt werden. Der Proteingehalt der Proben konnte aus der Eichgeraden bestimmt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte stets dreifach, wodurch ein Mittelwert bestimmt wurde.

Durch eine Verdünnung jeder Probe mit Probepuffer und Lysepuffer wurden die Proben auf eine gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Das im Probepuffer (SB, engl. sample buffer) enthaltene Bromphenolblau färbte das Lysat blau, sodass die Lauffront bei der Gelelektrophorese sichtbar blieb. Das ebenfalls enthaltene SDS wirkte die Aufladung aller Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Spaltung von Disulfidbrücken erfolgte durch DTT zur Aufbrechung der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Um die denaturierende Wirkung zu verstärken, wurde das Lysat 10 min schüttelnd auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.8.2 Lyse von Gewebeproben**

Die Gewebeproben wurden mit dem Einverständnis der Patienten in Zusammenarbeit mit der urologischen Klinik entnommen (Ethikvotum Nr. 517/2012BO2). Die Lyse von Gewebeproben wurde ähnlich dem oben beschriebenen Vorgang durchgeführt. Die Arbeiten erfolgten auf Eis. Die Proben wurden mit einem Skalpell in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Probe wurde dann ca.

300 µl Lysepuffer gegeben. Das Gemisch wurde mit einem „Ultra-Turrax“ Gewebehomogenisator zerkleinert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Ermittlung der Proteinkonzentration und die Einstellung der Proben auf gleiche Proteinkonzentrationen wie im vorherigen Kapitel beschrieben mittels Biorad-Farbkonzentrat und Probepuffer (SB). Aufbewahrt wurden die Lysate bei -20 °C.

### **2.2.8.3 SDS-Gelelektrophorese**

Das Auftrennen der in den Lysaten enthaltenen Proteine erfolgte mittels einer SDS-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacryl-Gelelektrophorese). Das verwendete Gel wurde nach dem im Materialteil aufgelisteten Schema zwischen zwei Glasplatten gegossen. Es variierte in der Acrylamidkonzentration von 7% bis 14%, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine. Zur Elektrophorese wurden die Glasplatten mit dem enthaltenen Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und die Proben zusammen mit einem Marker in die Geltaschen pipettiert. Anhand der farblichen Auftrennung des Markers konnten die Größen der Proteine eingeschätzt werden. Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer (das Konzentrat wurde 1:10 in Aqua dest. verdünnt) gefüllt, sodass die Ober- und Unterseite des Gels von Laufpuffer umgeben waren. Die Kammer wurde an einen Stromkreislauf angeschlossen. Dabei wanderten die Proteine zunächst bei einer Spannung von 60 V bzw. 160 V nach Übergang der Proben in das Trenngel in Richtung der Anode und trennten sich gemäß ihrem Molekulargewicht im Trenngel auf.

### **2.2.8.4 Blotting**

Die Gele wurden nach etwa drei Stunden aus der Kammer entfernt und in eine Transferkassette zwischen in Transferpuffer getränkte Schwämme und Papier gelegt. Direkt neben das Gel wurde eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran eingebracht. Die Proteine wurden anschließend in einer Blotting-Apparatur bei 700 mA 90 – 150 min auf die Membran transferiert. Nachfolgend wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um einen gleichmäßigen Transfer zu verifizieren. Eine Besetzung der noch freien Membranstellen mit Milchproteinen wurde durch eine 45 minütige Inkubation mit 5% Milchpulver in TBS-Tween erreicht.

#### **2.2.8.5 Immunologische Markierung spezifischer Proteine**

Die Membran wurde mit dem spezifischen Erstantikörper in der jeweiligen Verdünnung, die unter 2.1.5 aufgelistet ist, in 5% Milchpulver mit TBS-Tween über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag mehrfach mit TBS-Tween gewaschen und danach für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper (1:2.000 verdünnt in TBS-Tween/5% Milchpulver), an dem die Meerrettichperoxidase (HRP für horse radish peroxidase) gekoppelt ist, inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder mehrfach mit TBS-Tween gewaschen.

Die Detektion der Antikörperreaktion erfolgte mittels eines ECL-Substrates, welches von der Meerrettichperoxidase umgesetzt wird. Dies ruft eine chemilumineszente Reaktion hervor. Die Membran wurde mit dem ECL-Substrat inkubiert und danach luftdicht in einem Entwicklerkasten fixiert. In der Dunkelkammer erfolgte daraufhin eine rasche Exposition von lichtempfindlichen Filmen für unterschiedliche Dauer je nach Stärke des Signals. Die Dauer der Exposition richtete sich dabei nach der vorhandenen Menge des angefärbten Proteins und variierte zwischen einigen Sekunden bis hin zu mehreren Stunden. Die Filme wurden entwickelt und eingescannt. Die abgebildeten Banden wurden mittels ImageJ analysiert, einem Programm, das die Intensität der Banden densitometrisch auswertet. Anschließend wurde die relative Schwärzung der Banden in prozentuale Werte mithilfe von Excel umgerechnet.

#### **2.2.10 Auswertung**

Die gezeigten Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt. Die im Ergebnisteil präsentierten Daten zeigen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Bei den gezeigten Western-Blots handelt es sich um repräsentative Ergebnisse. Die Schwärzung der Banden wurde mittels ImageJ gemessen, einem Programm zur quantitativen Intensitätsmessung der dunklen Farbmenge pro Fläche. Zur Erstellung der Regressionskurven der Koloniebildungstests wurde SigmaPlot verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mittels des zweiseitigen ANOVA-Tests in der Software GraphPad.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bcl-2-Proteinlevel in Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zur Lymphomzelllinie Jurkat

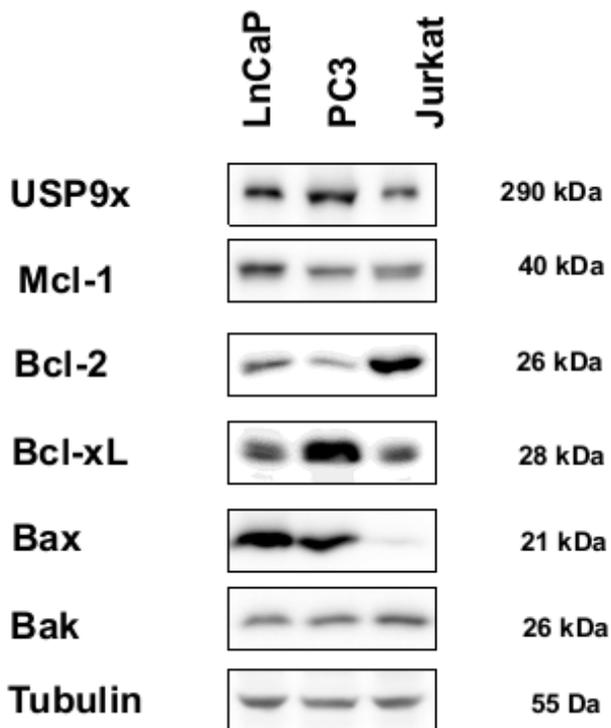
In der Studie von Trivigno et al. wurde gezeigt, dass die Hemmung des antiapoptotischen Mcl-1 durch eine verminderte Stabilisierung durch USP9X in der Lymphomzelllinie Jurkat zu einer Radiosensitivierung führt. Die Arbeitsgruppe verglich zwei Jurkatzelllinien, die unterschiedliche Empfindlichkeiten auf die Behandlung mit ionisierender Strahlung zeigten. In beiden Zelllinien wurde Mcl-1 nachgewiesen, jedoch zeigte die Proteinmenge in den strahlensensitiven Zellen nach Bestrahlung einen deutlichen Rückgang. Das Mcl-1-Level in den strahlenresistenten Zellen war dagegen nach Bestrahlung stabil. Das Proteinlevel der anderen antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, sowie des proapoptotischen Bak zeigte keine Veränderung nach Bestrahlung in Jurkat-Zellen. Die Gruppe konnte ebenso zeigen, dass die Deubiquitinase USP9X eine stabilisierende Wirkung auf das Mcl-1-Proteinlevel nach Bestrahlung hat und somit zur Strahlenresistenz der Zellen führt [Trivigno et al., 2012].

Aufbauend darauf sollten die Beobachtungen auch bei Prostatakarzinomen untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Proteinniveaus der Bcl-2-Proteine in Prostatakarzinomzelllinien mit denen in Jurkat-Zellen verglichen. Es sollte zunächst überprüft werden, ob die Prostatakarzinomzelllinien die Bcl-2-Mitglieder Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bak und Bax sowie die Deubiquitinase USP9X exprimieren. Dies erfolgte mittels einer Western-Blot-Analyse, bei der die genannten Proteine bei allen drei Zelllinien mithilfe spezifischer Antikörper detektiert wurden.

Abbildung 5 zeigt die Western-Blot-Analyse der beiden Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 sowie der Lymphomzelllinie Jurkat. Die Prostatakarzinomzellen haben eine höhere USP9X-Proteinabundanz verglichen mit den Jurkat-Zellen. Die Mcl-1-Bande ist in den LNCaP-Zellen etwas stärker als in den anderen Zelllinien. Während die PC3-Zellen sehr viel Bcl-x<sub>L</sub> enthalten, zeigt sich bei den LNCaP- sowie den Jurkat-Zellen nur eine schwache Bcl-x<sub>L</sub>-Bande. Das antiapoptotische Protein Bcl-2 konnte in beiden Prostatazelllinien detektiert werden, der Gehalt ist in den LNCaP-Zellen etwas

höher als in den PC3-Zellen, jedoch im Vergleich zu den Jurkat-Zellen bei beiden Prostatazelllinien niedriger.

Die Western-Blot-Analyse der proapoptotischen Bcl-2-Proteine in den drei Zelllinien zeigt einen deutlichen Unterschied in der Menge des detektierten Bax. Es ist in den Jurkat-Zellen nicht nachweisbar. Im Vergleich dazu ist sowohl in den PC3- als auch in den LNCaP-Zellen eine deutliche Bax-Proteinbande zu sehen. Das Bak-Proteinexpressionsniveau ist in den drei Zelllinien vergleichbar. Die Prostatakarzinomzelllinien unterscheiden sich also vor allem in den Proteinlevel der antiapoptotischen Mitglieder Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> sowie des proapoptotischen Bax untereinander. Die Abundanzen des antiapoptotischen Mcl-1 sowie der Deubiquitinase USP9X zeigen in den Prostatakarzinomzellen nur geringe Unterschiede.



**Abbildung 5: Western Blot Analyse der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 im Vergleich zur Lymphomzelllinie Jurkat**

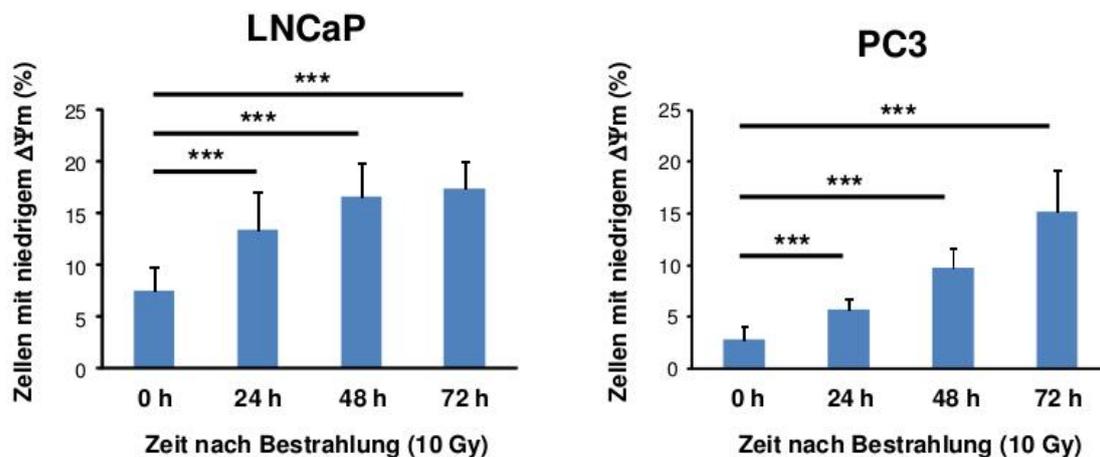
Mittels Western Blot wurde die Proteinabundanz der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, der proapoptotischen Mitglieder Bax und Bak sowie der Deubiquitinase USP9X untersucht. Zur Ladungskontrolle diente die  $\beta$ -Tubulin-Bande. Die Größe der Proteine ist in Kilodalton (kDa) angegeben und neben den Banden aufgeführt.

### 3.2 Apoptoseinduktion nach Bestrahlung

### 3.2.1 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung

Ionisierende Strahlung kann zur Induktion der intrinsischen Apoptose und somit zum Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials ( $\Delta\Psi_m$ ) führen [Rudner et al., 2001]. Um diesen Vorgang in den Zelllinien nach Behandlung mit ionisierender Strahlung zu messen, wurden LNCaP- und PC3-Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Mittels TMRE-Färbung wurde der Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Potential nach Bestrahlung gemessen.

Abbildung 6 zeigt den Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) nach Bestrahlung mit 10 Gy bei LNCaP- und PC3-Zellen. Beide Zelllinien zeigen nach Bestrahlung mit 10 Gy einen Anstieg des Anteils der Zellen mit zusammengebrochenem Membranpotential. Dieser Anteil nimmt in Abhängigkeit der Zeit nach Bestrahlung noch zu, betrifft aber auch nach 72 Stunden nicht einmal 20 % und somit eine relativ geringe Population in beiden Zelllinien.

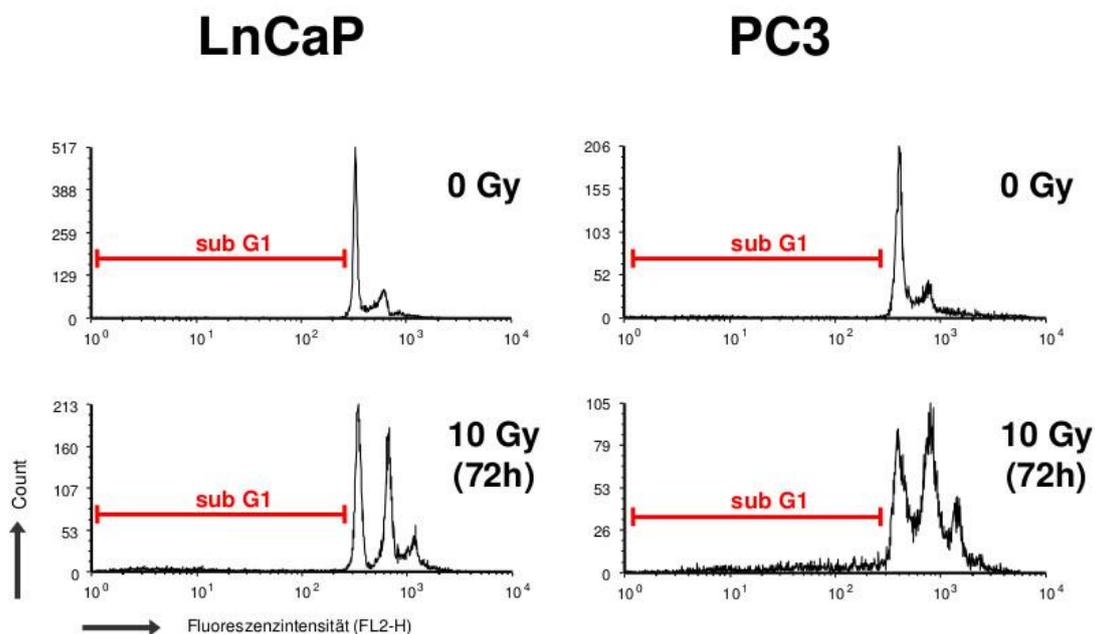


**Abbildung 6: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung**

LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und 0, 24, 48 sowie 72 Stunden nach Bestrahlung im Durchflusszytometer nach Färbung mit TMRE gemessen. Die Anteile in Prozent der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential (Zellen mit niedrigem  $\Delta\Psi_m$ ) sind in Abhängigkeit der Zeit nach Bestrahlung in Balkendiagrammen dargestellt. Sowohl bei den LNCaP-Zellen (links) als auch bei den PC3-Zellen (rechts) ist eine mit der Zeit ansteigende Zunahme des Anteils der Zellen mit zusammengebrochenem Membranpotential nach Bestrahlung zu sehen (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 12$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

### 3.2.2 DNA-Degradierung nach Bestrahlung

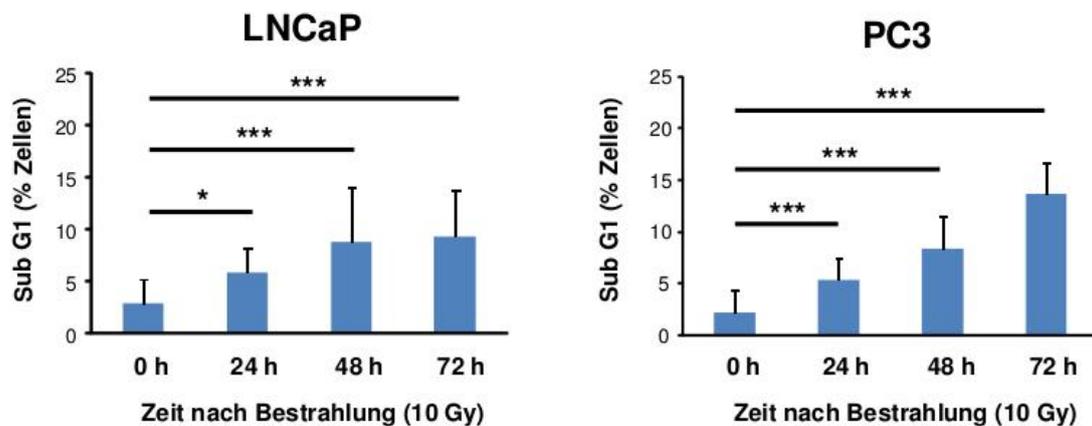
Da der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials indikativ nicht nur für Apoptose sondern auch für andere Formen des Zelltods ist, wurde die Apoptoserate nach Bestrahlung außerdem anhand der DNA-Fragmentierung nach Nicoletti bestimmt. LNCaP- und PC3-Zellen wurden dazu mit 0 oder 10 Gy bestrahlt, mit Propidiumiodid nach Nicolettimethode gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Abbildung 7 zeigt die repräsentativen Histogramme beider Zelllinien. Als subG1-Anteil wurden die hypoploiden Zellen, deren DNA-Gehalt geringer ist als derjenige der Zellen in der G1-Phase, bestimmt.



**Abbildung 7: Bestimmung des Zellanteils mit fragmentierter DNA.**

Repräsentatives Histogramm der Durchflusszytometrie nach Nicoletti-Färbung. LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit 0 oder 10 Gy bestrahlt und nach 72 Stunden permeabilisiert und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die X-Achse der Histogramme zeigt die im Kanal FL-2 gemessene PI-Fluoreszenzintensität (fluorescence intensity = FL2-H), die Y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Zellen (counts) bei der jeweiligen Fluoreszenzintensität. Der Marker (rot) kennzeichnet die Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Population).

Abbildung 8 zeigt die gemittelten subG1-Fractionen beider Zelllinien 0, 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung sowie der entsprechenden, unbehandelten Kontrollzellen. Der Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Anteil) steigt bei beiden Zelllinien in Abhängigkeit der Zeit nach Bestrahlung an. 72 Stunden nach Bestrahlung ist der subG1-Anteil bei beiden Zelllinien am höchsten. Die Ergebnisse zeigen, dass nur ein geringer Anteil der Zellen nach Bestrahlung Apoptose einleitet.



**Abbildung 8: Messung der DNA-Degradierung in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 10 Gy**

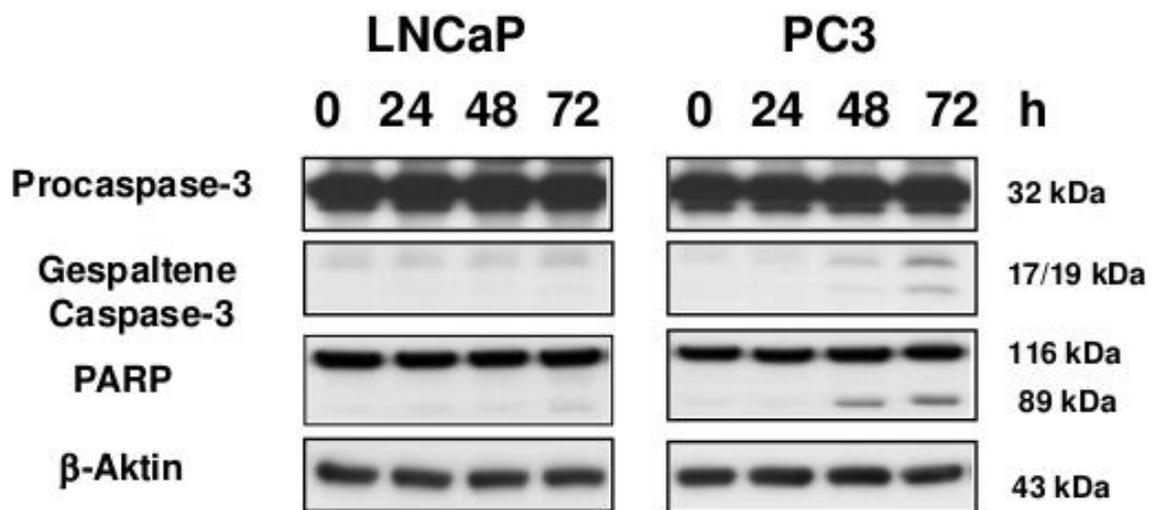
LNCaP- und PC3-Zellen wurden 0, 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit PI nach Nicolettimethode gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Der Anteil der Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt (subG1-Fraktion) wurde in Prozent der gemessenen Zellen angegeben. Der subG1-Anteil steigt bei LNCaP-Zellen (links) sowie PC3-Zellen (rechts) zeitabhängig nach Bestrahlung an (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 12, \*\*\* = p < 0,001 \* = p < 0,05, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

Insgesamt deuten unsere durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse also darauf hin, dass beide Prostatazelllinien resistent auf die Behandlung mit ionisierender Strahlung reagieren. Um diese Radioresistenz der Prostatakarzinomzellen auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden im nachstehenden Versuch Western Blot-Analysen der Zellen angefertigt. Die Messung der Effektorcaspase-3 und deren Substrats PARP nach Bestrahlung soll Aufschluss über Caspasenaktivierung, die ein weiterer Marker der Apoptose ist, geben.

### 3.2.3 Caspaseaktivierung nach Bestrahlung

Caspasen sind die zentralen Proteasen der Apoptose. Um die Reaktion der Zellen auf Bestrahlung auf Proteinebene zu messen, wurde die Caspasen-Aktivierung mittels Western Blot analysiert. Die Aktivierung der Effektorcaspase-3 wurde durch die Bildung ihrer spezifischen Spaltprodukte und durch die Spaltung des Caspase-3-spezifischen Substrats PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) gemessen. Abbildung 9 zeigt die Western Blot-Analysen der Caspase-3-Aktivierung in beiden Zelllinien nach Bestrahlung. Die LNCaP-Zelllysate wiesen keine Spaltprodukte der Caspase-3 bei 17 und 19 kDa auf. Auch das 89 kDa-große Spaltprodukt von PARP war nicht zu detektieren. Im Unterschied dazu war bei den PC3-Zellen 72 Stunden nach Bestrahlung

eine geringe Spaltung der Procaspase-3 zu sehen. Auch konnte das 89 kDa-große Spaltprodukt von PARP detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass es bei PC3-Zellen nach Bestrahlung zu einer relativ geringen Caspase-3-Aktivierung kommt, welche bei den LNCaP-Zellen nicht messbar ist. Diese Daten unterstützen die im vorherigen Versuch gezeigte Strahlenresistenz der beiden Zelllinien. PC3-Zellen scheinen nach Bestrahlung in geringen Maßen eine Caspasen-abhängige DNA-Fragmentierung zu induzieren, während LNCaP-Zellen ihre DNA Caspasen-unabhängig nach Bestrahlung fragmentieren.



**Abbildung 9: Western-Blot-Analyse der Caspase-3-Aktivität der Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 10 Gy.**

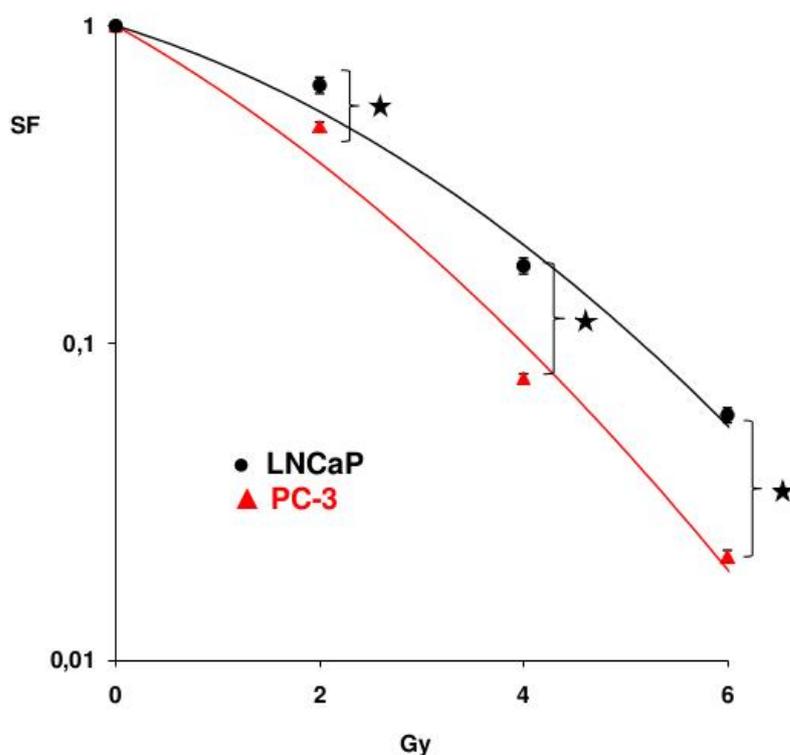
LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit 0 Gy (0 h-Wert) oder 10 Gy bestrahlt und 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung lysiert und die Proteinmengen von Procaspase-3, Caspase-3, gespaltene Caspase-3 sowie des Caspase-Substrats PARP bestimmt. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Nachdem nun Hinweise gefunden wurden, dass die Zellen resistent auf Bestrahlung reagieren, indem ein geringer Anteil an Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential, DNA-Fragmentierung und eine schwache bis ausbleibende Caspasenaktivierung nach Bestrahlung aufgezeigt wurden, soll nun auch die Klonogenität von bestrahlten Prostatakrebszellen untersucht werden.

### 3.3 Klonogenes Überleben nach Bestrahlung

Mit Hilfe des Klonogenitätstests kann das klonogene Überleben der Zellen nach einem Stimulus, hier der Bestrahlung mit aufsteigenden Dosen, untersucht werden. Dabei wird

die Überlebensfraktion (SF, engl. survival fraction) einer Zelllinie bestimmt. Diese beschreibt den Anteil der Zellen, der nach Behandlung noch in der Lage ist, Kolonien zu bilden. Abbildung 10 zeigt die Regressionskurven, die aus den gezählten Kolonien ermittelt wurden, im Vergleich der beiden Zelllinien. Die Zellen wurden mit Bestrahlungsdosen zwischen 2 und 6 Gy bestrahlt. Die Kurve der PC3-Zellen verläuft steiler als die der LNCaP-Zellen und bereits nach Bestrahlung mit 2 Gy unterscheiden sich die SF signifikant. Die LNCaP-Zellen zeigten also nach Bestrahlung eine erhöhte Klonogenität als die PC3-Zellen.



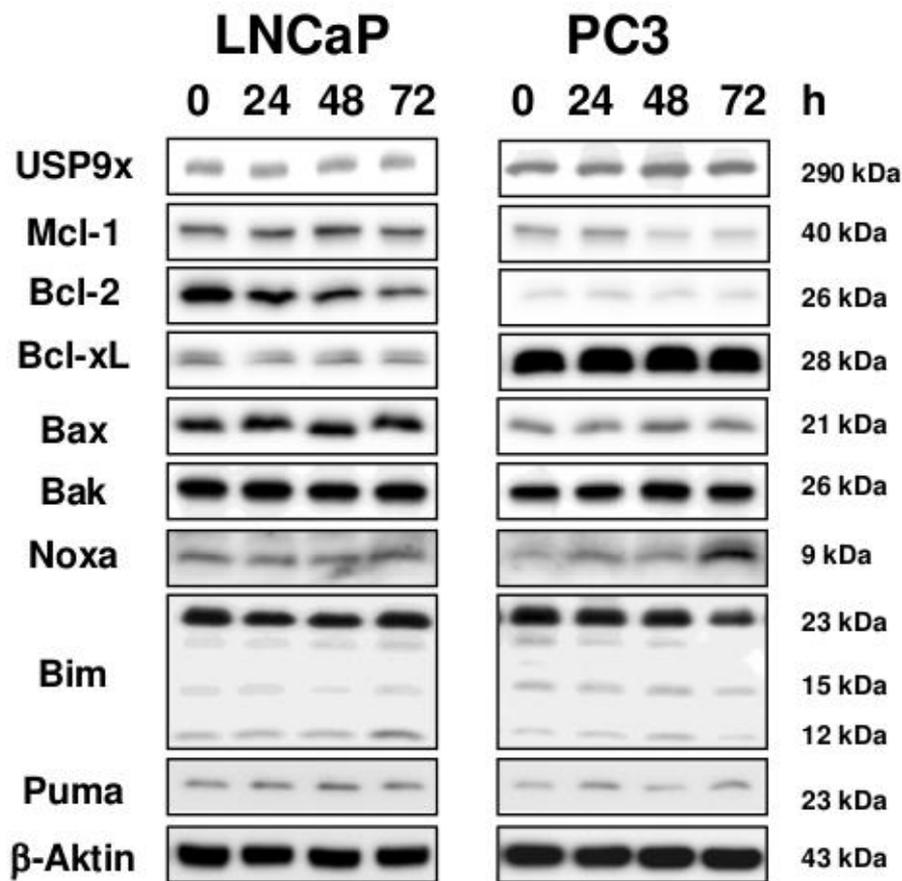
**Abbildung 10: Klonogenes Überleben von bestrahlten LNCaP- und PC3-Zellen.** Koloniebildungstest der Zelllinien LNCaP und PC3 nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 6 Gy. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Zellzahlen in 6-Well-Platten ausplattiert und mit Dosen zwischen 0 und 6 Gy bestrahlt. Nach zwei Wochen Inkubation im Brutschrank wurden die entstandenen Kolonien (Ansammlung von >50 Zellen) angefärbt und gezählt, mit der Anzahl der ausplattierten Zellen in Verhältnis gesetzt (Plating Efficiency) und auf den Kontrollwert (0 Gy) normiert (Survival Fraction, SF). Die SF wurden mit der Linear-Quadratischen-Funktion gefittet (SigmaPlot) und zwischen LNCaP (schwarze Kreise) und PC3 (rote Dreiecke) verglichen (Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 6; \*= $p < 0,05$ , zweiseitiger t-Test).

### **3.4 Regulierung der pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung**

Da die Bcl-2-Proteine im Rahmen der Apoptose eine zentrale Rolle spielen und deren antiapoptotische Vertreter als Vermittler von Strahlenresistenz ursächlich sein können, sollen im Folgenden die Abundanzen einiger wichtiger Bcl-2-Proteine nach Behandlung mit Strahlentherapie untersucht werden.

Der Einfluss von ionisierender Strahlung auf diese Proteine wurde mittels Western Blot untersucht. Abbildung 11 zeigt die Abundanzen der Proteine in beiden Zelllinien nach Bestrahlung mit 10 Gy. Bcl-2 konnte in den PC3-Zellen nur schwach nachgewiesen werden, in den LNCaP-Zellen war das Signal stärker, nahm aber 48 Stunden nach Bestrahlung ab. Das Bcl-x<sub>L</sub>-Level war insbesondere in PC3-Zellen höher als in LNCaP-Zellen, veränderte sich aber nach Bestrahlung in beiden Prostatazelllinien nicht. Die proapoptotischen Proteine Bax und Bak zeigten in beiden Zelllinien kaum Veränderung in der Proteinmenge. Gleiches gilt für die BH3-only Proteine Puma und Bim. Das Noxalevel wurde in den PC3-Zellen 72 Stunden nach Bestrahlung hochreguliert, während in den LNCaP-Zellen keine Veränderung der Noxamenge sichtbar war.

Die USP9X-Abundanz blieb in beiden Zelllinien nach Bestrahlung konstant. Die Mcl-1-Menge dagegen war in den PC3-Zellen 48 bis 72 Stunden nach Bestrahlung geringer als in unbestrahlten Zellen, während sie in den LNCaP-Zellen unverändert blieb. Für die in den PC3-Zellen beobachtete Mcl-1-Herunterregulierung könnte möglicherweise ein erhöhter Abbau des antiapoptotischen Proteins verantwortlich sein. Die Deubiquitinase USP9X könnte den Abbau in den Prostatazellen verhindern. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Regelung des Mcl-1-Levels durch USP9X und die Auswirkung von USP9X auf die Apoptoseinduktion untersucht.



**Abbildung 11: Western Blot-Analyse der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie sowie der Deubiquitinase USP9X in LNCaP- und PC3-Zellen nach Bestrahlung**

LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit 0 Gy (0 h-Wert) oder 10 Gy bestrahlt und 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung lysiert. USP9X, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax, Bak, Noxa, Bim und Puma wurden mittels Western Blot detektiert. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin. Die Level der meisten hier untersuchten Proteine änderte sich nach Bestrahlung nicht. Nur Mcl-1 wurde nach Bestrahlung in PC3-Zellen und Bcl-2 in LNCaP-Zellen herunterreguliert. Gezeigt werden repräsentative Blots (n = 3).

### 3.6 USP9X-Herunterregulierung mittels siRNA

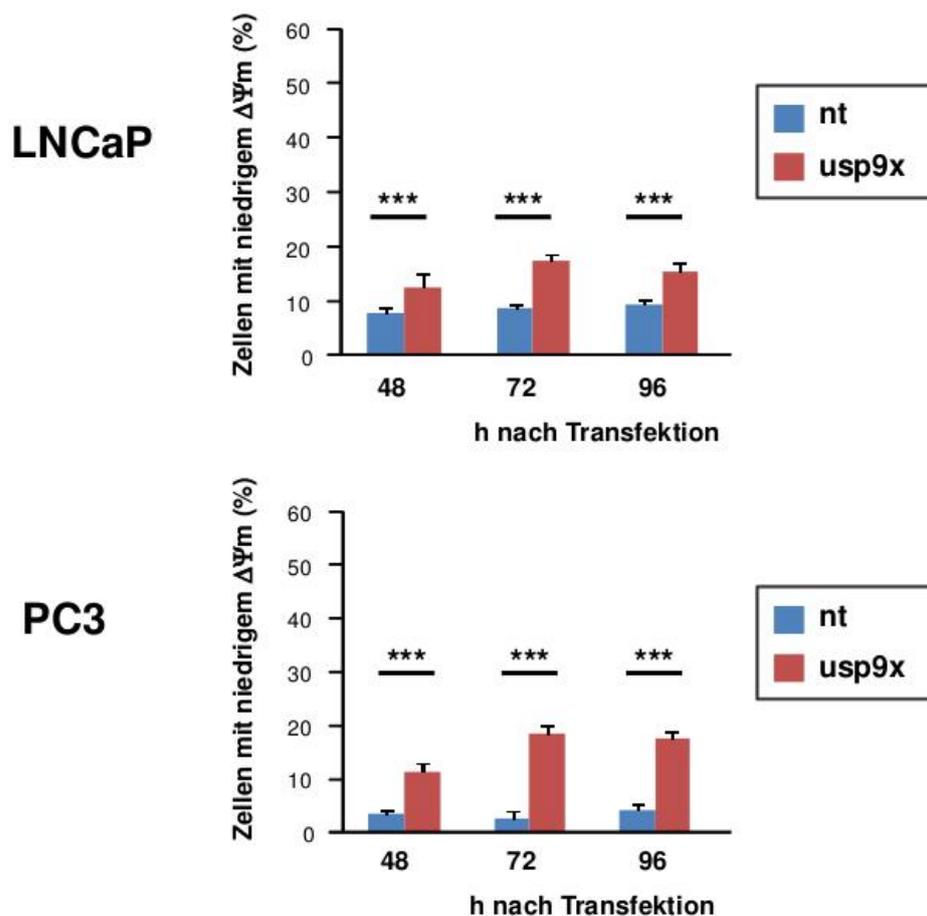
Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Deubiquitinase USP9X auf Mcl-1 hat, wurden die Zellen mit siRNA transfiziert, mit Hilfe derer eine Herunterregulierung von USP9X erreicht werden sollte. siRNA sind kurze Ribonukleinsäuren, die sich spezifisch an komplementären mRNA-Abschnitten binden, die mRNAs dadurch destabilisieren und die Translation eines gezielten Proteins hemmen können.

Zum Vergleich wurden Zellen mit non-targeting siRNA transfiziert, die mit keiner humanen mRNA interferieren sollte und damit als Negativkontrolle diente. Die USP9X-

herunterregulierende (usp) und die non-targeting (nt) siRNA wurden mit dem Transfektionsreagenz siQuest in die Zellen eingebracht.

### **3.6.2 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und DNA-Degradierung nach USP9X-Herunterregulierung**

Es sollte untersucht werden, ob die Herunterregulierung von USP9X einen Einfluss auf das Zellüberleben hat. Deswegen wurden der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und die DNA-Degradierung in LNCaP- und PC3-Zellen nach Transfektion analysiert (Abbildung 12). Dazu wurden die LNCaP- und PC3-Zellen mit der entsprechenden siRNA transfiziert und 48, 72 sowie 96 Stunden danach mit TMRE gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 12 zeigt den Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ). Die mit der USP9X-siRNA transfizierten Zellen wurden mit den mit nt-siRNA transfizierten Zellen verglichen. Eine Herunterregulierung von USP9X führte in beiden Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ). In beiden Zelllinien nahm dieser Teil nach 72 h und 96 h etwas zu, während er sich nach Transfektion mit nt-siRNA kaum veränderte.



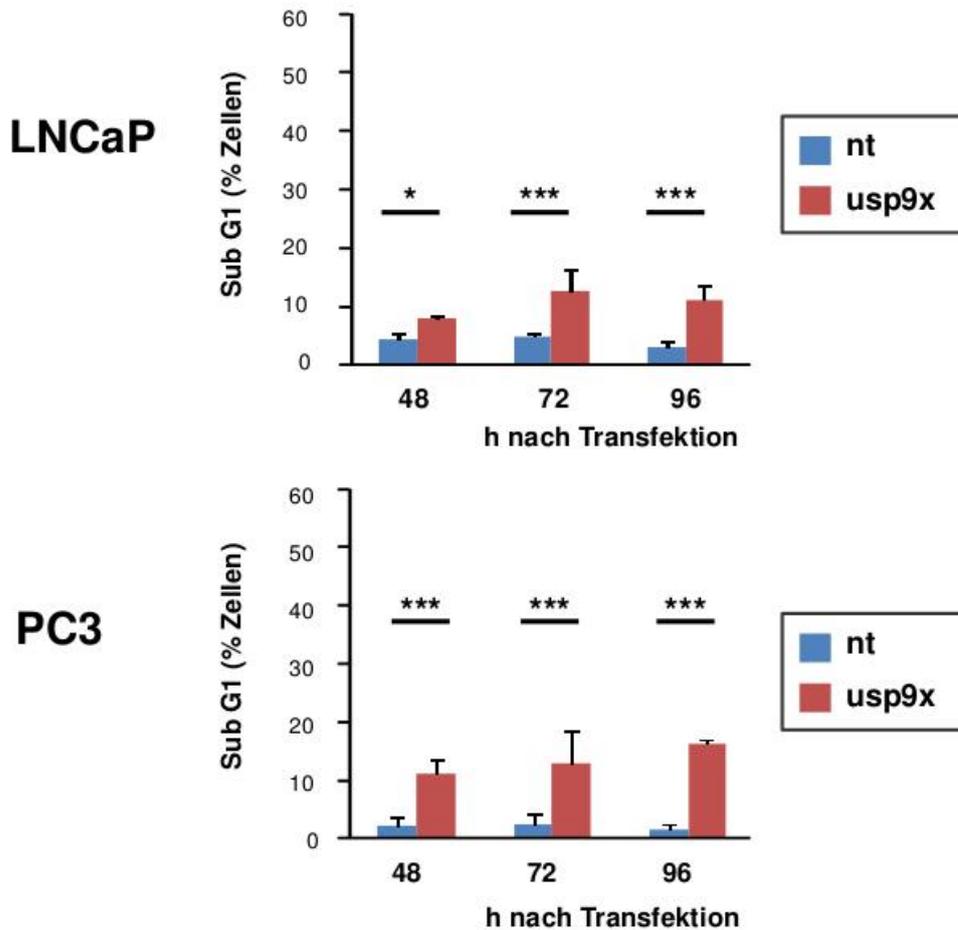
**Abbildung 12: Effekt der USP9X-Herunterregulierung auf den Anteil der LNCaP- und PC3-Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ).**

LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit USP9X-herunterregulierender siRNA (usp) oder zur Kontrolle mit der non-targeting (nt) siRNA transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion mit TMRE gefärbt. Der Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Der Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem  $\Delta\Psi_m$  war zu allen Zeitwerten signifikant höher in den Zellen, die mit usp-siRNA transfiziert wurden, als in den Zellen, die mit nt-siRNA transfiziert wurden. Diese Erhöhung ist 72 und 96 h nach Transfektion etwas höher als 48 h nach Transfektion (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 6, \*\*\* = p < 0,001, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

Zur Bestimmung der Apoptoseinduktion nach Herunterregulierung von USP9X wurde die DNA-Fragmentierung nach Nicolettimethode gemessen. Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der durchflusszytometrischen Messung der DNA-Fragmentierung 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion mit USP9X- und nt-siRNA. Analog zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials war auch hier der Anteil der LNCaP- bzw. PC3-Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Anteil) nach Transfektion mit USP9X-siRNA höher als nach Transfektion mit nt-siRNA. Der Anteil der Zellen mit fragmentierter

DNA war 72 und 96 h nach Transfektion mit USP9X-siRNA etwas höher als 48 h nach Transfektion.

Die Messungen zeigen insgesamt sowohl eine vermehrte DNA-Fragmentierung als auch vermehrt Zellen mit zusammengebrochenem  $\Delta\Psi_m$  nach Transfektion mit USP9X-siRNA in beiden Prostatazelllinien.



**Abbildung 13: Effekt der USP9X-Herunterregulierung auf die DNA-Fragmentierung in LNCaP- und PC3-Zellen**

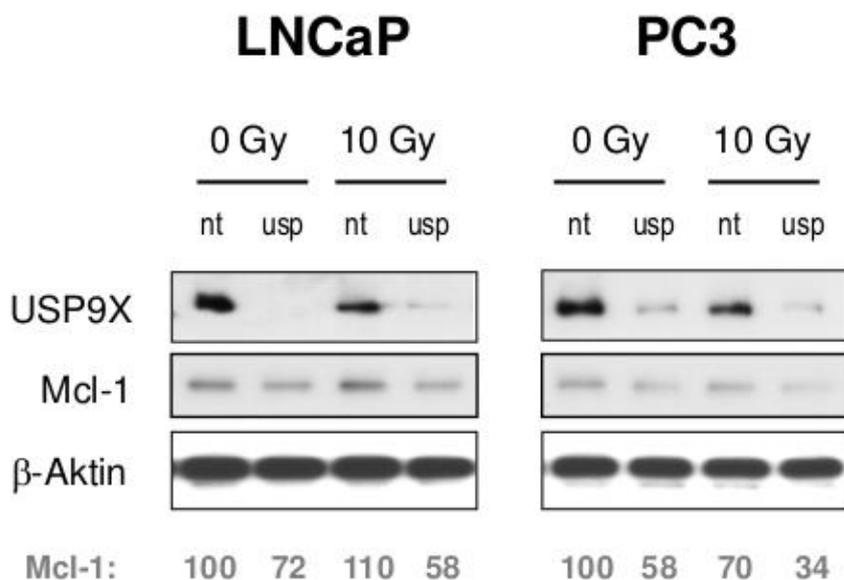
LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit USP9X-herunterregulierender siRNA (usp) oder zur Kontrolle mit non-targeting (nt) siRNA transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Die Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Anteil) wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Dieser subG1-Anteil der beiden Prostatazelllinien ist zu allen Zeitwerten signifikant höher nach Transfektion mit USP9X-siRNA als nach Transfektion mit nt-siRNA (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 6, \*\*\* = p < 0,001, \* = p < 0,05, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

### 3.6.3 Mcl-1-Abundanz nach USP9X-Herunterregulierung

Trivigno et al. haben gezeigt, dass durch USP9X-Herunterregulierung in radioresistenten Jurkatzellen das Mcl-1-Level nach Bestrahlung abnahm [Trivigno et

al., 2012]. Daher sollte nun untersucht werden, ob USP9X das Mcl-1-Proteinlevel auch in den beiden Prostatazelllinien reguliert. Um den Effekt der USP9X-Herunterregulierung auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Prostatazellen zunächst mit USP9X- bzw nt-siRNA transfiziert. 48 h später wurden die Zellen mit 0 bzw 10 Gy bestrahlt. Nach weiteren 48 h wurden Lysate hergestellt, die mittels Western Blot analysiert wurden (Abbildung 14). Die Herunterregulierung von USP9X war zu diesem Zeitpunkt sehr effizient. Die densitometrische Auswertung der Mcl-1-Banden zeigt, dass nach USP9X-Herunterregulierung das Mcl-1-Proteinlevel in beiden Zelllinien bereits in unbestrahlten Zellen leicht abnahm (LNCaP-Zellen von 100% auf 72%, PC3-Zellen von 100% auf 58%). Nach Bestrahlung war die Abnahme des Mcl-1-Levels in beiden Zelllinien deutlich stärker in Zellen, die mit USP9X-siRNA transfiziert wurden, als in den mit nt-siRNA transfizierten Zellen (LNCaP-Zellen von 110% auf 58%, PC3-Zellen von 70% auf 34%).

Die Verringerung des Mcl-1-Levels durch die Herunterregulierung von USP9X lässt vermuten, dass die Deubiquitinase in den Prostatazellen ein wichtige Rolle bei der Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins spielt.



**Abbildung 14: Einfluss von USP9X auf die strahleninduzierte Herunterregulierung des Mcl-1-Proteinlevels.**

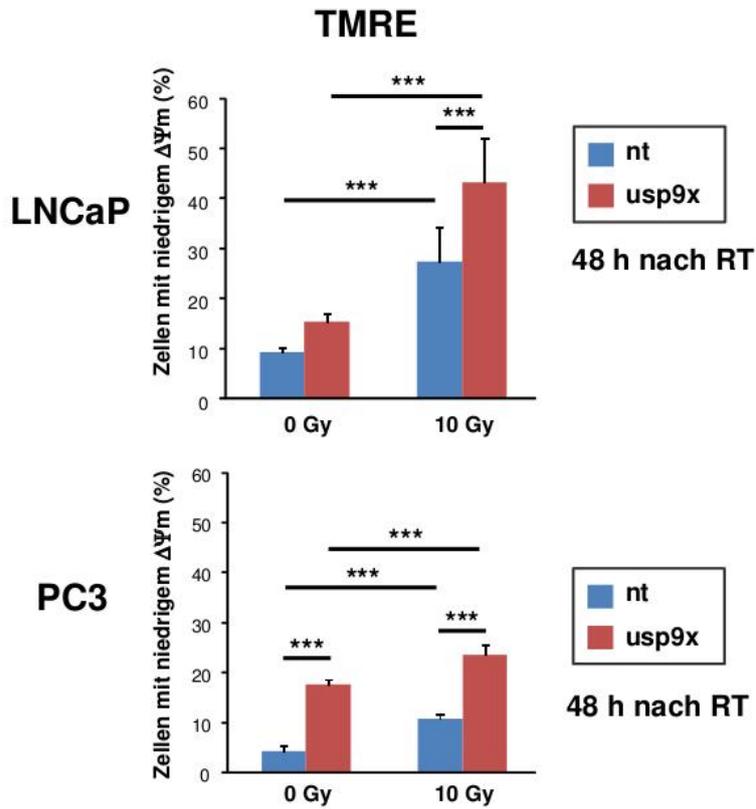
LNCaP- (links) und PC3- (rechts) Zellen wurden mit USP9x-spezifischer siRNA (usp) oder non-targeting (nt) siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen bestrahlt (0 Gy, 10 Gy). 48 Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen lysiert und USP9X und Mcl-1 per Western-Blot analysiert. Als Beladungskontrolle für die Western Blot Analyse diente β-Aktin.

Die Mcl-1-Banden wurden densitometrisch mittels ImageJ gemessen und die Werte auf die der jeweiligen  $\beta$ -Aktin-Bande normiert. Weiterhin folgte eine Normierung der Mcl-1-Proteinlevel auf die entsprechenden unbestrahlten Zellen, die mit nt-siRNA transfiziert wurden.

Nachfolgend untersuchten wir nun, ob die beobachtete mögliche Stabilisierung von Mcl-1 durch USP9X zur Strahlenresistenz in LNCaP- und PC3-Zellen beiträgt, beziehungsweise ob die Herunterregulierung von USP9X im Gegenzug zu einer verbesserten Apoptoseinduktion nach Bestrahlung führt.

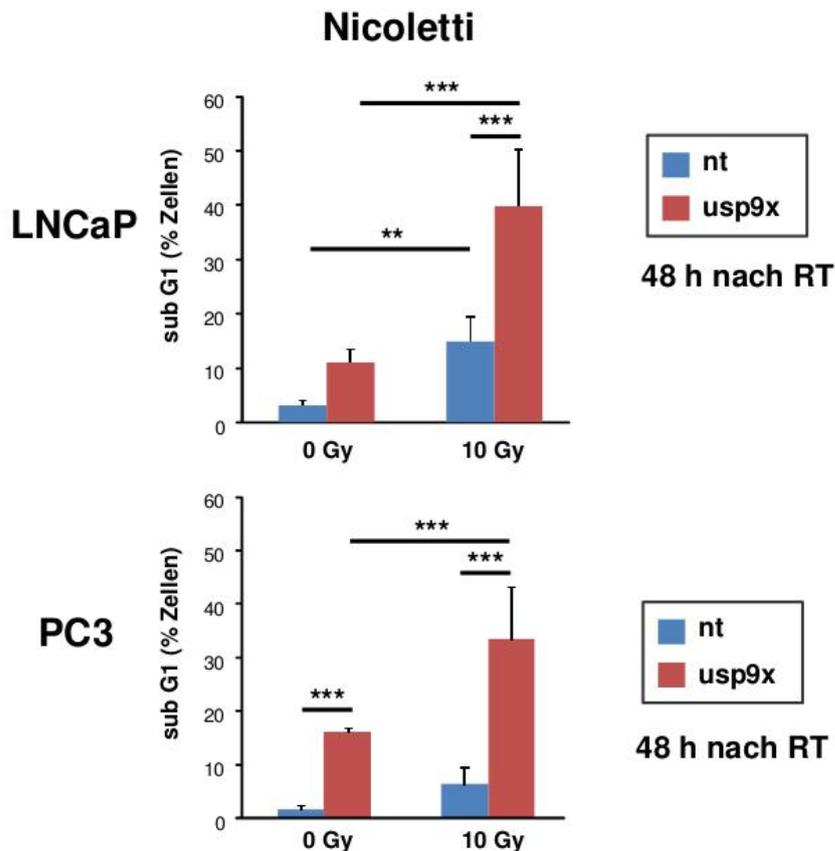
#### **3.6.4 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und DNA-Fragmentierung nach USP9X-Herunterregulierung und Bestrahlung**

In diesem Versuch sollte mittels Durchflusszytometer untersucht werden, ob die Herunterregulierung von USP9X durch siRNA einen Einfluss auf den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und die DNA-Fragmentierung nach Bestrahlung hat. Dazu wurden die Zellen mit USP9X-siRNA und non-targeting (nt)-siRNA transfiziert und 48 Stunden später mit 0 Gy bzw. 10 Gy bestrahlt. 48 Stunden nach Bestrahlung wurde die DNA-Fragmentierung (subG1) nach der Nicolettimethode bzw. das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) nach Färbung mit TMRE durchflusszytometrisch gemessen. Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen den Anteil der Zellen mit niedrigem  $\Delta\Psi_m$  bzw. den subG1-Anteil der Zellen nach Transfektion mit siRNA und Bestrahlung mit 0 Gy bzw. 10 Gy. Zu sehen war, dass in beiden Zelllinien nach Bestrahlung der Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential sowie der Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA nach USP9X-Herunterregulierung signifikant erhöht waren.



**Abbildung 15: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in LNCaP- und PC3-Zellen nach USP9X-Herunterregulierung und Bestrahlung**

LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit USP9X-herunterregulierender siRNA (usp) oder non-targeting siRNA (nt) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0 oder 10 Gy bestrahlt. 48 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit TMRE gefärbt und der Anteil der Zellen mit zusammengebrochenem Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) bestimmt. Nach Bestrahlung kam es in beiden Zelllinien nach USP9X-Herunterregulierung zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Zellen mit niedrigem  $\Delta\Psi_m$  (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).



**Abbildung 16: DNA-Fragmentierung in LNCaP- und PC3-Zellen nach USP9X-Herunterregulierung und Bestrahlung**

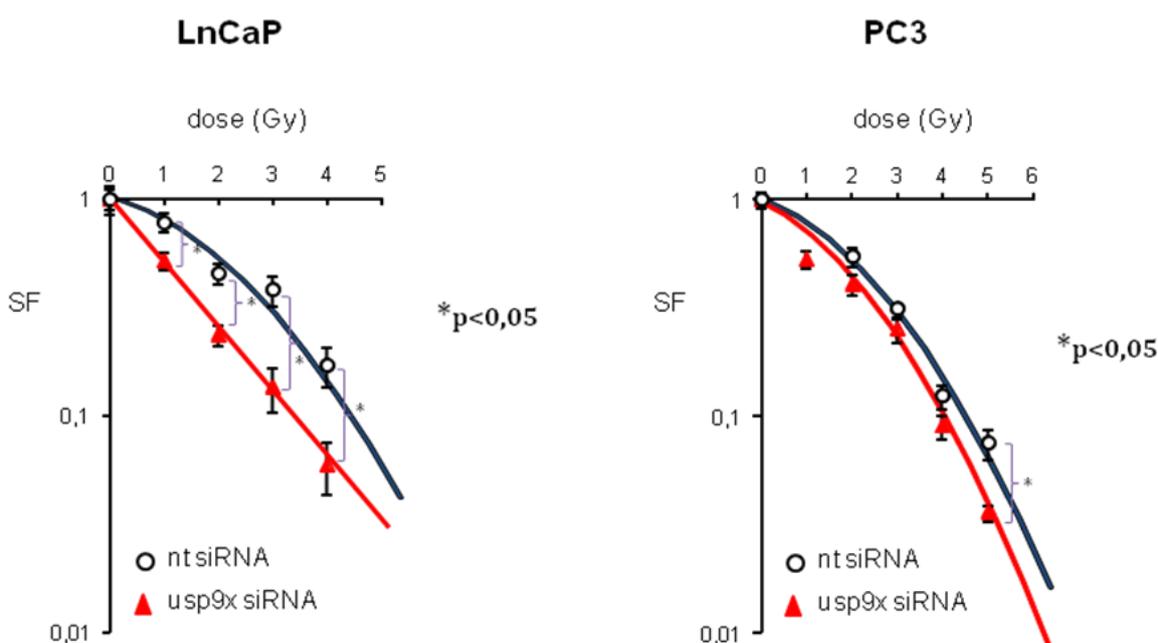
LNCaP- und PC3-Zellen wurden mit USP9X-herunterregulierender siRNA oder non targeting (nt)-siRNA transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0 oder 10 Gy bestrahlt. 48 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen nach dem Nicoletti-Protokoll mit Propidiumiodid gefärbt und die DNA-Fragmentierung (subG1-Anteil) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Nach Bestrahlung kam es in beiden Zelllinien nach USP9X-Herunterregulierung zu einem signifikanten Anstieg des subG1-Anteils (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 6, \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

Beide Zelllinien reagierten folglich nach USP9X-Herunterregulierung sensibler auf ionisierende Strahlung durch eine verbesserte Initiation der Apoptose. Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob sich auch das klonogene Überleben der Zellen und somit die Strahlensensitivität nach Herunterregulierung von USP9X verändert.

### 3.6.5 Klonogenes Überleben nach USP9X-Herunterregulierung

In diesem Versuch sollte neben der Auswirkung der USP9X-Herunterregulierung auf das Zellsterben auch die Auswirkung auf das klonogene Überleben getestet werden. Dazu wurden Koloniebildungstests mit beiden Zelllinien, die mit USP9X-siRNA und zur Kontrolle mit nt-siRNA transfiziert wurden, durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion, die Auszählung der Kolonien nach weiteren zwei

Wochen. Aus den gezählten Kolonien wurden die Überlebensfraktionen (SF, engl. survival fractions) bestimmt. Anhand dieser wurden Regressionskurven ermittelt. Abbildung 17 zeigt diese Regressionskurven der transfizierten LNCaP- und PC3-Zellen. Bei den LNCaP-Zellen zeigte sich bereits ab einer Dosis von 1 Gy eine signifikante Verminderung der SF-Werte verglichen mit den mit nt-siRNA transfizierten Kontrollen. Eine signifikante Verminderung der Überlebensfraktion konnte auch bei den PC3-Zellen beobachtet werden, jedoch erst bei einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Herunterregulierung von USP9X die Überlebensfraktion in beiden Zelllinien reduziert und somit die Strahlensensitivität verbesserte. Dieser Effekt trat bei den LNCaP-Zellen bereits bei geringeren Bestrahlungsdosen ein, während er in PC3-Zellen erst bei einer höheren Dosis beobachtet wurde.



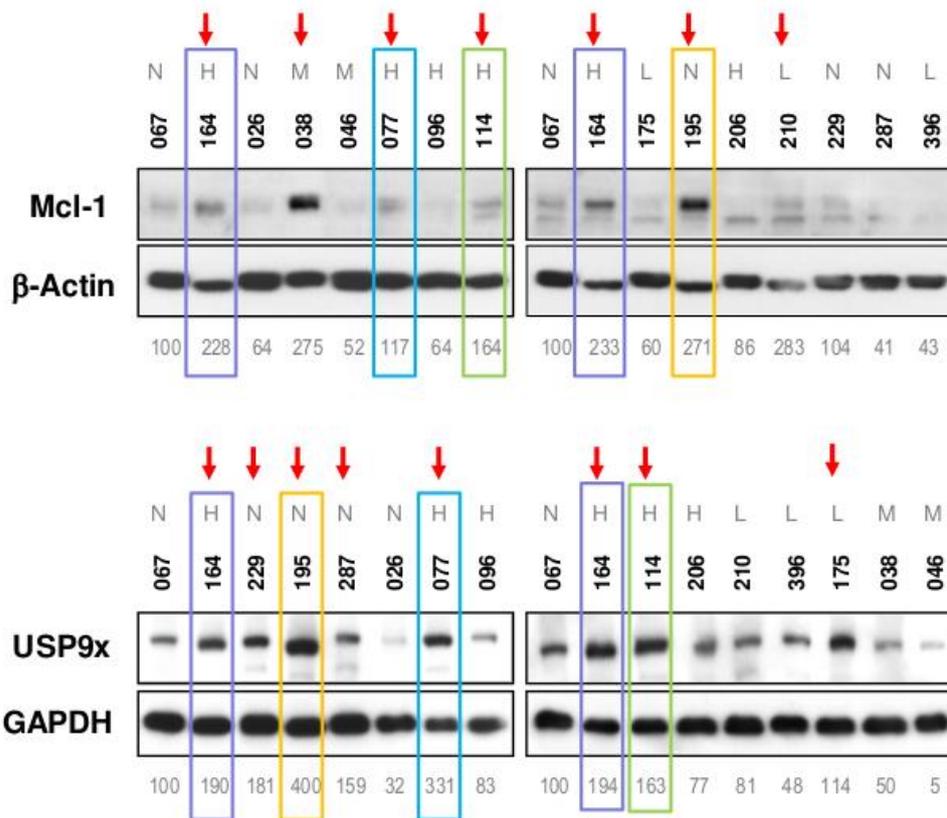
**Abbildung 17: Koloniebildungstest nach Transfektion mit USP9X-siRNA**

Die Zelllinien LNCaP und PC3 wurden ausplattiert, mit non targeting (nt) oder USP9X-herunterregulierender siRNA (usp) mittels siQuest transfiziert und 48 h später in unterschiedlichen Dosen von 1 Gy bis 5 Gy bestrahlt. Nach zwei Wochen Inkubation wurden die Zellkulturplatten angefärbt und die entstandenen Kolonien (Ansammlung von mehr als 50 Zellen/Kolonie) gezählt. Aus den gezählten Kolonien wurde die Überlebensfraktion (SF, engl. survival fraction) für die jeweilige Bestrahlungsdosis berechnet. Aus den SF in Abhängigkeit der Dosis wurden die Regressionskurven ermittelt. In LNCaP-Zellen resultierte die Herunterregulierung von USP9x in einem signifikant verbesserten klonogenen Zelltod bereits wenn geringe Strahlendosen appliziert wurden. In PC3-Zellen wurde eine signifikante Reduktion der SF-Werte erst bei einer Dosis von 5 Gy beobachtet (n = 3, \* = p < 0,05, Welch-korrigierter t-Test).

Die bisherigen Ergebnisse unserer Zellkulturversuche deuten darauf hin, dass USP9X ein potentieller Faktor ist, der die Strahlensensitivität in Prostatazellen reguliert. Die Herunterregulierung von USP9X reduzierte die Proteinmenge des antiapoptotischen Mcl-1, erhöhte den strahleninduzierten Zelltod und reduzierte das klonogene Überleben nach Bestrahlung. Im Folgenden sollte nun in Proben von Patienten untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen erhöhten Abundanzen der Deubiquitinase USP9X und des antiapoptotischen Mcl-1 besteht.

### **3.7 Abundanz von Mcl-1 und USP9X in in-vivo-Präparaten**

Zur Überprüfung der Mcl-1- und USP9X-Proteinabundanzen in Prostatatumoren wurden 15 Proben aus Primärtumoren unterschiedlicher Malignität entnommen und Lysate erstellt. Die Präparate wurden lysiert und mittels Western Blot wurde das Expressionsniveau von Mcl-1 und USP9X überprüft. Abbildung 18 zeigt die ermittelten Mcl-1- und USP9X-Banden und deren densitometrische Auswertung.



**Abbildung 18: Mcl-1 und USP9x-Proteinlevel in Prostata-Proben von Patienten**

Die Proben wurden auf ihr USP9X- und Mcl-1-Level hin untersucht. β-Aktin bzw. GAPDH dienten als Beladungskontrollen. Die Bezeichnungen N, H, L und M sind Abkürzungen für die Einteilung in Normalgewebe (N), Tumoren mit einem Gleason Score <7 (L für low grade) und hohem Gleason >7 (H für high grade) sowie metastasierte Karzinome (M). Die Werte im unteren Teil der Abbildung geben die relativen Schwärzungen der Banden in Prozent in Relation zum ersten Präparat (Probe 067). Durch rote Pfeile hervorgehoben sind Präparate, welche jeweils eine erhöhte Mcl-1- oder USP9X-Menge in Relation zur Probe 067 aufweisen und durch vertikale Kästen hervorgehoben sind Präparate, die sowohl erhöhte USP9X-Level als auch erhöhte Mcl-1-Mengen im Vergleich zur Referenzprobe 067 aufweisen.

Die Mcl-1- und USP9X-Banden der Präparate wurden densitometrisch ausgewertet und in Relation zur entsprechenden Ladungskontrolle und der Referenzprobe (067) gesetzt. Diese Referenzprobe wies eine mittlere Mcl-1- sowie USP9X-Abundanz auf und ermöglichte die Einordnung der übrigen Abundanzen. Diejenigen Abundanzen, deren densitometrischer Wert den der Referenzprobe überstieg, wurden als erhöht gewertet. Erhöhte Mcl-1- bzw. USP9X-Abundanzen wurden in Tabelle 7 mit einem Plus (+) gekennzeichnet und den nach dem Malignitätsgrad aufgelisteten Proben zugeordnet. Ein erhöhtes Mcl-1-Level wurde in 20% (1/5) der nicht malignen Proben, in 33% (1/3) der niedrig malignen Proben (Gleason Score ≤ 7), in 60% (3/5) der hoch malignen Proben

(Gleason Score > 7) und in 50% (1/2) der metastasierenden Proben beobachtet. Tendenziell war das Mcl-1-Proteinlevel in den hoch malignen und metastasierenden Prostataprobe öfters erhöht als in den nicht malignen und niedrig malignen Proben.

Ein erhöhtes USP9X-Proteinlevel wurde dagegen in 60% (3/5) der nicht malignen aber genauso häufig in den hoch malignen Proben detektiert. Hier konnte keine Erhöhung der Proteinlevel im Verlauf der Prostatakarzinomentwicklung festgestellt werden. Werden die Proben mit erhöhtem Mcl-1-Level mit den mit erhöhtem USP9X-Level verglichen, dann fällt auf, dass von den sechs Proben, die ein hohes Mcl-1-Level aufweisen, gleichzeitig vier ein hohes USP9X-Level haben.

Obwohl die Anzahl der Proben zu gering ist, zeigen diese Ergebnisse, dass bei vielen Proben, in denen Mcl-1 erhöht detektiert wird, zur gleichen Zeit auch USP9X erhöht ist.

		Nr	Mcl-1	USP9x
no malignancy	Cx	067		
	Cx	229		+
	TVP	195	+	+
	TURP	026		
	TURP	287		+
Gleason low	7	175		+
	7	210	+	
	7	396		
Gleason high	9	077	+	+
	9	096		
	9	114	+	+
	10	206		
	9	164	+	+
metastatic	pall TURP	038	+	
	pall TURP	046		

**Tabelle 7: In-vivo-Präparate der Prostata und deren densitometrische Auswertung der Mcl-1- und USP9X-Level**

Die Proben wurden in nicht maligne Präparate (*no malignancy*), Tumoren mit einem niedrigen Gleason Score  $\leq 7$  (*Gleason low*), hohem Gleason Score  $> 7$  (*Gleason high*) sowie metastasierende Tumoren (*metastatic*) eingeteilt. Die mittlere Spalte zeigt bei den nicht malignen und metastasierten Proben die Entnahmeart (TVP = transvesikale Prostataadenomenektomie, TURP = transurethrale Resektion der Prostata, pall TURP = transurethrale Resektion der Prostata in palliativer Absicht). Bei den niedrig- und hochgradigen Tumoren wird in der mittleren Spalte der Gleason Score angegeben. In der dritten Spalte sind die Proben nummeriert mit einer dreistelligen Ziffer angegeben.

Die Proteinbanden wurden densitometrisch mittels ImageJ ausgewertet, als Referenz diente die Schwärzung der Probe 067, da deren USP9X- und Mcl-1-Level in etwa dem Durchschnitt der gemessenen Proben entsprach. „+“ bezeichnet diejenigen Proben, deren Proteinlevel deutlich höher lag als das der Referenzprobe 067.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC3 sind radioresistent

Eine wichtige Behandlungsstrategie des Prostatakarzinoms liegt in der Bestrahlung und nicht selten wird eine Radioresistenz der Tumoren beobachtet, die auf der verstärkten Aktivität antiapoptotischer Proteine beruhen kann [McKenzie & Kyprianou, 2006; Uzzo et al., 2008].

Wir prüften zunächst zwei Prostatakrebszelllinien auf ihre Apoptoseinduktion nach Bestrahlung. Es zeigte sich, dass die Zelllinien LNCaP und PC3 keine bzw. nur eine geringe Spaltung der Effektorcaspase-3 nach Bestrahlung aufwiesen. Auch eine Spaltung des Caspase-3-spezifischen Substrates PARP war nur gering zu beobachten (siehe Abbildung 9). Außerdem wies nur ein kleiner Anteil der Zellen fragmentierte, hypoploide DNA nach Bestrahlung auf (siehe Abbildung 8). Auch das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) erwies sich in beiden Zelllinien nach Bestrahlung in einem Großteil der Zellen als stabil (siehe Abbildung 6). Es kam also nur zu einer geringen Apoptoseinduktion nach der Behandlung mit einer hohen Dosis ionisierender Strahlung, was auf eine ausgeprägte Radioresistenz der Zellen hindeutet.

Wir verglichen unsere Ergebnisse mit den Messungen der Arbeitsgruppe Trivigno et al., die einen radiosensitiven und einen radioresistenten Lymphomzellklon ebenfalls nach Bestrahlung mit 10 Gy durchflusszytometrisch untersuchten. Der Anteil der Zellen mit Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) 72 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy lag in beiden Lymphomzelllinien bei über 60%. Der Anteil der Zellen mit hypoploiden DNA-Mengen (subG1) lag in beiden Zelllinien 72 Stunden nach Bestrahlung bei mehr als 50 % der gemessenen Zellen [Trivigno et al., 2012]. Der Anteil der LNCaP- bzw. PC3-Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Potenzial sowie der Anteil der Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt war in den Prostatakarzinomzellen deutlich geringer (siehe Abbildung 8).

Ferner zeigten die von uns untersuchten Zelllinien, im Besonderen die LNCaP-Zellen, ein hohes klonogenes Überleben nach Bestrahlung (siehe Abbildung 10). Wir verglichen die ermittelten Überlebensfraktionen (SF) ebenfalls mit den von Trivigno et al. publizierten Ergebnissen. Die SF der von dieser Arbeitsgruppe untersuchten

Lymphomzellen lagen bei einer Bestrahlung mit 4 Gy dabei unter 0,01 und somit deutlich niedriger als die der LNCaP- und PC3-Zellen (siehe Abbildung 10) [Trivigno et al., 2012]. Somit legt auch die Untersuchung des klonogenen Überlebens im Vergleich zur Lymphomzelllinie Jurkat den Schluss nahe, dass die gemessenen Prostatazelllinien radioresistenter sind als Jurkat-Zellen.

Zusammenfassend wiesen LNCaP- und PC3-Zellen sowohl eine geringe Caspasenaktivierung nach Bestrahlung auf, was für eine geringe Apoptoseinduktion spricht. Ebenso fanden wir in den Prostatazelllinien weniger Zellen mit fragmentierter DNA als auch mehr Zellen mit einem intakten mitochondrialen Membranpotential und ein verbessertes klonogenes Überleben nach Bestrahlung im Vergleich zu den Jurkatzellen [Trivigno et al., 2012].

#### **4.2 Stabilisierung des Mcl-1-Levels nach Bestrahlung in LNCaP-Zellen**

Einige Publikationen haben in den letzten Jahren die Bedeutung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in der Entstehung von Therapieresistenzen untersucht und mögliche Umgehungsstrategien diskutiert [Hussain et al., 2007; Nguyen et al., 2007; Hermanson et al., 2013; Trivigno et al., 2012; Skvara et al., 2005]. Mcl-1 hat dabei aufgrund seines raschen Umsatzes und seiner Überexpression in vielen Tumoren eine besondere Bedeutung. Es kann strahlungsinduzierte Apoptose verhindern und das klonogene Überleben erhöhen [Skvara et al., 2005]. Die Arbeitsgruppe Krajewska et al. untersuchte Prostatakarzinomproben auf ihren Gehalt an Bcl-2-Proteinen und fand dabei heraus, dass Mcl-1 in 52 der 64 untersuchten Prostatakarzinomproben (81%) detektiert wurde [Krajewska et al., 1996]. Weiterhin konnten sie zeigen, dass der Anteil der Mcl-1-positiven Proben mit der Tumormalignität korrelierte [Krajewska et al., 1996]. Die vermehrte Expression von Mcl-1 in hochgradigen Prostatatumoren könnte folglich das Zellüberleben verbessern und für die Resistenz gegenüber der Strahlentherapie mitverantwortlich sein.

Wir untersuchten daher die Mcl-1-Proteinabundanz mittels Western Blot in den Zelllinien LNCaP und PC3 und verglichen sie mit der Mcl-1-Menge in Jurkatzellen, die von Trivigno et al. in früheren Untersuchungen verwendet wurden (siehe Abbildung 5). Dabei waren die Mcl-1-Proteinmengen in den PC3-Zellen in etwa vergleichbar mit denen der Jurkat-Zellen, LNCaP-Zellen wiesen eine etwas höhere Mcl-1-Menge auf.

Nach Bestrahlung kam es in den PC3-Zellen zu einer Reduktion des Mcl-1-Levels (siehe Abbildung 11). Eine ähnliche Beobachtung machten auch die Arbeitsgruppen Trivigno et al. und Tichy et al., welche in leukämischen Zellen eine Reduktion des Mcl-1-Levels und auf diesem Wege eine Aktivierung der intrinsischen Apoptose nach Bestrahlung zeigten [Czabotar et al., 2007; Trivigno et al., 2012]. LNCaP-Zellen zeigten hingegen ein stabiles Mcl-1-Level nach Bestrahlung. Ein Zusammenhang zwischen Mcl-1-Stabilisierung nach Therapie und einem Therapieversagen wurde bereits für mehrere Tumorentitäten beschrieben [Sieghart et al., 2006; Schwickart et al., 2010]. Das stabilisierte Mcl-1-Level der LNCaP-Zellen könnte demnach für deren Strahlenresistenz verantwortlich sein.

### **4.3 USP9X-vermittelte Mcl-1-Stabilisierung in Prostatakrebszellen**

Über den proteasomalen Abbau kann die zelluläre Mcl-1-Menge transkriptions- und translationsunabhängig schnell reguliert werden. Durch eine Ubiquitinierung wird Mcl-1 für den proteasomalen Abbau markiert. Werden diese Ubiquitine wieder entfernt, kommt es zu einer Stabilisierung von Mcl-1. Durch eine solche Deubiquitinierung kann USP9X Mcl-1 stabilisieren [Schwickart et al., 2010]. Schwickart et al. konnten außerdem zeigen, dass USP9X zu einem verlängerten Tumorzellüberleben führt und bei USP9X-Herunterregulierung die Menge an polyubiquitiniertem Mcl-1 zunahm, was zu einer schnelleren Degradierung und somit zu einem vermehrten Zellsterben führte [Schwickart et al., 2010]. Trivigno et al. zeigten eine Auswirkung der USP9X-Aktivität auf das Überleben von Lymphomzellen durch die Stabilisierung von Mcl-1 sowie eine dadurch vermittelte Strahlenresistenz [Trivigno et al., 2012]. USP9X-Herunterregulierung führte zu einer Reduzierung der Mcl-1-Halbwertszeit bei den radioresistenten Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. In nicht bestrahlten Zellen hat die Herunterregulierung von USP9X keinen signifikanten Einfluss auf das Mcl-1-Proteinlevel und die Mcl-1-Halbwertszeit gezeigt [Trivigno et al., 2012].

Aufgrund der Erkenntnisse in den genannten Publikationen untersuchten wir in dieser Arbeit daher erstmals die Relevanz der Deubiquitinase USP9X für die Mcl-1-Stabilität in Prostatakrebszellen und deren Auswirkung auf eine mögliche Radioresistenz. Im Vergleich zu Jurkat-Zellen, die in der Studie von Trivigno et al. untersucht wurden, konnten wir in den Prostatakrebszellen ein etwas erhöhtes USP9X-Level zeigen (siehe

Abbildung 5). In beiden Zelllinien blieben diese Level nach Bestrahlung konstant (siehe Abbildung 11). Dies wurde von Trivigno et al. auch in Jurkat-Zellen beobachtet, die ebenfalls ein unverändertes USP9X-Level nach Bestrahlung zeigten [Trivigno et al., 2012].

Wir konnten in den Prostatakarzinomzellen LNCaP und PC3 eine verminderte Mcl-1-Menge nach USP9X-Herunterregulierung zeigen (siehe Abbildung 14). Nach Bestrahlung war die Mcl-1-Abnahme sogar stärker ausgeprägt. Höchstwahrscheinlich kam es in diesen Zellen durch USP9X-Herunterregulierung zu einer strahlungsinduzierten Mcl-1-Destabilisierung. Dies könnte darauf hindeuten, dass USP9X in diesen Prostatakrebszellen die Mcl-1-Stabilität beeinflusst und so zu einer Radioresistenz beitragen könnte. Diese Ergebnisse decken sich mit der Erkenntnis der Arbeitsgruppe Schwickart et al. und Trivigno et al., die darstellten, dass eine erhöhte USP9X-Aktivität das Mcl-1-Level stabilisieren und so zu einer Apoptoseresistenz führen kann [Schwickart et al., 2010; Trivigno et al., 2012].

#### **4.4 Vermehrtes Zellsterben und reduzierte Überlebensfraktion nach USP9X-Herunterregulierung in bestrahlten LNCaP- und PC3-Zellen**

Trivigno et al. arbeiteten zusätzlich heraus, dass durch eine Herunterregulierung von USP9X radioresistente Lymphomzellen sensitiviert wurden und dabei eine vermehrte Apoptoseinduktion aufwiesen [Trivigno et al., 2012]. Es zeigten sich nach USP9X-Herunterregulierung in beiden Prostatazelllinien ein erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen, d.h. deren mitochondriales Membranpotential zusammengebrochen ist und deren DNA fragmentiert wurde (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). Nach Bestrahlung wurde der Anteil dieser Zellen zusätzlich noch weiter erhöht (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Deubiquitinase wirkt sich somit protektiv auf das zelluläre Überleben beider Prostatazelllinien aus.

Wir beobachteten auch, dass in beiden Prostatazelllinien die USP9X-Herunterregulation zu einer signifikanten Reduktion der Überlebensfraktion führte. Dieser Effekt zeigte sich bei den LNCaP-Zellen bereits ab einer Dosis von 1 Gy signifikant, bei den PC3-Zellen erst bei einer Dosis von 5 Gy (siehe Abbildung 17). Die Daten zeigen, dass USP9X die Strahlenresistenz in beiden Prostatakarzinomzelllinien vermitteln kann. Der

radiosensibilisierende Effekt der USP9X-Herunterregulierung beruht möglicherweise auf der Destabilisierung von Mcl-1.

Trotz dieses signifikanten Effektes blieben ein großer Teil der Zellen auch nach der Herunterregulierung von USP9X resistent gegenüber der Bestrahlung. Mögliche Gründe für die inkomplette Radiosensibilisierung der Tumorzellen liegen in anderen Mcl-1-stabilisierenden Mechanismen oder in zusätzlichen alternativen Resistenzmechanismen. Beispielsweise könnte auch eine verminderte Aktivität der Ubiquitinligase MULE, die Mcl-1 für die proteasomale Degradierung markieren kann, für die Stabilität von Mcl-1 bedeutend sein. In einer Publikation wurde bereits beschrieben, dass durch Herunterregulierung von MULE der Mcl-1-Abbau geschwächt wurde [Zhong et al., 2005]. Auch könnte die Inaktivierung anderer Ubiquitinligasen, wie SCF<sup>β-Trcp</sup>, SCF<sup>FBW7</sup> und Trim17 nach Bestrahlung ein Grund für eine schlechtere Mcl-1-Degradierung sein [Mojsa et al., 2014]. Es wurde bereits eine Korrelation zwischen der Apoptoserate in hämatologischen Tumoren und der SCF<sup>FBW7</sup>-vermittelten Mcl-1-Degradierung beschrieben [Inuzuka et al., 2011]. Der Verlust der FBW7-Untereinheit der Ubiquitinligase wurde in verschiedenen Malignomen festgestellt [Fernald & Kurokawa, 2013]. Ob in den Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC3 die Ubiquitinierung von Mcl-1 durch eine der genannten Ligasen vermittelt wird und ob eine möglicherweise verminderte Aktivität nach Bestrahlung vorhanden ist, haben wir nicht überprüft. Eine Überprüfung dieser Ubiquitinligasen wäre aber sicherlich interessant.

Auch andere antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder könnten neben Mcl-1 in den Prostatakarzinomzellen eine Radioresistenz vermitteln. Wie wir in Abbildung 11 zeigen konnten, weisen die PC3-Zellen ein sehr hohes Level an Bcl-x<sub>L</sub> und die LNCaP-Zellen ein hohes Level an Bcl-2 auf. Eine mögliche zusätzliche Apoptoseresistenz durch diese Proteine würde erklären, warum die PC3-Zellen trotz abnehmender Mcl-1-Level auf Bestrahlung resistent reagierten und warum es durch die USP9X-Herunterregulierung nicht zu einer Radiosensibilisierung aller Zellen kam. Die Arbeitsgruppe von Anai et al. stellte fest, dass durch die Hemmung der Bcl-2-Expression in PC3-Zellen die Apoptoserate erhöht werden konnte [Anai et al., 2007]. In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass durch die Behandlung der LNCaP- und PC3-Zellen mit dem Bcl-2-Inhibitor HA14-1 die Zellen nach Bestrahlung erhöhte Apoptoseraten aufwiesen [An et al., 2007]. Eine Destabilisierung von Mcl-1 kann aber auch die Wirkung von Bcl-2/Bcl-

x<sub>L</sub>-Antagonisten wie ABT-263 und ABT-737 erhöhen, welche durch hohe Mcl-1-Level wirkungslos sein können [Pandey et al., 2013; Zhang et al., 2011]. In ABT-263- und ABT-737-resistenten Zellen kann es durch eine vermehrte USP9X/Mcl-1-Interaktion zu einer Apoptoseresistenz kommen. Somit könnte eine gleichzeitige Behandlung mit den Bcl2/Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitoren und USP9X-Inhibitoren in diesen Zellen zu einer höheren Apoptoserate führen [Zhang et al., 2011].

#### **4.5 USP9X erhöht Zellsterben in PC3-Zellen unabhängig von Mcl-1-Abundanz**

Wir entdeckten in den PC3-Zellen erhöhte Anteile an Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential und fragmentierter DNA sowie ein vermindertes klonogenes Überleben nach USP9X-Herunterregulierung, obwohl diese Zellen auch in Gegenwart hoher USP9X-Level Mcl-1 nach Bestrahlung deutlich herunterregulierten. Dies könnte auch ein Hinweis auf einen alternativen, Mcl-1-unabhängigen Wirkungsmechanismus der Deubiquitinase USP9X sein. USP9X deubiquitiniert auch mehrere andere Substrate, die Auswirkungen auf das zelluläre Überleben haben. Sie reguliert unter anderem den TGFβ/SMAD4-Signalweg, welcher in fortgeschrittenen Tumoren eine begünstigende Wirkung auf das Zellüberleben haben kann. Im Besonderen in Prostata Tumoren kann es über diesen Signalweg fortgeschrittenen Tumoren ermöglicht werden, in anderes Gewebe zu metastasieren [Zhang et al., 2014]. Träfe die durch USP9X verstärkte Aktivierung des TGFβ/SMAD4-Signalweges auch auf die PC3-Zellen zu, könnte es so durch die Herunterregulierung von USP9X zu einem Rückgang der Überlebensfraktion im Klonogenitätstest gekommen sein. Auch die Rolle weiterer Proteine, die durch USP9X deubiquitiniert und somit stabilisiert werden, wie β-Catenin, Af-6 und Itch, die das zelluläre Überleben und die Proliferation in Tumoren regulieren, bleibt in den LNCaP- und PC3-Zellen unklar [Warr et al., 2005; Quinn et al., 2011]. Eine weitere Publikation hat erst kürzlich gezeigt, dass USP9X die Stabilität von ERG reguliert. Dieses Protein spielt eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese von Prostata Tumoren. Durch die Hemmung von USP9X kam es im Mausmodell zu geringerem Tumorwachstum, da die stabilisierende Wirkung der Deubiquitinierung auf ERG ausfiel [Wang et al., 2014]. Die von Mcl-1 unabhängigen hier genannten USP9X-Interaktionspartner haben wir in den Prostatazelllinien nicht untersucht. Wir können nicht ausschließen, dass durch die

Herunterregulierung von USP9X auch die Stabilität dieser Proteine reguliert und so das zelluläre Überleben der LNCaP- und PC-3-Zellen beeinflusst wird.

Wir konnten also zeigen, dass die Deubiquitinase USP9X besonders in den LNCaP-Zellen von Relevanz für das klonogene Überleben nach Bestrahlung ist und in beiden Zelllinien signifikante Effekte auf das Zellsterben nach Bestrahlung zu finden sind. USP9X trug in beiden Prostatazelllinien zur Stabilisierung des antiapoptotischen Mcl-1-Proteins und somit zu einem verbesserten Zellüberleben und einem reduzierten klonogenen Zelltod nach Bestrahlung bei.

#### **4.6 Bestrahlungsinduzierte Noxa-Hochregulation in PC3-Zellen**

In den PC3-Zellen sank nach Bestrahlung die Mcl-1-Proteinabundanz ab. Gleichzeitig kam es in den PC3-Zellen nach Bestrahlung zu einer Heraufregulierung des BH3-only-Proteins Noxa. Dies wurde in den LNCaP-Zellen nicht beobachtet (siehe Abbildung 11). Es könnte eine Mcl-1-Regulierung durch Noxabindung vermutet werden. Noxa ist ein wichtiges BH3-only-Protein, welches spezifisch mit Mcl-1 aber nicht mit Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> interagiert [Mojsa et al., 2014]. Eine Heraufregulierung von Noxa wurde bereits in anderen Studien als möglicher Mechanismus der Mcl-1-Destabilisierung beschrieben und könnte die Mcl-1-Abnahme nach Bestrahlung in den PC3-Zellen erklären [Nakajima et al., 2014; Czabotar et al., 2007; Wensveen et al., 2011].

Es wurde auch beschrieben, dass Noxa durch eine Herunterregulierung von USP9X die Interaktion von Mcl-1 und USP9X vermindert und somit Mcl-1 vermehrt ubiquitiniert und abgebaut wird [Gomez-Bougie et al., 2011; Mojsa et al., 2014]. Wäre das auch bei den untersuchten Prostatakarzinomzellen der Fall, könnte die Hochregulierung von Noxa in den PC3-Zellen eine mögliche Stabilisierung durch USP9X verringern und dadurch das Mcl-1-Level senken. Eine fehlende Hochregulierung von Noxa in den LNCaP-Zellen und die gleichzeitig stabil bleibende Mcl-1-Menge nach Bestrahlung könnte diese Theorie ebenfalls stützen.

Durch die Heraufregulierung von Noxa könnte in den PC3-Zellen aber auch - durch die direkte Bindung von Noxa an Mcl-1 - die hemmende Bindung von Mcl-1 an Bax und Bak verhindert worden sein, wodurch diese proapoptotischen Proteine aktiviert werden konnten und somit die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert wurde [Chen et al., 2005].

Andererseits zeigten weitere Studien, dass durch Bindung Noxas an Mcl-1 die Bindung der Ubiquitinligase MULE, die ebenfalls über eine BH3-ähnliche Domäne an Mcl-1 bindet, inhibiert wird und somit die Degradierung von Mcl-1 verhindert wird [Warr et al., 2005]. Träfe dies auch für die Interaktion von Noxa mit Mcl-1 in den Prostatazellen zu, könnte diese den Abbau von Mcl-1 verhindern und es somit stabilisieren. Dies wäre aber widersprüchlich zu unserer Beobachtung, dass Noxa in PC3-Zellen heraufreguliert wird, während das Mcl-1-Level sinkt, und macht die Anwendung dieser Theorie auf die PC3-Zellen unwahrscheinlich.

Unklar ist bislang noch das ganze Ausmaß der Rolle, die die BH3-only-Proteine, insbesondere Noxa, im Rahmen der Mcl-1-Stabilisierung und der Apoptose in den hier untersuchten Prostatazellen spielen. In den Prostatazelllinien PC3 könnte Noxa durch die strahlungsinduzierte Heraufregulierung zur schnelleren Degradierung von Mcl-1 führen. Dieses wurde jedoch bisher nicht näher untersucht.

#### **4.7 Mcl-1- und USP9X-Expression in Prostatakarzinompräparaten**

Unsere Untersuchungen an den Prostatazelllinien LNCaP und PC3 haben gezeigt, dass die Zellen hohe Level an Mcl-1 aufweisen, was eventuell die Strahlenresistenz der Zellen erklärt. Insbesondere in den LNCaP-Zellen erfolgt die Stabilisierung von Mcl-1 sehr wahrscheinlich durch USP9X.

Wir untersuchten deshalb den Zusammenhang zwischen der Mcl-1- und USP9X-Abundanz auch in in-vivo Präparaten. Die verwendeten Prostatapräparate zeigten je nach Gleason-Score unterschiedliche Abundanzen von Mcl-1 und USP9X. Wir stellten fest, dass alle Proben USP9X und Mcl-1 aufwiesen, wobei die Mengen stark variierten (siehe Abbildung 18).

Dabei entdeckten wir, dass das Mcl-1-Proteinlevel in den hoch malignen und metastasierenden Prostataprobe öfters erhöht war als in den nicht malignen und niedrig malignen Proben. Ein solcher Zusammenhang konnte für USP9X nicht nachgewiesen werden.

Die Mcl-1-Abundanzen stiegen also tendenziell mit Zunahme der Malignität der Proben an. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Krajewska et al., die Adenokarzinome der Prostata untersuchten und in 52 von 64 (81%) der malignen Tumoren Mcl-1-Expression aufweisen konnten. Dagegen wurden in nur 9 von 24 (38%)

der intraepithelialen Neoplasien, einer Vorstufe des Prostatakarzinoms, eine Mcl-1-Expression gefunden [Krajewska et al., 1996]. Die Ergebnisse sind nicht vollständig vergleichbar, da die Arbeitsgruppe Krajewska et al. die Proben dahingehend untersuchten, ob Mcl-1 zu detektieren ist. Unsere Proben zeigten fast alle eine Mcl-1-Abundanz und wir untersuchten, ob Mcl-1 in erhöhten Mengen vorhanden war. Die Schwierigkeit dabei liegt in der Definition einer erhöhten Mcl-1-Menge.

Es wäre auch die Erforschung von Mcl-1 speziell in als radioresistent eingestuften Tumoren von besonderem Interesse, wobei die Beschaffung einer ausreichenden Probenanzahl mit einem hohen Aufwand verbunden wäre.

Eine Zunahme des Anteils der Proben mit erhöhten USP9X-Mengen mit Zunahme des Malignitätsgrades konnten wir in den von uns untersuchten Proben nicht sehen. Eine Korrelation zwischen erhöhten USP9X-Werten und fortgeschrittenem Tumorstadium wurde dagegen in einer anderen Studie gezeigt. Die Arbeitsgruppe Peng et al. untersuchte Proben von 109 Fällen maligner Ösophagustumoren immunhistochemisch auf ihre USP9X-Expression. Dabei wiesen nur 4% der Proben nicht malignen Epithels erhöhte USP9X-Werte auf. In niedriggradigen Neoplasien betrug dieser Anteil 10,5%, in hochgradigen 28,6% und in invasiven Karzinomen ungefähr 40%. Festgestellt wurde, dass mit steigender Malignität auch die Rate der Gewebe mit hohen USP9X-Level stieg [Peng et al., 2013]. Aufgrund der unterschiedlichen Tumorentität sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt mit den unseren zu vergleichen. Ein weiterer Unterschied liegt einerseits in der höheren Probenanzahl und den unterschiedlichen Methoden, mit Hilfe derer eine erhöhte Expression von USP9X ermittelt wurde. Peng et al. nutzten die Immunhistochemie zur Analyse erhöhter USP9X-Expressionen, während wir die Proteinlevel per Western-Blotting-Methode untersuchten. Die Mcl-1- und USP9X-Level von Prostataprobe sollten zudem anhand einer höheren Probenanzahl untersucht werden, um eine eindeutige Korrelation der Proteinabundanzen mit der Malignität erforschen zu können.

## 4.8 Ausblick

Die Regulierung des Mcl-1-Levels durch USP9X kann in manchen Tumoren eine Strahlenresistenz vermitteln. In hämatologischen Tumorzellen konnten die Arbeitsgruppen Schwickart et al. und Trivigno et al. eine USP9X-vermittelte Apoptoseresistenz zeigen. Wir konnten in den soliden Prostatazelllinien LNCaP und PC3 eine USP9X-vermittelte Strahlenresistenz zeigen, die höchstwahrscheinlich mit der Stabilisierung von Mcl-1 zusammenhängt. Die Inhibierung von USP9X könnte in diesen Tumoren zu verbessertem Ansprechen auf Bestrahlung führen. Leider wurden bisher keine USP9X-spezifischen Inhibitoren generiert. Die Entwicklung eines solchen Wirkstoffes könnte dazu führen, dass die Tumoren, die eine Resistenz auf Strahlentherapie aufgrund eines durch USP9X stabilisierten Mcl-1-Levels haben, besser auf Chemo- und Strahlentherapie ansprechen. Durch die individuelle Testung der Tumoren auf mögliche Resistenzmechanismen könnte die Tumorthherapie an den einzelnen Fall angepasst werden. Neben Mcl-1 kann USP9X auch die Stabilität andere Proteine beeinflussen, deren Auswirkungen auf das Überleben von Prostata Tumoren aber noch unvollständig bekannt sind und erforscht werden sollten. Möglicherweise erklären diese Proteine eine USP9X-vermittelte Strahlenresistenz unabhängig von Mcl-1 [Zhang et al., 2014].

Weiter müsste auch die Auswirkung der Noxa-Aktivität auf das Mcl-1-Level in Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Wir haben gezeigt, dass Noxa nach Bestrahlung in PC3-Zellen hochreguliert wird. Dies könnte die Ursache für die Abnahme von Mcl-1 nach Bestrahlung in diesen Zellen sein. Noxa könnte in nachfolgenden Versuchen in beiden Zelllinien hochreguliert oder durch spezifische siRNA herunterreguliert werden, um mögliche Effekte auf die Mcl-1-Stabilität zu erforschen. Versuche, mit BH3-Mimetika die Wirkung der BH3-only-Proteine näher zu erforschen, sollten auch speziell im Hinblick auf eine mögliche Wirkung auf die Mcl-1-Stabilität erweitert werden. Bisher wurde ein spezifisches Noxa-BH3-Mimetikum noch nicht entwickelt.

Weiterhin sollte USP9X in in-vivo-Präparaten der Prostata in einer größeren Probenanzahl mittels einer weiteren Methode, der Immunhistochemie, näher untersucht werden. Frühere Publikationen haben gezeigt, dass die USP9X-Mengen in manchen

Tumoren mit dem Malignitätsgrad einhergehen kann [Peng et al., 2013]. Dies könnte auch anhand der Genexpression in Prostatatumoren untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Antiapoptotische Bcl-2-Proteine sind bedeutend in der Tumorentstehung und in der Entwicklung von Therapieresistenzen. Das antiapoptotische Mcl-1 spielt in vielen Tumoren eine wichtige Rolle dabei. Die Regulierung des Mcl-1-Levels durch proteasomale Degradierung ist bedeutend für dessen schnellen Umsatz. Mcl-1 ist im Vergleich zu den anderen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen ein kurzlebige Protein, dessen Level nach Hemmung der Translation schnell abnimmt [Huber et al., 2011]. Andere Studien verdeutlichten, dass Mcl-1 durch die Deubiquitinase USP9X, die den proteasomalen Abbau des antiapoptotischen Proteins verhindert, stabilisiert wurde. In den untersuchten Zellen kam es durch die Herunterregulierung von USP9X zu vermehrtem Zellsterben [Schwickart et al., 2010; Trivigno et al., 2012].

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Rolle von USP9X für die Mcl-1-Stabilität und die Entwicklung von Radioresistenzen in Prostatakrebszellen zu untersuchen. In den zwei etablierten Prostatazelllinien LNCaP und PC3 wurden die Level verschiedener Proteine der Bcl-2-Familie und der Deubiquitinase USP9X, die Initiierung der Apoptose und das klonogene Überleben nach Bestrahlung analysiert. Durch Herunterregulierung von USP9X mittels siRNA erforschten wir die Auswirkung der Deubiquitinase auf die Mcl-1-Stabilität sowie die Apoptoseinduktion und das klonogene Überleben nach Bestrahlung. Der Zusammenhang zwischen dem Mcl-1-Level und dem USP9X-Level wurde auch an Prostataproben von Patienten untersucht.

Die Messung der Apoptose anhand der Caspaseaktivität, der DNA-Fragmentierung und des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung ergab, dass die untersuchten Zelllinien LNCaP und PC3 nach der Behandlung nur gering Apoptose induzieren. Es handelt sich also bei diesen Zelllinien um radioresistente Zellen. Auch wiesen beide Zelllinien ein relativ hohes klonogenes Überleben auf. Dies könnte für die Entstehung von Rezidiven bedeutend sein.

Weiterhin wiesen beide Zelllinien erhöhte Mcl-1- und USP9X-Proteinmengen auf. Die Mcl-1-Abundanz erwies sich in den LNCaP-Zellen nach Bestrahlung als stabil, während sie in den PC3-Zellen abnahm. Durch die Herunterregulierung von USP9X durch siRNA beobachteten wir eine Abnahme des Mcl-1-Levels in beiden Zelllinien. Dies deutet auf eine USP9X-vermittelte Mcl-1-Stabilisierung in diesen Prostatazellen hin. Beide Zelllinien zeigten nach USP9X-Herunterregulierung eine Erhöhung des Anteils

an Zellen mit zusammengebrochenem mitochondrialen Membranpotential sowie fragmentierter DNA. Auch kam es durch USP9X-Herunterregulierung zu einer Verminderung des klonogenen Überlebens beider Zelllinien, welche in den LNCaP-Zellen bereits bei sehr geringen Dosen signifikant war.

Wir schlossen aus den Ergebnissen, dass USP9X ein möglicher Resistenzfaktor gegenüber strahlungsinduziertem Zelltod in Prostatakrebszellen sein könnte. Ebenso erkannten wir einen Zusammenhang zwischen USP9X-Herunterregulierung und der Mcl-1-Proteinmenge. Sehr wahrscheinlich führen hohe USP9X-Level in LNCaP-Zellen zu einer verminderten Mcl-1-Degradierung nach Bestrahlung und somit zu einer Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins und besserem Überleben von bestrahlten LNCaP-Zellen. Die PC3-Zellen reagierten durch die USP9X-Herunterregulierung ebenfalls sensitiver auf die Radiotherapie. Sie zeigten aber nach Bestrahlung bereits einen Abfall der Mcl-1-Mengen, der unabhängig von USP9X war, jedoch durch Herunterregulierung von USP9X verstärkt wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mcl-1-Stabilität nach Bestrahlung von PC3-Zellen nicht nur durch USP9X sondern auch durch weitere Faktoren reguliert wird.

Schließlich konnte in Prostataproben von Patienten gezeigt werden, dass einerseits der Anteil der Proben mit erhöhten Mcl-1-Mengen mit dem Malignitätsgrad anstieg, und andererseits in den meisten Fällen, in denen das Mcl-1-Level erhöht war, gleichzeitig auch das USP9x-Level erhöht war.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass USP9X ein Faktor ist, der die Strahlensensitivität in Prostatatumoren regulieren kann.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, JM, Cory, S (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene* (Band 26), Nr. 9, S. 1324-37. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322918>.
- Akagi, H, Higuchi, H, Sumimoto, H, Igarashi, T, Kabashima, A, Mizuguchi, H, Izumiya, M, Sakai, G, Adachi, M, Funakoshi, S, Nakamura, S, Hamamoto, Y, Kanai, T, Takaishi, H, Kawakami, Y, Hibi, T (2013): Suppression of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) enhances chemotherapy-associated apoptosis in gastric cancer cells, *Gastric Cancer* (Band 16), Nr. 1, S. 100-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22527182>.
- Akakura, K, Suzuki, H, Ichikawa, T, Fujimoto, H, Maeda, O, Usami, M, Hirano, D, Takimoto, Y, Kamoto, T, Ogawa, O, Sumiyoshi, Y, Shimazaki, J, Kakizoe, T, Japanese Study Group for Locally Advanced Prostate, C (2006): A randomized trial comparing radical prostatectomy plus endocrine therapy versus external beam radiotherapy plus endocrine therapy for locally advanced prostate cancer: results at median follow-up of 102 months, *Jpn J Clin Oncol* (Band 36), Nr. 12, S. 789-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082219>.
- Albershardt, TC, Salerni, BL, Soderquist, RS, Bates, DJ, Pletnev, AA, Kisselev, AF, Eastman, A (2011): Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA, *J Biol Chem* (Band 286), Nr. 28, S. 24882-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628457>.
- An, J, Chervin, AS, Nie, A, Ducoff, HS, Huang, Z (2007): Overcoming the radioresistance of prostate cancer cells with a novel Bcl-2 inhibitor, *Oncogene* (Band 26), Nr. 5, S. 652-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909121>.
- Anai, S, Goodison, S, Shiverick, K, Hirao, Y, Brown, BD, Rosser, CJ (2007): Knock-down of Bcl-2 by antisense oligodeoxynucleotides induces radiosensitization and inhibition of angiogenesis in human PC-3 prostate tumor xenografts, *Mol Cancer Ther* (Band 6), Nr. 1, S. 101-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237270>.
- Aslan, JE, Thomas, G (2009): Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis, *Traffic* (Band 10), Nr. 10, S. 1390-404. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566895>.
- Belka, C, Jendrossek, V, Pruschy, M, Vink, S, Verheij, M, Budach, W (2004): Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 58), Nr. 2, S. 542-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751526>.
- Belloc, F, Dumain, P, Boisseau, MR, Jalloustre, C, Reiffers, J, Bernard, P, Lacombe, F (1994): A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells, *Cytometry* (Band 17), Nr. 1, S. 59-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528124>.

- Bergman, PJ, Harris, D (1997): Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future, *Vet Clin North Am Small Anim Pract* (Band 27), Nr. 1, S. 47-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002166>.
- Boiani, M, Daniel, C, Liu, X, Hogarty, MD, Marnett, LJ (2013): The stress protein BAG3 stabilizes Mcl-1 protein and promotes survival of cancer cells and resistance to antagonist ABT-737, *J Biol Chem* (Band 288), Nr. 10, S. 6980-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341456>.
- Catalona, WJ, Smith, DS, Ratliff, TL, Dodds, KM, Coplen, DE, Yuan, JJ, Petros, JA, Andriole, GL (1991): Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer, *N Engl J Med* (Band 324), Nr. 17, S. 1156-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707140>.
- Chen, L, Willis, SN, Wei, A, Smith, BJ, Fletcher, JI, Hinds, MG, Colman, PM, Day, CL, Adams, JM, Huang, DC (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Mol Cell* (Band 17), Nr. 3, S. 393-403. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694340>.
- Chowdhury, I, Tharakan, B, Bhat, GK (2006): Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited, *Cell Mol Biol Lett* (Band 11), Nr. 4, S. 506-25. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16977376>.
- Ciechanover, A, Heller, H, Elias, S, Haas, AL, Hershko, A (1980): ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 77), Nr. 3, S. 1365-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6769112>.
- Corvo, R (1996): [Antioncogene p53 and apoptosis response: new hypotheses on the molecular bases of tumor resistance to radiotherapy], *Radiol Med* (Band 92), Nr. 3, S. 298-302. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8975319>.
- Cotter, TG (2009): Apoptosis and cancer: the genesis of a research field, *Nat Rev Cancer* (Band 9), Nr. 7, S. 501-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19550425>.
- Craig, RW (2002): MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis, *Leukemia* (Band 16), Nr. 4, S. 444-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960321>.
- Czabotar, PE, Lee, EF, van Delft, MF, Day, CL, Smith, BJ, Huang, DC, Fairlie, WD, Hinds, MG, Colman, PM (2007): Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 15, S. 6217-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389404>.
- D'Amico, AV, Chen, MH, Renshaw, AA, Loffredo, M, Kantoff, PW (2008): Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: a randomized trial, *JAMA* (Band 299), Nr. 3, S. 289-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212313>.
- Deng, Q, Huang, CM, Chen, N, Li, L, Wang, XD, Zhang, W, Bi, F, Tang, QL, Li, ZP, Wang, W (2012): Chemotherapy and radiotherapy downregulate the activity and expression of DNA methyltransferase and enhance Bcl-2/E1B-19-kDa interacting protein-3-induced apoptosis in human colorectal cancer cells, *Chemotherapy* (Band 58), Nr. 6, S. 445-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364257>.

- Deng, X, Gao, F, Flagg, T, May, WS, Jr. (2004): Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 1, S. 153-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660795>.
- Dimri, GP, Lee, X, Basile, G, Acosta, M, Scott, G, Roskelley, C, Medrano, EE, Linskens, M, Rubelj, I, Pereira-Smith, O, et al. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 20, S. 9363-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568133>.
- Ding, Q, He, X, Hsu, JM, Xia, W, Chen, CT, Li, LY, Lee, DF, Liu, JC, Zhong, Q, Wang, X, Hung, MC (2007): Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization, *Mol Cell Biol* (Band 27), Nr. 11, S. 4006-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387146>.
- Domina, AM, Vrana, JA, Gregory, MA, Hann, SR, Craig, RW (2004): MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol, *Oncogene* (Band 23), Nr. 31, S. 5301-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241487>.
- Dreizen, S, Daly, TE, Drane, JB, Brown, LR (1977): Oral complications of cancer radiotherapy, *Postgrad Med* (Band 61), Nr. 2, S. 85-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/834698>.
- Ferlay, J, Steliarova-Foucher, E, Lortet-Tieulent, J, Rosso, S, Coebergh, JW, Comber, H, Forman, D, Bray, F (2013): Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *Eur J Cancer* (Band 49), Nr. 6, S. 1374-403. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485231>.
- Fernald, K, Kurokawa, M (2013): Evading apoptosis in cancer, *Trends Cell Biol* (Band 23), Nr. 12, S. 620-33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23958396>.
- Fujie, Y, Yamamoto, H, Ngan, CY, Takagi, A, Hayashi, T, Suzuki, R, Ezumi, K, Takemasa, I, Ikeda, M, Sekimoto, M, Matsuura, N, Monden, M (2005): Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells, *Jpn J Clin Oncol* (Band 35), Nr. 8, S. 453-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024531>.
- Ghotra, VP, Geldof, AA, Danen, EH (2013): Targeted radiosensitization in prostate cancer, *Curr Pharm Des* (Band 19), Nr. 15, S. 2819-28. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23448469>.
- Gleason, DF (1966): Classification of prostatic carcinomas, *Cancer Chemother Rep* (Band 50), Nr. 3, S. 125-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5948714>.
- Gomez-Bougie, P, Menoret, E, Juin, P, Dousset, C, Pellat-Deceunynck, C, Amiot, M (2011): Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 413), Nr. 3, S. 460-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907705>.
- Green, DR, Evan, GI (2002): A matter of life and death, *Cancer Cell* (Band 1), Nr. 1, S. 19-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086884>.

- Gross, A, McDonnell, JM, Korsmeyer, SJ (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev* (Band 13), Nr. 15, S. 1899-911. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444588>.
- Hanahan, D, Weinberg, RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* (Band 144), Nr. 5, S. 646-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>.
- Hayflick, L, Moorhead, PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res* (Band 25), S. 585-621. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13905658>.
- Heiduschka, G, Erovic, BM, Pammer, J, Kotowski, U, Kaider, A, Ch Grasl, M, Thurnher, D (2011): Mcl-1 expression is up-regulated in malignancies of the parotid gland, *Dis Markers* (Band 30), Nr. 5, S. 229-33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734342>.
- Hermanson, DL, Das, SG, Li, Y, Xing, C (2013): Overexpression of Mcl-1 confers multidrug resistance, whereas topoisomerase IIbeta downregulation introduces mitoxantrone-specific drug resistance in acute myeloid leukemia, *Mol Pharmacol* (Band 84), Nr. 2, S. 236-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696245>.
- Hershko, A, Ciechanover, A, Heller, H, Haas, AL, Rose, IA (1980): Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 77), Nr. 4, S. 1783-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6990414>.
- Horoszewicz, JS, Leong, SS, Chu, TM, Wajsman, ZL, Friedman, M, Papsidero, L, Kim, U, Chai, LS, Kakati, S, Arya, SK, Sandberg, AA (1980): The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma, *Prog Clin Biol Res* (Band 37), S. 115-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7384082>.
- Horoszewicz, JS, Leong, SS, Kawinski, E, Karr, JP, Rosenthal, H, Chu, TM, Mirand, EA, Murphy, GP (1983): LNCaP model of human prostatic carcinoma, *Cancer Res* (Band 43), Nr. 4, S. 1809-18. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6831420>.
- Huber, S, Oelsner, M, Decker, T, zum Buschenfelde, CM, Wagner, M, Lutzny, G, Kuhnt, T, Schmidt, B, Oostendorp, RA, Peschel, C, Ringshausen, I (2011): Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1, *Leukemia* (Band 25), Nr. 5, S. 838-47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21293487>.
- Hussain, SR, Cheney, CM, Johnson, AJ, Lin, TS, Grever, MR, Caligiuri, MA, Lucas, DM, Byrd, JC (2007): Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity, *Clin Cancer Res* (Band 13), Nr. 7, S. 2144-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404098>.
- Inuzuka, H, Shaik, S, Onoyama, I, Gao, D, Tseng, A, Maser, RS, Zhai, B, Wan, L, Gutierrez, A, Lau, AW, Xiao, Y, Christie, AL, Aster, J, Settleman, J, Gygi, SP, Kung, AL, Look, T, Nakayama, KI, DePinho, RA, Wei, W (2011): SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction, *Nature* (Band 471), Nr. 7336, S. 104-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368833>.

- Kaighn, ME, Narayan, KS, Ohnuki, Y, Lechner, JF, Jones, LW (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Invest Urol* (Band 17), Nr. 1, S. 16-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/447482>.
- Kepp, O, Tesniere, A, Schlemmer, F, Michaud, M, Senovilla, L, Zitvogel, L, Kroemer, G (2009): Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment, *Apoptosis* (Band 14), Nr. 4, S. 364-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145485>.
- Kerr, JF, Wyllie, AH, Currie, AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, S. 239-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>.
- Kim, H, Rafiuddin-Shah, M, Tu, HC, Jeffers, JR, Zambetti, GP, Hsieh, JJ, Cheng, EH (2006): Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies, *Nat Cell Biol* (Band 8), Nr. 12, S. 1348-58. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115033>.
- Kong, Y, Cui, H, Ramkumar, C, Zhang, H (2011): Regulation of senescence in cancer and aging, *J Aging Res* (Band 2011), S. 963172. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423549>.
- Koukourakis, G, Kelekis, N, Armonis, V, Kouloulis, V (2009): Brachytherapy for prostate cancer: a systematic review, *Adv Urol*, S. 327945. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19730753>.
- Kozopas, KM, Yang, T, Buchan, HL, Zhou, P, Craig, RW (1993): MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 8, S. 3516-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682708>.
- Krajewska, M, Krajewski, S, Epstein, JI, Shabaik, A, Sauvageot, J, Song, K, Kitada, S, Reed, JC (1996): Immunohistochemical analysis of bcl-2, Bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers, *Am J Pathol* (Band 148), Nr. 5, S. 1567-76. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8623925>.
- Lamers, F, van der Ploeg, I, Schild, L, Ebus, ME, Koster, J, Hansen, BR, Koch, T, Versteeg, R, Caron, HN, Molenaar, JJ (2011): Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe, *Endocr Relat Cancer* (Band 18), Nr. 6, S. 657-68. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859926>.
- Levine, B, Klionsky, DJ (2004): Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Dev Cell* (Band 6), Nr. 4, S. 463-77. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068787>.
- Li, P, Nijhawan, D, Budihardjo, I, Srinivasula, SM, Ahmad, M, Alnemri, ES, Wang, X (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* (Band 91), Nr. 4, S. 479-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390557>.
- Liang, XH, Jackson, S, Seaman, M, Brown, K, Kempkes, B, Hibshoosh, H, Levine, B (1999): Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature* (Band 402), Nr. 6762, S. 672-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604474>.
- Lomonosova, E, Chinnadurai, G (2008): BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview, *Oncogene* (Band 27 Suppl 1), S. S2-19. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641503>.

- Maurer, U, Charvet, C, Wagman, AS, Dejardin, E, Green, DR (2006): Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1, *Mol Cell* (Band 21), Nr. 6, S. 749-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543145>.
- McCall, K (2010): Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death, *Curr Opin Cell Biol* (Band 22), Nr. 6, S. 882-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889324>.
- McKenzie, S, Kyprianou, N (2006): Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance, *J Cell Biochem* (Band 97), Nr. 1, S. 18-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216007>.
- Mojsa, B, Lassot, I, Desagher, S (2014): Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein, *Cells* (Band 3), Nr. 2, S. 418-37. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814761>.
- Morris, DE, Emami, B, Mauch, PM, Konski, AA, Tao, ML, Ng, AK, Klein, EA, Mohideen, N, Hurwitz, MD, Fraas, BA, Roach, M, 3rd, Gore, EM, Tepper, JE (2005): Evidence-based review of three-dimensional conformal radiotherapy for localized prostate cancer: an ASTRO outcomes initiative, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 62), Nr. 1, S. 3-19. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15850897>.
- Mott, JL, Kobayashi, S, Bronk, SF, Gores, GJ (2007): mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis, *Oncogene* (Band 26), Nr. 42, S. 6133-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404574>.
- Nakajima, W, Hicks, MA, Tanaka, N, Krystal, GW, Harada, H (2014): Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer, *Cell Death Dis* (Band 5), S. e1052. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525728>.
- Nguyen, M, Marcellus, RC, Roulston, A, Watson, M, Serfass, L, Murthy Madiraju, SR, Goulet, D, Viallet, J, Belec, L, Billot, X, Acoca, S, Purisima, E, Wiegmanns, A, Cluse, L, Johnstone, RW, Beuparlant, P, Shore, GC (2007): Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 49, S. 19512-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18040043>.
- Nicholson, DW, Thornberry, NA (1997): Caspases: killer proteases, *Trends Biochem Sci* (Band 22), Nr. 8, S. 299-306. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9270303>.
- Nicoletti, I, Migliorati, G, Pagliacci, MC, Grignani, F, Riccardi, C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J Immunol Methods* (Band 139), Nr. 2, S. 271-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710634>.
- Okada, H, Mak, TW (2004): Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells, *Nat Rev Cancer* (Band 4), Nr. 8, S. 592-603. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286739>.
- Palacios, DA, Miyake, M, Rosser, CJ (2013): Radiosensitization in prostate cancer: mechanisms and targets, *BMC Urol* (Band 13), Nr. 1, S. 4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23351141>.
- Pandey, MK, Gowda, K, Doi, K, Sharma, AK, Wang, HG, Amin, S (2013): Proteasomal Degradation of Mcl-1 by Maritoclax Induces Apoptosis and

- Enhances the Efficacy of ABT-737 in Melanoma Cells, *PLoS One* (Band 8), Nr. 11, S. e78570. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24223823>.
- Peng, J, Hu, Q, Liu, W, He, X, Cui, L, Chen, X, Yang, M, Liu, H, Wei, W, Liu, S, Wang, H (2013): USP9X expression correlates with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma, *Diagn Pathol* (Band 8), Nr. 1, S. 177. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152793>.
- Perry, SW, Norman, JP, Litzburg, A, Zhang, D, Dewhurst, S, Gelbard, HA (2005): HIV-1 transactivator of transcription protein induces mitochondrial hyperpolarization and synaptic stress leading to apoptosis, *J Immunol* (Band 174), Nr. 7, S. 4333-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778398>.
- Quinn, BA, Dash, R, Azab, B, Sarkar, S, Das, SK, Kumar, S, Oyesanya, RA, Dasgupta, S, Dent, P, Grant, S, Rahmani, M, Curiel, DT, Dmitriev, I, Hedvat, M, Wei, J, Wu, B, Stebbins, JL, Reed, JC, Pellecchia, M, Sarkar, D, Fisher, PB (2011): Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer, *Expert Opin Investig Drugs* (Band 20), Nr. 10, S. 1397-411. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851287>.
- Robert Koch Institut (Hrsg) RK-IHudGdeKiDeV (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008 (Band 8. Ausgabe).
- Reed, JC, Cuddy, M, Slabiak, T, Croce, CM, Nowell, PC (1988): Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer, *Nature* (Band 336), Nr. 6196, S. 259-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848196>.
- Riedl, SJ, Fuentes-Prior, P, Renatus, M, Kairies, N, Krapp, S, Huber, R, Salvesen, GS, Bode, W (2001): Structural basis for the activation of human procaspase-7, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 26, S. 14790-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752425>.
- Rudner, J, Belka, C, Marini, P, Wagner, RJ, Faltin, H, Lepple-Wienhues, A, Bamberg, M, Budach, W (2001): Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells, *Int J Radiat Biol* (Band 77), Nr. 1, S. 1-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11213341>.
- Rudner, J, Elsaesser, SJ, Jendrossek, V, Huber, SM (2011): Anti-apoptotic Bcl-2 fails to form efficient complexes with pro-apoptotic Bak to protect from Celecoxib-induced apoptosis, *Biochem Pharmacol* (Band 81), Nr. 1, S. 32-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20836993>.
- Rudner, J, Jendrossek, V, Lauber, K, Daniel, PT, Wesselborg, S, Belka, C (2005): Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies, *Oncogene* (Band 24), Nr. 1, S. 130-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531922>.
- Sacco, JJ, Coulson, JM, Clague, MJ, Urbe, S (2010): Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways, *IUBMB Life* (Band 62), Nr. 2, S. 140-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20073038>.
- Schroder, FH, Hermanek, P, Denis, L, Fair, WR, Gospodarowicz, MK, Pavone-Macaluso, M (1992): The TNM classification of prostate cancer, *Prostate Suppl* (Band 4), S. 129-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574453>.
- Schwickart, M, Huang, X, Lill, JR, Liu, J, Ferrando, R, French, DM, Maecker, H, O'Rourke, K, Bazan, F, Eastham-Anderson, J, Yue, P, Dornan, D, Huang, DC, Dixit, VM (2010): Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival, *Nature* (Band 463), Nr. 7277, S. 103-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023629>.

- Sellers, AH (1973): [The TNM system of classification of malignant tumors], *Vie Med Can Fr* (Band 2), Nr. 10, S. 940-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4761490>.
- Shintani, T, Klionsky, DJ (2004): Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science* (Band 306), Nr. 5698, S. 990-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528435>.
- Sieghart, W, Losert, D, Strommer, S, Cejka, D, Schmid, K, Rasoul-Rockenschaub, S, Bodingbauer, M, Crevenna, R, Monia, BP, Peck-Radosavljevic, M, Wacheck, V (2006): Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy, *J Hepatol* (Band 44), Nr. 1, S. 151-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289418>.
- Skvara, H, Thallinger, C, Wacheck, V, Monia, BP, Pehamberger, H, Jansen, B, Selzer, E (2005): Mcl-1 blocks radiation-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death, *Anticancer Res* (Band 25), Nr. 4, S. 2697-703. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080514>.
- Streffer, JR, Rimner, A, Rieger, J, Naumann, U, Rodemann, HP, Weller, M (2002): BCL-2 family proteins modulate radiosensitivity in human malignant glioma cells, *J Neurooncol* (Band 56), Nr. 1, S. 43-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949826>.
- Subramaniam, D, Natarajan, G, Ramalingam, S, Ramachandran, I, May, R, Queimado, L, Houchen, CW, Anant, S (2008): Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Band 294), Nr. 4, S. G1025-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292181>.
- Swindle, P, Eastham, JA, Ohori, M, Kattan, MW, Wheeler, T, Maru, N, Slawin, K, Scardino, PT (2005): Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens, *J Urol* (Band 174), Nr. 3, S. 903-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093984>.
- Tai, S, Sun, Y, Squires, JM, Zhang, H, Oh, WK, Liang, CZ, Huang, J (2011): PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma, *Prostate* (Band 71), Nr. 15, S. 1668-79. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21432867>.
- Tait, SW, Green, DR (2010): Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 9, S. 621-32. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683470>.
- Trivigno, D, Essmann, F, Huber, SM, Rudner, J (2012): Deubiquitinase USP9x confers radioresistance through stabilization of Mcl-1, *Neoplasia* (Band 14), Nr. 10, S. 893-904. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097624>.
- Umekita, Y, Hiipakka, RA, Kokontis, JM, Liao, S (1996): Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 21, S. 11802-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876218>.
- Uzzo, RG, Haas, NB, Crispen, PL, Kolenko, VM (2008): Mechanisms of apoptosis resistance and treatment strategies to overcome them in hormone-refractory prostate cancer, *Cancer* (Band 112), Nr. 8, S. 1660-71. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18278811>.
- Vucic, D, Dixit, VM, Wertz, IE (2011): Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 12), Nr. 7, S. 439-52. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697901>.

- Wang, C, Youle, RJ (2012): Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak, *Oncogene* (Band 31), Nr. 26, S. 3177-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056880>.
- Wang, H, Dong, L, Lii, MF, Lee, AL, de Crevoisier, R, Mohan, R, Cox, JD, Kuban, DA, Cheung, R (2005): Implementation and validation of a three-dimensional deformable registration algorithm for targeted prostate cancer radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 61), Nr. 3, S. 725-35. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708250>.
- Wang, K, Yin, XM, Chao, DT, Milliman, CL, Korsmeyer, SJ (1996): BID: a novel BH3 domain-only death agonist, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 22, S. 2859-69. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918887>.
- Wang, S, Kollipara, RK, Srivastava, N, Li, R, Ravindranathan, P, Hernandez, E, Freeman, E, Humphries, CG, Kapur, P, Lotan, Y, Fazli, L, Gleave, ME, Plymate, SR, Raj, GV, Hsieh, JT, Kittler, R (2014): Ablation of the oncogenic transcription factor ERG by deubiquitinase inhibition in prostate cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 111), Nr. 11, S. 4251-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591637>.
- Wang, X, Studzinski, GP (1997): Antiapoptotic action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 is associated with increased mitochondrial MCL-1 and RAF-1 proteins and reduced release of cytochrome c, *Exp Cell Res* (Band 235), Nr. 1, S. 210-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9281370>.
- Warr, MR, Acoca, S, Liu, Z, Germain, M, Watson, M, Blanchette, M, Wing, SS, Shore, GC (2005): BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase, *FEBS Lett* (Band 579), Nr. 25, S. 5603-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213503>.
- Wensveen, FM, Alves, NL, Derks, IA, Reedquist, KA, Eldering, E (2011): Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1, *Apoptosis* (Band 16), Nr. 7, S. 708-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516346>.
- Wilkinson, KD (1997): Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes, *FASEB J* (Band 11), Nr. 14, S. 1245-56. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409543>.
- Yang, T, Kozopas, KM, Craig, RW (1995): The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2, *J Cell Biol* (Band 128), Nr. 6, S. 1173-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896880>.
- Yip, KW, Reed, JC (2008): Bcl-2 family proteins and cancer, *Oncogene* (Band 27), Nr. 50, S. 6398-406. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955968>.
- Youle, RJ, Strasser, A (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 1, S. 47-59. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097445>.
- Yuan, Z, Cao, K, Lin, C, Li, L, Liu, HY, Zhao, XY, Liu, L, Deng, HX, Li, J, Nie, CL, Wei, YQ (2011): The p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) chemosensitizes intrinsically resistant ovarian cancer cells to cisplatin by lowering the threshold set by Bcl-x(L) and Mcl-1, *Mol Med* (Band 17), Nr. 11-12, S. 1262-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21863213>.
- Zhang, C, Cai, TY, Zhu, H, Yang, LQ, Jiang, H, Dong, XW, Hu, YZ, Lin, NM, He, QJ, Yang, B (2011): Synergistic antitumor activity of gemcitabine and ABT-737 in

- vitro and in vivo through disrupting the interaction of USP9X and Mcl-1, *Mol Cancer Ther* (Band 10), Nr. 7, S. 1264-75. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566062>.
- Zhang, J, Zhang, X, Xie, F, Zhang, Z, van Dam, H, Zhang, L, Zhou, F (2014): The regulation of TGF-beta/SMAD signaling by protein deubiquitination, *Protein Cell* (Band 5), Nr. 7, S. 503-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24756567>.
- Zhong, Q, Gao, W, Du, F, Wang, X (2005): Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis, *Cell* (Band 121), Nr. 7, S. 1085-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989957>.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Ich habe die Versuche angesetzt und durchgeführt, die in den Abbildungen 5,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17 und 18 dargestellt sind. Methodisch handelte es sich hier um Western-Blots, durchflusszytometrische Messungen und Koloniebildungstests. Ich habe nach der Durchführung der Western-Blots die auf den Fotofilmen abgebildeten Ergebnisse digitalisiert und bearbeitet. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden von mir ausgewertet und von Fr. Dr. Rudner überprüft.

Die Versuche, die in den Abbildungen 6 und 8 dargestellt sind, wurden von Fr. Dr. Rudner und mir gemeinsam durchgeführt. Fr. Dr. Rudner hat die Studie konzipiert, hat die Arbeit zu Beginn betreut und die Dissertation korrigiert. Herr Prof. Huber war an der Konzeption der Studie beteiligt und hat die Arbeit betreut.

## 8 Danksagung

Prof. Dr. Daniel Zips, dem ärztlichen Direktor der Klinik für Radioonkologie Tübingen, möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung danken. Herrn Prof. Dr. Stephan Huber möchte ich herzlichst danken für die ermutigende Unterstützung während dieser Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung, die mir allzeit wohlwollend gewährt wurde. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Justine Rudner, die mir bei der Ausarbeitung der Fragestellung, der Erlernung der Methoden und der Fertigstellung der Arbeit eine große Unterstützung war, die ich nicht missen möchte.

Frau Prof. Dr. Susanne Ullrich danke ich sehr für die Abnahme meiner mündlichen Dissertationsprüfung und für das rege Interesse an meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. med. David Schilling schulde ich meinen Dank für die großzügige Bereitstellung der Präparate. Ebenso danke ich dem ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik Tübingen, Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl für die freundliche Zusammenarbeit. Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter möchte ich für die wohlwollende Hilfestellung bei der Arbeit mit den Präparaten danken.

Auch den Mitarbeitern des Labors für experimentelle Radioonkologie Tübingen möchte ich meinen Dank aussprechen, allen voran Frau Heidrun Faltin, die mir immer mit technischem und moralischem Rat zur Seite stand, sowie Herrn Dominik Klumpp und Herrn Benjamin Steegen für die methodische Hilfestellung und die tolle Atmosphäre im Labor. Herrn Frederik Wolfesperger möchte ich meinen Dank aussprechen für die vielen erheiternden Stunden, die die manchmal mühsame Arbeit annehmbar gemacht haben.

Auf diesem Wege möchte ich mich auch bei meinem Freund bedanken, der mir auch in schweren Phasen dieser Arbeit mit unendlicher Geduld zur Seite stand und mir trotz der fachlichen Ferne viele hilfreiche Ratschläge gab. Ich danke auch meinem Bruder für die Hilfestellung bei technischen Problemen und die Gewissheit der vollen Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Erziehung zur Selbständigkeit und für die moralische Unterstützung während dieser auch aufreibenden Zeit und schließlich für die Ermutigung zur Vollendung der Arbeit.