

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

Neben einer aus diploiden Fibroblasten eines gesunden Spenders etablierten Zelllinie wurden ausschließlich adhärent wachsende, gut charakterisierte Zelllinien menschlichen Ursprungs verwendet, die keine Mutation im p53-Gen aufweisen und somit dem Wildtyp p53 entsprechen. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte je nach Verwendungszweck in Flaschen, Petrischalen oder Mikrotiterplatten, deren Kunststoffoberfläche ein adhärentes Wachstum ermöglicht.

2.1.1. A549

Die humane Zelllinie A549 wurde 1972 aus einem explantierten Lungentumor eines 58-jährigen Patienten gewonnen und besitzt daher die Charakteristika von Alveolar-Epithelzellen vom Typ II. (Giard *et al.*, 1973). Die hypotriploide Zelllinie weist als häufigste gemeinsame Chromosomenzahl eine Modalzahl von 12 auf. Daneben existieren Zellen mit 64, 65 und 67 Chromosomen. Die hier verwendete Zelllinie ist unter ATCC CCL-185 katalogisiert und wurde von der ATCC Zellbank (*American Type Culture Collection*) bezogen.

2.1.2. MCF-7

Die strahlensensitive Zelllinie MCF-7 wurde 1973 aus dem Pleuraexsudat einer 69-jährigen Patientin mit metastasierendem Adenokarzinom der Mamma etabliert (Brooks *et al.*, 1973). Die Zellen haben einen triploiden weiblichen Karyotyp mit einer Modalzahl von 82. Die Chromosomenzahl der Stammlinie wird als hypertriploid bis hypotetraploid beschrieben (Ranking von 66 bis 87). Die aus entartetem Gewebe der weiblichen Brust isolierte Zelllinie hat einige Eigenschaften des differenzierten Milch-Epithels behalten, einschließlich der Fähigkeit, Estradiol über zytoplasmatische Östrogenrezeptoren zu verarbeiten und so genannte *Zelldome* zu bilden. Als zelluläres Produkt wird IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*) gebildet, dessen Sekretion durch Behandlung mit Anti-Östrogenen moduliert werden kann. Die verwendete Zelllinie (ATCC Nr. HTB-22) wurde über das Deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg, Prof. Franke, bezogen.

2.1.3. AGS

Die Adenocarcinom Zelllinie AGS wurde aus Fragmenten eines unbehandelten Tumors eines männlichen Patienten isoliert. Es handelt sich um eine hyperdiploide humane Zelllinie mit einer Modalzahl von 49 und einer Polyploidierate von 3,9%. Die Zelllinie ist unter ATCC CRL-1739 katalogisiert und wurde von der ATCC Zellbank bezogen.

2.1.4. HEK 293

HEK-293 ist eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt von menschlichen embryonalen Nierenzellen (**H**uman **E**mbrionic **K**idney) mit DNA-

Teilen des Adenovirus-Typ5 transformiert wurde (Graham *et al.*, 1977). Dabei wurden 4500 Basenpaare des linken Arms des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzellen eingebaut. Die hypotriploiden Epithelzellen weisen eine Modalzahl von 64 auf und wurden über die ATCC Zellbank unter der Nummer ATCC CRL-1573 bezogen.

2.1.5. Fibroblasten (NHF)

Eine Primärkultur humaner Fibroblasten wurde aus Nabelschnurgewebe gewonnen. Ein nach Schnittentbindung im OP unter sterilen Bedingungen isoliertes, etwa 4 cm großes Stück der Nabelschnur wurde in möglichst kleine Stücke geschnitten und auf den Boden einer Petrischale aufgebracht. Nach etwa 15 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die mittlerweile angehefteten Gewebestücke mit jeweils einem Tropfen Medium überschichtet. Nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Petrischale mit Medium aufgefüllt. Innerhalb einer Woche bildete sich ein Hof von aussprossenden Zellen um die Explantate aus (Abb. 2-1, a). Der erste Wechsel des Mediums erfolgte nach 10 Tagen, die erste Passage nach 21 Tagen.

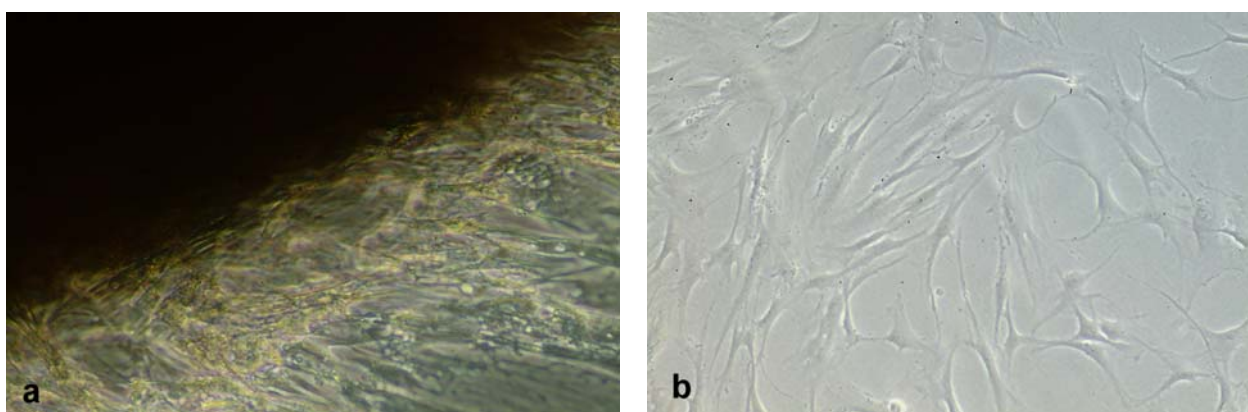


Abb. 2-1: **a:** Auswachsen von Fibroblasten aus Nabelschnurgewebe und **b:** subkonfluenter Zellrasen

2.2. Bakterienstämme

Für Klonierungsarbeiten wurden die in Tabelle 2-1 charakterisierten Bakterienstämme verwendet.

Tab. 2-1: Charakteristika der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle
E.coli XL1 blue	recA1 endA gyrA9 hsdR17 (rk- mk+) lac relA1 supE4 thi-1[F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)].	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli DH5alpha	F- Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 λthi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli SCS110	rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIq ZΔM15]	Stratagene, La Jolla, USA

2.3. Standardmethoden der Molekularbiologie

2.3.1. Isolierung von DNA

2.3.1.1. Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen erfolgte mit Hilfe des *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim, Deutschland). Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer pH8 aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Abhängig von der Menge der benötigten DNA wurden Plasmidreinigungen im Mini- oder Maxi-Maßstab durchgeführt. Für eine Großpräparation der Plasmid-DNA wurde der *Wizard[®] Plus Maxiprep* verwendet, Minipräparationen wurden mit dem *Wizard[®] Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.2. Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA in einer Lösung erfolgte über Absorptionsmessung bei 260 nm (*Genequant*, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Dabei entspricht die in einer Quarzküvette mit einem Lichtweg von 1 cm gemessene optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml DNA (Lottspeich *et al.*, 1998).

2.3.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA wurde in einem optimierten Puffersystem und mit der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur über zwei Stunden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.4. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Agarose-Gelsysteme wurden sowohl für die Trennung, Identifizierung und Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und RNA-Proben als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Dazu wurde Agarose-Trockenpulver geeigneter Konzentration in 50 ml 0,5x TBE-Puffer zum Schmelzen gebracht, mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach Ablauf von 30 Minuten war das Gel ausgehärtet und wurde mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen des Schablonenkammes wurden die Nukleinsäureproben mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer in einem Volumen von 10-25 µl in die Auftragsaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld mit einer Spannung von 1-6 V/cm. Das Elektrophorese-Ergebnis wurde unter UV-Licht bei 302 nm mit einem CCD-Kamerasystem (Phast, Lübeck, Deutschland) dokumentiert.

10x TBE: 0,9 M Tris Base; 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA

6 x Probenpuffer: 0,25% Bromphenol Blau; 0,25% Xylen Cyanol; 15% Ficoll 400 in H₂O

Ethidiumbromid: 10 mg/ ml

2.3.5. Elution von Nukleinsäuren aus Gelen

Zur Gewinnung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde die gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Transilluminator (302 nm, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) mit einem sterilen Skalpell eng ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert.

2.3.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Abschnitten aus doppelsträngiger DNA. Mittels einer zyklischen Abfolge von Strangtrennung, Primer-Annealing und Strangextension wird bei Verwendung einer thermostabilen Polymerase eine exponentielle Anreicherung über einen weiten Bereich der Reaktion gewährleistet.

Für einen Standard-Ansatz mit 50 µl Reaktionsvolumen wurden 5 µl 10 x PCR-Puffer, 1 µl eines dNTP-Gemisches aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Endkonzentration 0,2 mM), Primer mit einer Endkonzentration von jeweils 0,5 µM, DNA-Matrize, Wasser und Polymerase nach Angabe des Herstellers eingesetzt. Die Art des Puffersystems war von der verwendeten Polymerase abhängig. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden die Magnesiumkonzentration und die Annealingtemperatur der Primerpaare in parallelen Reaktionen aufeinander abgestimmt. Für präparative PCR-Reaktionen wurde eine so genannte *Proofreading-Polymerase* (*Pfu* oder *Pwo*), für analytische Reaktionen eine *Taq-Polymerase* oder *Hot-Start-Polymerase* verschiedener Anwender verwendet.

2.3.7. Reinigung von PCR-Produkten

Die Amplifikate wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* entsprechend dem Herstellerprotokoll (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.8. Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen wurden vom „Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln“ (ZMMK) als Servicearbeit durchgeführt.

2.3.9. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Zur Abtrennung von Nukleinsäuren in proteinhaltigen Lösungen wurden Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Die wässrige Lösung wurde mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und gevortext. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst während sich die denaturierten Proteine in der Grenzfläche zwischen der wässrigen und der Phenolphase anordnen. Nach Zentrifugation mit 14.500 rpm konnte die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden und durch Zugabe von einem Volumen Chloroform vom verbliebenen Phenol befreit werden. Zur Konzentrierung der DNA und Entfernung niedermolekularer Bestandteile

wurde die gereinigte, wässrige Lösung auf 0,3 M Natriumacetat (pH 5.2) eingestellt, mit dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem, absoluten Ethanol versetzt und über mindestens drei Stunden bei -20°C gelagert. Nach Sedimentation der Nukleinsäuren über 20 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und im gewünschten Puffervolumen aufgenommen.

2.3.10. Klonierung und Subklonierung

Alle DNA modifizierenden Enzyme wurden über die Firma Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland bezogen. Je nach Kompatibilität des Puffersystems wurde bei aufeinander folgenden Reaktionen die Salzbedingungen nach Angaben des Herstellers angepasst oder der gesamte Ansatz über eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation gereinigt.

2.3.10.1. Erzeugung von blunt-end DNA Fragmenten

Durch den Verdau von DNA-Molekülen mit Restriktionsenzymen entstehen entweder Fragmente mit glatten Enden (*blunt-ends*) oder 5'- oder 3'- überhängenden Enden (*sticky-ends*). Bei inkompatiblen überhängenden Enden von Vektor und DNA-Fragment wurde eine so genannte *blunt-end*-Ligation durchgeführt. Dazu mussten die DNA-Fragmente mit überhängenden Enden entweder aufgefüllt oder abverdaut werden. Für den Verdau von 3'-überhängenden Enden wurde das Enzym T4-Polymerase, für das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden das *Klenow-Fragment (DNA Polymerase I Large Fragment)* nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.10.2. Phosphorylierung von PCR-Produkten

Die Phosphorylierung von PCR-Produkten oder synthetischer DNA erfolgte über das Enzym *T4-Polynukleotid-Kinase*. In der nach Angaben des Herstellers durchgeführten Reaktion wurden endständige Phosphatgruppen des ATP auf das 5'-Hydroxylende der Nukleinsäure übertragen.

2.3.10.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) katalysiert die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe linearisierter Vektor-DNA, wodurch eine Religation verhindert und die Ligationseffizienz mit dem zu klonierenden DNA-Fragment erhöht wird. Für die Berechnung der erforderlichen Enzymmenge an CIAP wurde der Gehalt an pmol Enden (1Unit Enzym/ pmol Enden) als Grundlage berücksichtigt. Die Reaktion lief in Anwesenheit von 50 mM Tris-Cl pH 8.0 und 0,1 mM EDTA ab. Um das im Puffer enthaltene Zink zu chelieren, wurde der Ansatz anschließend auf einen 10 mmolaren EGTA-Gehalt eingestellt. Es schlossen sich eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 68°C, eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-Präzipitation an. Der so behandelte Vektor wurde im 0,8%igen Agarose-Gel aufgereinigt und nachfolgend aus dem Gel eluiert. Der Vektor wurde in Konzentrationen von 50 ng in Ligationsreaktionen eingesetzt.

2.3.10.4. Präparation eines TA-Klonierungsvektors

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde ein TA-Klonierungsvektor verwendet. Die Klonierungsstrategie basiert auf der Entdeckung, dass die *Taq Polymerase* einen unspezifischen Basenüberhang (Adenosin) produziert. Durch Verwendung eines Vektors mit Thymidin-Überhang lassen sich PCR-generierte Fragmente aufgrund der komplementär überstehenden 3'-Enden direkt klonieren.

Zur Herstellung des TA-Vektors wurde linearisierte Bluescript-Vektor DNA nach Restriktionsverdau mit *Eco RV* in Anwesenheit von dTTP und *Taq-Polymerase* inkubiert. Nach Reinigung und Konzentrierung der DNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurde eine Ligation der Vektor-DNA mit zwei Einheiten Ligase über 16 Stunden bei 14°C durchgeführt. Da eine Religation des TA-Vektors durch das überstehende Thymidin nicht möglich war, konnte somit der erfolgreich präparierte Vektor mit 3'-überstehendem Thymidin in einem 0,8%igen Agarose-Gel identifiziert werden. Die Bande mit unligierter, linearisierter Vektor-DNA wurde aus der Gelmatrix ausgeschnitten und nach Elution aus dem Gel in Ligationsreaktionen mit amplifizierter DNA eingesetzt.

2.3.10.5. Ligation von DNA in Plasmide

Die Ligation der DNA-Fragmente mit Plasmid-DNA wurde in einem 10 µl-Reaktionsansatz mit 50 ng Vektor-DNA und dem dreifach molaren Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments durchgeführt. Je nach Beschaffenheit der hydrolysierten Vektor-DNA (*sticky* oder *blunt ends*) wurden der Reaktion 1-5 Einheiten T4 DNA Ligase zugefügt und entweder über zwei Stunden bei Raumtemperatur (*sticky ends*) oder über Nacht bei 14°C (*blunt ends*) inkubiert. Nach thermischem Abstoppen der Reaktion bei 70°C wurden 1-10 µl des Ligationsansatzes für die Transformation in kompetente Bakterienzellen eingesetzt.

2.3.10.6. Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen

Alle Arbeiten erfolgten auf Eis mit gekühlten Materialien und Lösungen. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen mit maximal 10 µl der zu transformierenden DNA versehen und auf Eis über 30 Minuten inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C über 45 Sekunden wurden die Transformationsansätze für zwei Minuten auf Eis inkubiert, in 800 µl vorgewärmtes SOC-Medium überführt und über eine Stunde zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz im Schüttelinkubator inkubiert. 100 µl der Zellsuspension wurden auf vorgewärmten Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

SOC-Medium: 20 g Tryptone; 5 g Hefe Extrakt; 0,5 g NaCl auf 950 ml deionisiertes Wasser; 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung hinzufügen; pH mit 5N NaOH auf 7.0 einstellen und Volumen auf 980 ml bringen. Autoklavierte Lösungen auf 55°C abkühlen lassen, dann 10 ml einer filtersterilisierten 2 M Glucoselösung und 10 ml einer 1 M MgCl₂-Lösung hinzufügen.

Selektionsplatten: LB-Medium mit 15 g Agar pro 1000 ml Medium, Autoklavieren nach Zugabe des gewünschten Antibiotikums.

2.3.10.7. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Transformationskompetente *E. coli* Zellen (DH5 α , XL1-Blue und SCS 110) wurden auf einem von Hanahan (1983) basierenden Protokoll, modifiziert nach Inoue *et al.* (1990), hergestellt. Dazu wurden 10 ml einer aus einem frischen Zellausstrich angelegten Starterkultur über mindestens acht Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) kultiviert. Bei der Herstellung kompetenter XL1-blue-Zellen wurde die Starterkultur zum Erhalt des F'-Episoms in Tetracyclin-Selektionsmedium (12,5 μ g/ml) angesetzt. 500 μ l der Starterkultur wurden zum Ansetzen einer Übernachtskultur in 250 ml SOB verwendet. Diese wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,55 bei 19°C kultiviert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Arbeiten auf Eis unter Verwendung gekühlter Materialien und Lösungen. Nach Abstoppen des Wachstums durch Inkubation auf Eis über 10 Minuten wurden die Bakterienzellen bei 2500 x g über 10 Minuten sedimentiert, in 80 ml eiskalter TB-Lösung resuspendiert und erneut über 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation über 10 Minuten wurden die Bakterienzellen in 20 ml eiskalter TB-Lösung mit 7% DMSO aufgenommen, nochmals auf Eis über 10 Minuten inkubiert und in tiefgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

SOB: 2% Bacto Tryptone; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄;

TB: 10 mM Pipes; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; pH 6,7 mit KOH einstellen, anschließend 55 mM MnCl₂ hinzufügen und steril filtrieren, Lagerung bei 4°C

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefe Extrakt; 10 g NaCl ad 1000 ml, pH 7.5

2.3.10.8. Selektion rekombinanter Klone

Im Wirtstamm *XL1-Blue* besteht nach Transformation mit einem Bluescript-Vektor die Möglichkeit des so genannten *Blau-Weiß-Screenings* zur Selektion rekombinanter Klone. Die aminoterminal codierende Sequenz des β -Galactosidase-Gens (α -Fragment) liegt in der *Multiple Cloning Site* des Bluescript-Vektors. Eine Insertion eines DNA-Fragments in diesen Polylinker hat die Expression von inaktiver β -Galactosidase und die Ausbildung weißer Klone zur Folge. Bei der Selektion der Transformanten bedient man sich des Lactoseanalogons X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid), das von dem Enzym β -Galactosidase zu einem blauen Reaktionsprodukt abgebaut wird. Setzt man dem Agar X-Gal und IPTG (Isopropylthiogalactosid) als Induktor des Enzyms zu, lassen sich rekombinante, weiße Kolonien von blauen, nicht-rekombinanten Kolonien unterscheiden.

Zur Durchführung des *Blau-Weiß-Screenings* wurden die Agarplatten vor Plattieren des Transformationsansatzes mit einer Mischung aus X-Gal und IPTG in SOC Medium bestrichen und bei 37°C über 30 Minuten getrocknet. Die Blaufärbung der nicht rekombinanten Kolonien war nach Lagerung der Platte bei 4°C über 2 Stunden deutlich erkennbar.

Anschließend wurde mittels PCR geprüft, ob die Transformanten ein DNA-Fragment der gewünschten Länge enthielten (*Colony-Screening*). Dazu wurden in einer Standard-PCR

vektorspezifische, die *Multiple Cloning Site* flankierende Primer eingesetzt und die Länge der Amplifikate im Agarosegel überprüft.

IPTG- X-Gal- Lösung: 10 µl 100 mM IPTG; 40 µl X-Gal; 3% und 50 µl SOC pro Platte

2.3.11. Isolierung und Auftrennung von RNA

Für RNA-Arbeiten wurde ein gesonderter Satz an Chemikalien, Plastikspitzen und Glasgeräten verwendet. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Wasser hergestellt, das mit dem RNase-Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt worden war. Zu dessen Herstellung wurde Wasser mit 0,1% (v/v) DEPC über mindestens 30 Minuten geschüttelt und anschließend zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert.

2.3.11.1. Isolation von Gesamt-RNA über Tri Reagent

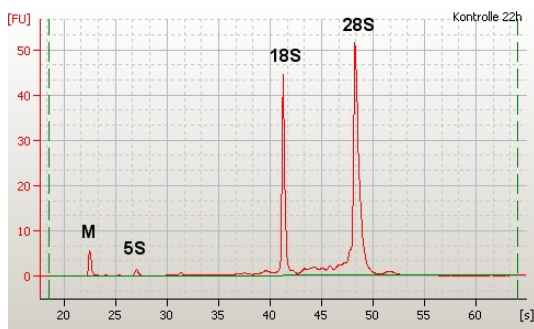
Starke Denaturierungsmittel wie Guanidinthiocyanat oder SDS stellen die beste Methode dar, zelluläre RNasen zu inaktivieren und intakte Gesamt-RNA aus Säugerzellen zu isolieren (Chomczynski und Sacchi, 1987). DNA verbleibt unter sauren Bedingungen in der organischen oder Interphase und wird so von der RNA abgetrennt. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt in der Kulturschale nach Entfernen des Mediums. Nach Zugabe von 1 ml *Tri Reagent*[®] (Sigma, T94243) pro 10 cm² Kulturfläche wurde das Homogenat über 5 Minuten zur vollständigen Dissoziation des Nucleoprotein-Komplexes bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der Phasen wurde 0,2 ml Chloroform pro ml *Tri Reagent*[®] hinzugefügt, das Reaktionsgefäß über 15 Sekunden geschüttelt und die Mischung für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation mit 12000 x g über 15 Minuten bei 4°C wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro ml *Tri Reagent*[®] präzipitiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA bei 12.000 x g präzipitiert, mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend bei 7500 x g über 5 Minuten zentrifugiert. Zur Gewinnung hochreiner RNA wurde die Reaktion einer Fällung mit 2 M Lithiumchlorid über 30 Minuten bei -20°C unterzogen. Nach einer Zentrifugation über 20 Minuten bei 4°C wurde das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser oder 0,5 % SDS bei 55-60°C solubilisiert.

2.3.11.2. Isolierung von Gesamt-RNA über RNeasy Kit

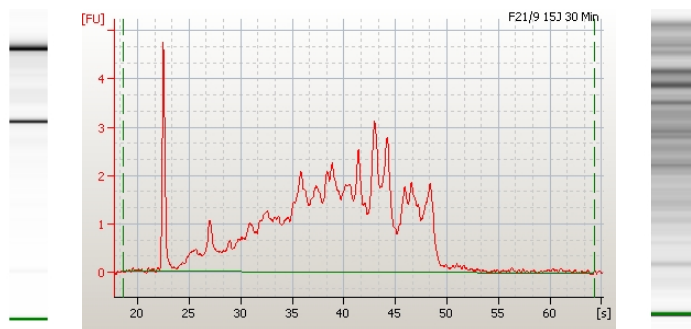
Hochreine RNA aus Säugerzellen wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* nach Angaben des Herstellers (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gewonnen. Sofern die RNA zur cDNA-Synthese mit nachfolgender qPCR eingesetzt werden sollte, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau auf der Ionenaustausch-Säule nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Isolierung im Zellzahlbereich bis 5 x 10⁶ Zellen wurde der *RNeasy Micro Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet.

2.3.11.3. Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA

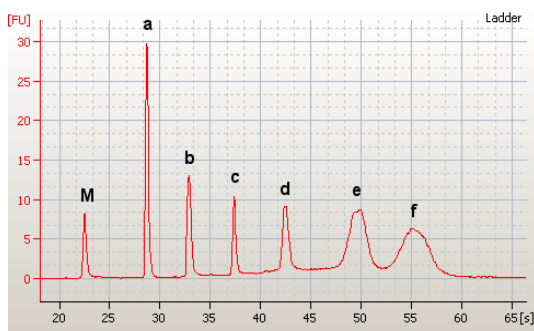
Die Menge an isolierter RNA wurde mittels UV-Spektroskopie bei 260 nm bestimmt (*Genequant*, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Eine Absorption von 1 OD bei 260 nm entspricht dabei einem Wert von 40 µg RNA pro Milliliter Lösung. Es wurden ausschließlich reine RNA-Präparationen mit einem Verhältnis von E_{260} zu E_{280} von 1,8 bis 2,1 verwendet. Die Integrität der extrahierten Gesamt-RNA wurde anschließend auf einem Formaldehyd-Agarose-Gel (2.2.1.17) oder mit dem Agilent *BioAnalyzer* (Agilent, Palo Alto, USA) überprüft. Die im *BioAnalyzer* verwendete *Lab-on-a-chip* Technologie basiert auf dem Prinzip der Mikrofluidik, der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in einem miniaturisierten System. Im *BioAnalyzer* wird die farbstoffmarkierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert. Die parallele Analyse eines RNA Größenstandards (*RNA 6000 Ladder*, Ambion, Huntingdon, UK) erlaubte außer der qualitativen Beurteilung der Proben auch eine Quantifizierung der RNA-Menge. Abbildung 2-2 zeigt repräsentative Ergebnisse der Analyse mit dem *BioAnalyzer*.



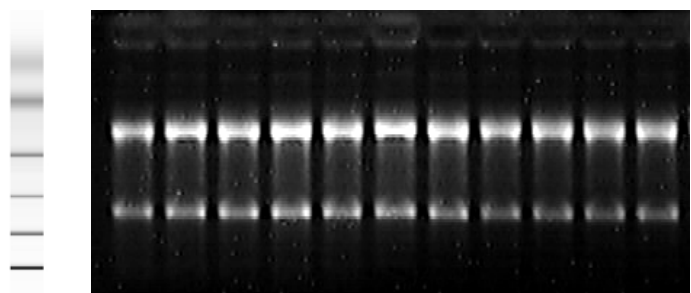
A: RNA Konzentration: 120 ng/µl; rRNA Verhältnis [28S/18S] = 1,9; RIN: 10



B: RNA Konzentration: 70 ng/µl; rRNA Verhältnis [28S/18S]: 1,6; RIN: 3,4



C: RNA Konzentration: 150 ng/µl



D: Formaldehyd-Agarose-Gel mit jeweils 2 µg RNA

Abb. 2-2: Repräsentative Elektropherogramme und „Gel-like Images“ von intakter (**A**) und degradierter Gesamt-RNA (**B**) nach Analyse im *BioAnalyzer*. M =Marker zur Synchronisation der Proben; [FU] =Geräte-spezifische Fluoreszenzeinheit; 5S =5S rRNA; 18S =18S rRNA; 28S = 28S rRNA. RNA Größenstandard (**C**): Fragmente des Größenstandards a-f (0,2 / 0,5 / 1,0/ 2,0/ 4,0/ 6,0 kb); (**D**) Formaldehyd-Gelelektrophorese intakter Gesamt-RNA .

Über einen in die Software integrierten Algorithmus wurde jede Probe mit einer *RNA Integritätsnummer* (RIN) versehen, die über ein numerisches System von 1 bis 10 den Degradationsgrad

der Probe von vollständig degradierter RNA (RIN 1) bis zu intakter RNA (RIN 10) wiedergibt. Zur Analyse der RNA-Proben wurde der *RNA 6000 Nano LabChip* mit einer Mischung aus Gelmatrix und Fluoreszenzfarbstoff befüllt und mit 1 µl der jeweiligen Probe beladen. Es wurde ausschließlich intakte RNA mit einer RNA Integritätsnummer von mindestens 8,5 verwendet.

2.3.11.4. Denaturierende Formaldehyd-Gele

Formaldehyd-Gele wurden unter Verwendung von 1,2% Agarose, 6% Formaldehyd und 1x MOPS hergestellt und nach Aushärten mit gekühltem Lauf-Puffer überschichtet. Isolierte Total-RNA wurde in einem Gesamtvolumen von max. 20 µl mit 3 Volumen Denaturierungspuffer gelöst, über 5 Minuten bei 65°C denaturiert, anschließend auf Eis gekühlt und in die Auftragstaschen des Formaldehyd-Gels geladen. Da nicht-interkaliertes Ethidiumbromid im elektrischen Feld zur Kathodenseite aus den Auftragstaschen herausläuft, wurde bei Proben, deren Denaturierungspuffer mit Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) versetzt war, der Gelabschnitt mit dem überschüssigen Ethidiumbromid mit einem Skalpell nach ca. zehn Minuten herausgeschnitten. Aufgrund der Wärmentwicklung während der Auftrennung wurde der Laufpuffer im 30minütigen Abstand gewechselt.

10x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA pH 7.0

Laufpuffer: 1x MOPS-Puffer + 10 % Formaldehyd

Denaturierungspuffer: 720 µl Formamid (deion.); 160 µl 10x MOPS-Puffer; 260 µl Formaldehyd; 180 µl H₂O; 10 µl Glycerin; 80 µl einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung

2.3.12. Quantifizierung geänderter Genexpression

2.3.12.1. Northern Blotting: Hybridisierung mit radioaktiven Sonden

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA definierter Menge wurde via Kapillartransfer über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (*Serva Nylonbind A*, Serva, Heidelberg, Deutschland) transferiert und durch Backen bei 120°C über 30 Minuten immobilisiert. Da dem Denaturierungspuffer kein Ethidiumbromid zugesetzt war, wurde die filtergebundene RNA zur Ladekontrolle mit Methylblau angefärbt (Herrin und Schmidt, 1988). Die Northern-Hybridisierung zur Detektion strahleninduzierter p53R2-Expression wurde mit doppelsträngigen, PCR-generierten radioaktiven DNA-Sonden durchgeführt. Dazu wurde ein cDNA-Fragment über PCR amplifiziert, in einen Bluescript-Vektor kloniert, über T3- und T7-Primersites vervielfältigt und in die Sondenherstellung eingesetzt. 200 pg des über PCR amplifizierten Inserts, 3 µl ³²P-dCTP (3,7x10⁵ Bq/ µl), 2 µl 0,02 mM dNTP-Mix ohne dCTP, 2 µl 10x (NH₄)₂SO₄ Puffer, 2 mM MgCl₂ und je 10 pmol T3- und T7-Primer (0,5 µM) wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in eine durch Vorversuche optimierte PCR-Reaktion eingesetzt. Die Elongationszeit betrug zwei Minuten mit einem Zeitinkrement von 5 Sekunden über insgesamt 25 Zyklen. Nach Ablauf der PCR wurde die radioaktiv markierte Sonde über den *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben gereinigt (QIAGEN, Hilden, Deutschland) und im *Packard Szintillationszähler* über Messung der

Cerenkov-Strahlung quantifiziert. Die erforderliche Mindestmenge an eingebauten ^{32}P -dCTP lag bei 1×10^6 counts/ml Hybridisierungs-Mix, die spezifische Aktivität der Probe bei 10^9 dpm/ μg . Die Nylonmembran mit geblotteter und immobilisierter RNA wurde in einer Röhre bei 42°C über zwei Stunden in einem Hybridisierungsinubator (GFL 7601, Burgwedel, Deutschland) prähybridisiert. Die denaturierte Probe wurde zur Prähybridisierungslösung gegeben und über 20 Stunden bei 42°C inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die radioaktive Lösung abgegossen und die Filter unter stringenten Bedingungen gewaschen. Die spezifischen Waschschriffe gewährleisten, dass die Bindung nur dann erhalten bleibt, wenn die Sequenz der Sonde zu 100% mit der Sequenz des Amplifikats komplementär ist. Folgende Waschschriffe wurden mit entsprechend temperierter Lösung durchgeführt: 5 Minuten in $2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS bei Raumtemperatur, zweimal 5 Minuten in $0,2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS bei Raumtemperatur, zweimal 15 Minuten in $0,2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS bei 42°C und zweimal 15 Minuten in $0,2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS bei 68°C . Nach Entfernen der Waschlösung wurden die Filter in $2 \times \text{SSC}$ bei Raumtemperatur gespült, anschließend feucht in Frischhaltefolie eingeschlagen und einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie (*Hyperscreen™ Intensifying Screen*, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) für 1-3 Tage bei -80°C exponiert.

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Na-Citrat ad 1000 ml, mit 700 μl Zitronensäure auf pH 7.0 eingestellt.

Färbelösung für die Ladekontrolle: 40 mg Methylenblau in 200 ml 0,3 M Natriumacetat pH 5,5

Prähybridisierungs-/ Hybridisierungs-Lösung: $5 \times \text{SSC}$; $5 \times \text{Denhardt's Solution}$; 1 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Formamid; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte Heringsperm DNA

2.3.12.2. Quantitative Real-Time RT-PCR

Die quantitative Real-Time RT-PCR ist eine Amplifizierungsmethode für doppelsträngige Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion beruht und darüber hinaus die Möglichkeit der Quantifizierung der Menge der ursprünglich vorhandenen DNA-Moleküle bietet. Zur Quantifizierung wird die Fluoreszenzentwicklung eines interkalierenden Farbstoffs oder eines Fluoreszenz-markierten Oligonukleotids in Echtzeit gemessen, die im exponentiellen Teil der Reaktion proportional mit der Menge des PCR-Produkts ansteigt. Die Quantifizierung der Startmenge des PCR-Produktes basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold-Cycle (CT-Wert). Der CT-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß normalerweise nicht detektierbar ist. Aus diesem Grund beruht die Quantifizierung der DNA-Menge nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge an Startmaterial relativ zur Menge eines internen, auch unter Behandlung stabil regulierten Referenzgens berechnet. Durch

diese Art der Normalisierung können Variationen in der Ausgangsmenge an Startmaterial ausgeglichen werden.

Die Durchführung der qRT-PCR mit der *SYBR Green* Technologie erfolgte nach einem Standardprotokoll (SOP), entwickelt nach Richtlinien internationaler Symposien (*1st International qPCR Symposium* in Weihenstephan, 2004 und *3rd qPCR Symposium in London*, 2005). Das SOP beinhaltet Anweisungen für das Versuchsdesign, die Optimierung der Versuchsbedingungen, die Präparation der RNA-Proben und deren Umschreibung in cDNA, die Durchführung der quantitativen RT-PCR, die Normalisierung gegen Referenzgene, die Analyse und die Veröffentlichung der Daten.

2.3.12.2.1. Primerdesign und prä-analytische Schritte

Um eine Vergleichbarkeit erzielter Daten über die Grenzen unseres Labors zu gewährleisten, wurden Primerbanken des *World Wide Web* auf Einträge bereits veröffentlichter Primersequenzen hin untersucht. Die derart gefundenen Primersequenzen wurden anhand von Datenbankeinträgen des NCBI (*National Center for Biotechnology*, USA, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verifiziert. Bei dem Design eigener Primer und der Verifizierung bereits veröffentlichter Sequenzen wurde zunächst die mRNA des Zielgens anhand Datenbankeinträge des NCBI mit dem Programm *Mfold* (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) auf die Bildung von Sekundärstrukturen überprüft. Die Primer wurden innerhalb eines frei zugänglichen Bereichs der mRNA mit einer Länge von 100 bis 180 Basenpaare über die Software *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.) entworfen. Zur Vermeidung einer Amplifikation genomischer DNA wurden die Primer derart gewählt, dass mindestens einer der beiden Primer eine Exon-Intron-Grenze überspannt. Die Sequenzen der Primer (Tabelle 2-2) wurden auf mögliche Homologien mit dem *BLAST*-Server des NCBI untersucht (Altschul *et al.*, 1997). Anschließend fand eine Prüfung auf inter- und intramolekulare Komplementarität mit dem Programm *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com>) statt. Jeweils drei Primerpaare für den Forward- und Reversstrang der cDNA wurden kommerziell synthetisiert (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und miteinander in der Präanalyse kombiniert. Nach Auswahl geeigneter Primerpaare wurden diese anschließend für mehrere Parameter wie Primerkonzentration, Annealingtemperatur und -zeit im *Opticon2* optimiert und die Spezifität der Amplifikation über Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese verifiziert.

Unter den Haushaltsgenen, die zur Normalisierung der Expressionsunterschiede herangezogen werden, sind neben funktionell exprimierten Genen eine Vielzahl von Pseudogenen bekannt. Auch wenn die Primer derart entworfen werden, dass sie die Exon-/Introngrenze überspannen, kann es zu einer Amplifikation eines Intron-freien Pseudogens kommen und somit einer Verfälschung der analysierten Genexpressionsunterschiede führen. Aus diesem Grunde wurden die Primer der Haushaltsgene vor Einsatz in der qRT-PCR mit genomischer DNA als Startmaterial getestet und die Länge der Amplifikate überprüft. Eine Validierung der Amplifikate aller

verwendeten Primer erfolgte mittels Sequenzierung oder alternativ in einem analytischen Restriktionsverdau. Dazu wurden *Single-cutter*, d.h. Restriktionsenzyme die innerhalb der Zielsequenz nur einmal schneiden, über das Programm *NEB-Cutter* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2index.php>) ermittelt und das Bandenmuster nach Durchführung eines analytischen Restriktionsverdaus mit den vorhergesagten Fragmentlängen verglichen.

Tabelle 2-2: Sequenz, Annealing-Temperatur (Tm), Amplikonlänge und Nummer des Gendatenbank-eintrags (NCBI) der für Genexpressionsstudie verwendeten Primer.

Genname	Sequenz 5' - 3'	Tm [°C]	Länge [bp]	NCBI
Haushaltsgene				
18S rRNA	fwd: GACTCAACACGGGAAACCTC rev: ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT	60	153	X03205
ACTB	fwd: CAAGATCATTGCTCCTCCTGA rev: AGTCCGCCTAGAAGCATTG	60	155	NM_001101
GAPDH	fwd: CAATGACCCCTTCATTGACC rev: GATCTCGCTCCTGGAAGATG	60	146	NM_002046
TFRC	fwd: TGC AGA AAA GGT TGC AAA TG rev: AAG GAA GGG AAT CCA GGT GT	60	156	NM_003234
UBC	fwd: TCGTCACTTGACAATGCAGAT rev: TCCAGCAAAGATCAGCCTCT	60	154	NM_021009
SDHA	fwd: TACAAGGTGCGGATTGATGA rev: GTTTTGTCGATCACGGGTCT	60	155	NM_004168
HPRT	fwd: TGACACTGGCAAACAATGCA rev: GGTCTTTTACCAGCAAGCT	62	120	NM_000194
G6PDH	fwd: CAACCACATCTCCTCCCTGT rev: CGAAGATCCTGTTGGCAAAT	62	114	BC000337
PBGD (HMBS)	fwd: CAGCTTGCTCGCATAACAGAC rev: GAATCTTGTCCTGTTGGTG	60,4	106	NM_000190
B2M	fwd: GGCTATCCAGCGTACTCCAAA rev: CCAGTCCTTGCTGAAAGACAA	59,1	184	NM_004048
Zielgene				
CDKN1A (p21/WAF)	fwd: GGAAGACCATGTGGACCTGT rev: AAATCTGTATGCTGGTCTGC	61,9	129	NM_000389
NF κ BIA	fwd: AACCTGCAGCAGACTCCAC rev: TGCTCACAGGCAAGGTGTAG	61	137	NM_020529
GADD45alpha	fwd: GAGAG CAGAAGACCG AAAGGA rev: CACAACACCACGTTATCGGG	61,9	145	NM_001924
GADD45beta	fwd: ACAGTGGGGGTGTACGAGTC rev: TTGATGTCGTTGTACAGCA	61,9	155	NM_015675
BRCA2	fwd: TTTCTTCAGAAGCTCCACCC rev: TCAGCCCTTGCTCTTTGAAT	61,9	145	NM_000059
p53R2 (RRM2b)	fwd: TATAAACAGGCACAGGCTTCC rev: CGATGAGAATTTGAAAGCCA	59,1	155	NM_015713
EGFP **	fwd: GCATCGACTTCAAGGAGGAC rev: ACCTTGATGCCGTTCTTCTG	60	108	U55761

** verwendet für die Analyse der Insertionshäufigkeit im Vektor A549-RRM2b-EGFP

2.3.12.2.2. Wahl des Referenz-Gens

Die Anforderungen an ein ideales Referenz-Gen sind hoch. So sollte seine Expression in unterschiedlichen Zelltypen konstant sein, es sollte nicht aktiv reguliert werden und zudem auf annähernd gleichem Expressionsniveau reguliert werden wie das Zielgen. Die Stabilität der Expression des Referenz-Gens unter experimentellen Bedingungen stellt eine elementare Voraussetzung für die interne Standardisierung der Genexpression des Zielgens dar (Suzuki *et al.*, 2000; Thellin *et al.*, 1999). Ein ideales Referenz-Gen, das alle diese Anforderungen gleichermaßen erfüllt, konnte allerdings bisher nicht gefunden werden. Die zur Normalisierung üblicherweise verwendeten Haushaltsgene wie GAPH, Albumine, Actine, Tubuline, Microglobuline und 18S rRNA können unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen signifikante Expressionsunterschiede zeigen (Tricarico *et al.*, 2002). Daher wurden mehr als ein Referenzgen (Tabelle 2-3) untersucht und die Resultate der Expression zu einem gewichteten Expressionsindex vereinigt. Für jedes qRT-PCR Experiment wurde die Stabilität von mindestens drei verschiedenen Haushaltsgenen unter experimentellen Bedingungen mit der Excel-basierenden Software *BestKeeper*® (Pfaffl, 2004a) untersucht. Diese ermittelt aus maximal zehn Kandidatengenen das unter Behandlung am stabilsten exprimierte Haushaltsgen und vereinigt die Resultate der Expression zu einem gewichteten Expressionsindex. (Pfaffl, 2004b). Darüber hinaus wurde die Stabilität der untersuchten Haushaltsgene mit der Software *GeNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) untersucht. Ziel von *GeNorm* ist die Identifizierung von Referenzgenen mit der stabilsten Expression innerhalb einer Untersuchungsreihe und die Festlegung der optimalen Anzahl von Referenzgenen zur Berechnung eines Normalisierungsfaktors.

Tab. 2-3: Eigenschaften verwendeter Referenzgene

Gen	Eigenschaften	Regulation
ACTB <i>Human beta actin</i>	Strukturprotein des Zytoskeletts, Aufgaben im Bereich der Motilität, Struktur und Integrität; Multigenfamilie mit einem aktiven Locus; 20 Pseudogene bekannt	↑: Schilddrüsenhormone ↑: Magentumor
GAPDH <i>Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Katalysator der oxidativen Glycerinaldehyd-3-phosphatase in der aeroben Glycolyse; Multigenfamilie; 10-30 Gene bekannt, > 200 Gene in Mausgenom; meistens Pseudogene	↑: Colon Karzinom u.a. Tumore ↑: Insulin, EGF; Dexamethason ↑: Muskulatur, Herz; Lunge, Pankreas ↓: Hoden, Leber, Gehirn
B2M <i>Human β2-microglobulin</i>	1000 –10000 Moleküle pro Zelle Klasse I MHC (Major Histocompatibility Complex) Protein; befindet sich auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen	relativ stabil exprimiert; abnormale Expression in Tumoren ↑: Non-Hodgin Lymphom ↑: nach Aktivierung des Immunsystems
PBGD (HMBS) <i>Human porphobilinogen deaminase</i>	Drittes Enzym der Hämbiosynthese in Erythrocyten; Alternatives Splicen ergibt zwei spezifische mRNA Spezies 10-100 Moleküle pro Zelle	
18S rRNA	Aufbau der kleinen 40S-Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen, aufgrund des hohen Anteils von rRNA an der Gesamt-RNA (>80%) hohes Level an Genexpression	↓: Leukämische CD38+ Zellen ↓: Degradation der rRNA Spezies nach Hitzeschock
G6PDH <i>Human glucose-6-phosphate-dehydrogenase</i>	100 –1000 Moleküle pro Zelle Erstes Enzym im Pentose Phosphate Zyklus, verantwortlich für die Bereitstellung von NADPH	ubiquitär exprimiert mit unterschiedlich hohen Expressionsleveln ↑ Niere, Magentumore, Hormone, ↑: oxidat. Stress, Wachstumsfaktoren
HPRT <i>Human hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase 1</i>	1-10 Moleküle pro Zelle Katalysiert im Rahmen des Purinstoffwechsels die Umsetzung von Hypoxanthin und Guanin zu ihren 5' Mononukleotiden; ein Pseudogen bekannt	↑ proliferierende Zellen ↓ Zellen mit Mutationen im HPRT Locus induziert durch ionisierende Strahlung
UBC <i>Human ubiquitin C</i>	Polyubiquitin Protein Precursor, markiert zelluläre Proteine vor Degradation	
TFRC <i>Human transferrin</i>	Zelluläre Aufnahme von Eisen via Rezeptor-vermittelter Endozytose von Liganden-gekoppelten Transferrin-Rezeptor	mRNA Expression ist abhängig vom Eisenbedarf der Zelle
SDHA <i>Succinat Dehydrogenase</i>	Untereinheit A der mitochondrialen Succinat Dehydrogenase, katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarase (Citratzyklus)	

2.3.12.2.3. cDNA-Synthese

Isolierte einzelsträngige Total-RNA wurde mit Hilfe der *Reversen Transkriptase* aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Reagenziensystem des nach Herstellerangaben (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendete *iscript cDNA Synthesis Kit* beinhaltet ein optimiertes Gemisch aus *Random Hexamers* und *Oligo-dT-Primern*. Als Startmenge für den Syntheseschritt wurden 0,15 bis 1 µg RNA nach einem Denaturierungsschritt bei 65°C in die Reaktion eingesetzt.

2.3.12.2.4. Durchführung der qRT-PCR

Als Template für die qRT-PCR wurden 2,5 -20 ng revers transkribierte und mit DNase behandelte Total RNA eingesetzt. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus 12,5 µl 2x Green RT-PCR (Eurogentec, Köln, Deutschland), 2 µl cDNA, je 0,5 µl des Forward- und Revers-Primers (200 nM) in einem Endvolumen von 25 µl wurde als Mastermix pipettiert. Die cDNA der bestrahlten und unbestrahlten Proben wurden in der Regel als Triplikate analysiert. Eine Ausnahme bildete die Analyse der Genexpression nach Bestrahlung mit Alpha-Teilchen: Aufgrund der Limitierung des Ausgangsmaterials von 40.000 Zellen wurde die Analyse in Duplikaten vorgenommen. Neben einer Negativkontrolle mit Wasser (*No Template Control*, NTC) wurde eine so genannte *No Amplification Control* (NAC) zur Detektion einer Amplifikation genomischer DNA mitgeführt. Im Startmaterial dieser Kontrolle war der cDNA-Syntheseschritt ohne Enzymzugabe durchgeführt worden. Die Reaktion wurde in einem *DNA Engine Opticon2* Thermocycler (MJ Research, Bio-Rad, München, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt: Nach einem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C zur Aktivierung der *HotStart Polymerase* schlossen sich 40 Zyklen mit jeweils (i) 15 Sekunden bei 95°C, (ii) 30 Sekunden bei der jeweiligen Annealingtemperatur der Primer (Tabelle 2-2) und (iii) 30 Sekunden bei 60°C zur Elongation des neu synthetisierten Strangs an.

2.3.12.2.5. Überprüfung der Spezifität der Amplifikation

Direkt im Anschluss an den qRT-PCR-Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse im *Opticon2* durchgeführt. Dabei wurde das Amplifikat von 60°C bis 95°C erhitzt und die Fluoreszenz in Temperaturschritten von jeweils 0,3°C kontinuierlich gemessen. Der interkalierende Farbstoff *SYBR Green* fluoresziert an denaturierten DNA-Strängen deutlich weniger als im DNA-Doppelstrang. Bei graphischer Darstellung der Fluoreszenz gegen die Temperatur (Abb. 2-3; A, Kurve a) kommt es dabei zu einem abnehmenden Signal. Die Steigung der Kurvenverläufe wurde über die erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit gegen die Temperatur ($-d\text{Signal}/d\text{Zeit}$) berechnet (Kurve b). Dadurch ergaben sich Maxima, die für die verschiedenen Amplikons spezifisch sind. Bei Auftreten einer Primerdimer-Bildung (B) oder unspezifischen Amplifikaten

wurden die PCR-Bedingungen weiter optimiert, bis nur noch spezifische Amplifikate in der Schmelzkurvenanalyse nachweisbar waren.

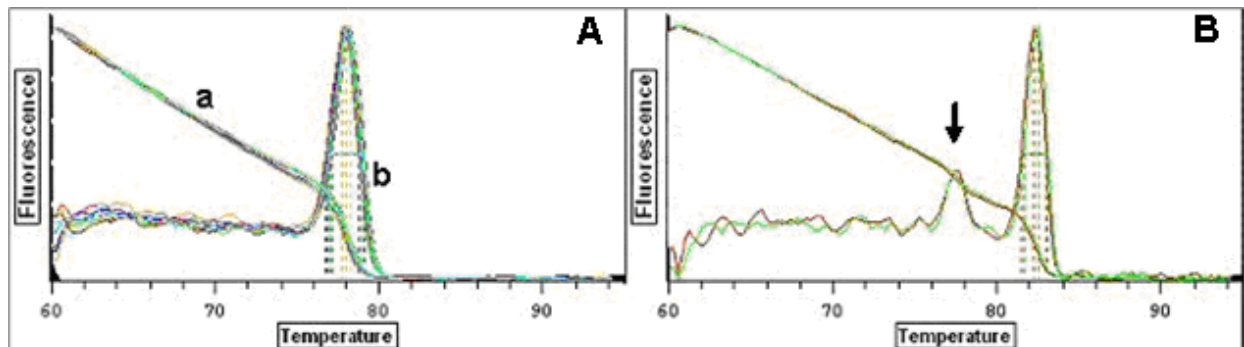


Abb.2-3: Schmelzkurvenanalyse des qRT-PCR Amplifikats. **A:** Dissoziationskurve der Fluoreszenz gegen die Temperatur (a) und erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit gegen die Temperatur ($-d\text{Signal}/d\text{Zeit}$) mit Ausbildung typischer Peaks für die Schmelzpunkte der spezifischen Amplikons (b). **B:** Beispiel für den Nachweis einer Primerdimer-Bildung.

2.3.12.2.6. Intra -und Inter -Assay Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit innerhalb eines Laufes wurde der Variationskoeffizient CV [%] für die Messung der C_T -Werte in Triplikaten herangezogen. Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde durch Wiederholung des qRT-PCR-Laufs an verschiedenen Tagen ermittelt. Ein Variationskoeffizient $\leq 5\%$ wurde als Qualitätsstandard herangezogen. Bei Überschreitung dieses Wertes wurde der PCR-Lauf wiederholt.

2.3.12.2.7. Linearität und Effizienz der Amplifikation

Für die Überprüfung der Linearität und Berechnung der Effizienz der Amplifikation wurde eine Verdünnungsreihe gepoolter cDNA der gesamten Untersuchungsreihe in Triplikaten (Pfaffl *et al.*, 2002) erstellt. Der lineare Korrelationskoeffizient wurde anhand einer Regressionsgeraden berechnet (Abbildung 2-4, A). Für die Berechnung der Effizienz der PCR wurde die eingesetzte Menge an cDNA in einer Verdünnungsreihe in logarithmischer Funktion gegen die C_T -Zykluszahl aufgetragen und die Effizienz der PCR aus der Steigung der Standardkurve nach der Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ berechnet (Rasmussen, 2001).

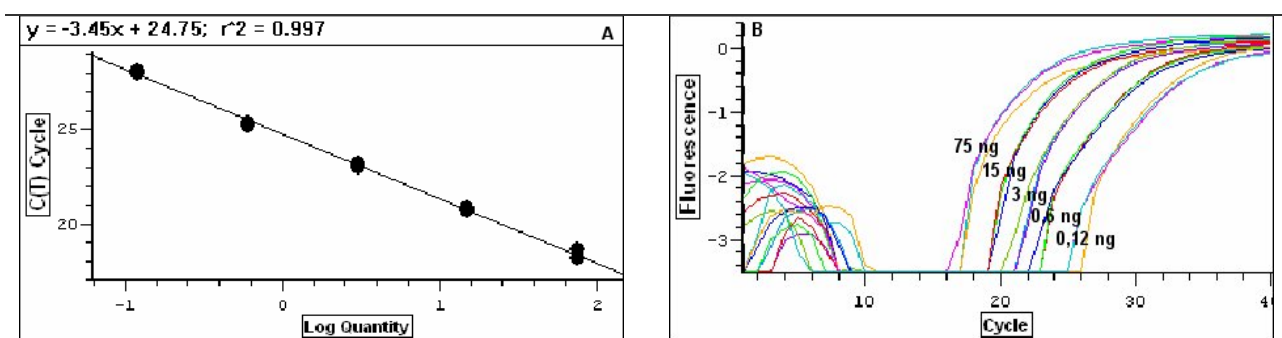


Abb. 2-4: Regressionsgerade einer Standardverdünnungsreihe in Triplikaten gepoolter cDNA (A) und logarithmische Darstellung der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl (B).

2.3.12.2.8. Quantitative Auswertung der qRT-PCR Daten

Die quantitative Analyse der qRT-PCR Daten beruht auf der Tatsache, dass unter optimalen Bedingungen die Menge an gebildetem Produkt bei jedem Zyklus der PCR verdoppelt wird. Somit ist die gebildete Produktmenge n zur Ausgangsmenge n_0 und zur Anzahl C der PCR-Zyklen direkt proportional und es gilt

$$n = n_0 \times 2^C$$

Da auch die Produktmenge und die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenz in direktem linearen Zusammenhang stehen, lässt sich aus der Fluoreszenz nach einer Zyklenzahl C auf die Ausgangsmenge n_0 schließen. Für den Vergleich mehrerer Proben wurde für das Fluoreszenzniveau ein konstanter Schwellenwert T (*Threshold*) definiert. Die Anzahl der Zyklen, bei der die verschiedenen Proben diesen Schwellenwert erreichen, bleibt als Veränderliche zurück. Der CT-Wert verhält sich dabei umgekehrt proportional zu der Ausgangsmenge n_0 , d.h. je niedriger der CT-Wert, desto höher ist die gesuchte Menge an Startmolekülen. Nach Anwählen der logarithmischen Darstellung der Fluoreszenzkurve wurden die CT-Werte der Proben mit dem Programm *Opticon Monitor 2.0* bzw. *3.0* bestimmt, indem die Hintergrundfluoreszenz der ersten Zyklen abgezogen und der Schwellenwert T im exponentiellen Teil der Kurve gesetzt wurde.

2.3.12.2.9. Statistische Analyse der qRT-PCR-Daten

Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die so genannte **$\Delta\Delta\text{CT}$ Methode** erfolgen. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CT- Wert des Referenzgens vom CT- Wert der Zielgens subtrahiert ($\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCT Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCT Wert der unbehandelten Kontrolle abgezogen. Bei diesem "*delta-delta CT*" Modell ergibt sich der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak. und Schmittgen, 2001). Die Voraussetzung für die Verwendung dieses Schemas ist eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus, was einer optimalen PCR-Effizienz von 2,0 in allen Proben entspricht. Eine realistische Effizienz liegt unter optimierten Bedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf. Geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen führen zu enormen Unterschieden in den Expressionsunterschieden (Light Cycler Relative Quantitation Software, 2001). Ausgehend vom obigen "*delta-delta CT*" Modell ist das **Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell** entwickelt worden, das die unterschiedlichen Effizienzen der experimentellen Proben berücksichtigt.

Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen (Zähler) und der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens (Nenner) zusammen.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta \text{CT Zielgen (Kontrolle - Behandlung)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta \text{CT Referenzgen (Kontrolle - Behandlung)}}$$

Ratio = Relatives Expressionsverhältnis

E_{target} = Effizienz der Amplifikation des Zielgens

E_{ref} = Effizienz der Amplifikation des Referenzgens

$\Delta \text{CT}_{\text{target}}$ = CT Differenz Kontrolle – Behandlung des Zielgens

$\Delta \text{CT}_{\text{ref}}$ = CT Differenz Kontrolle – Behandlung des Referenzgens

Ist das Referenzgen nicht reguliert, so sind die CT-Werte der behandelten Proben als auch der unbehandelten Kontrolle identisch und heben sich in der Analyse auf. Wenn der Wert des Nenners gleich eins wird, ist das berechnete Expressionsverhältnis nur vom Expressionsunterschied des Zielgens abhängig.

Die Expressionsunterschiede der bestrahlten und unbestrahlten Proben wurden über die Excel-basierte Berechnungssoftware REST[®] (*Relative Expression Software Tool*, Pfaffl *et al.*, 2002) berechnet, die eine gruppenweise Zusammenfassung der Expressionsergebnisse als Mittelwerte unter Verwendung von CT-Werten vornimmt. Dabei werden die mittleren Expressionsunterschiede der Gruppen, normalisiert über ein bestimmtes Referenzgen bzw. eine Gruppe von Referenzgenen, sowie die Varianzen der einzelnen Expressionsunterschiede berücksichtigt. Die statistische Auswertung der Daten basiert auf einem Normalverteilungs-unabhängigen Randomisierungstest.

2.3.12.3. TranSignal p53 Target Gene Array

In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor reguliert p53 die Expression verschiedener Gene durch Bindung an spezifische Zielsequenzen. Das Expressionsmuster von 146 humanen p53-abhängigen Genen wurde nach Bestrahlung mit Schwerionen mit Hilfe eines cDNA Expressionsarrays untersucht. Der *TranSignal p53 Target Gene Array* (Panomics, Redwood City, CA, USA) besteht aus positiv geladenen Nylonmembranen, auf denen einzelsträngige Oligonukleotide p53-abhängiger Gene und konstitutiv exprimierter Haushaltsgene in Duplikaten gespottet sind.

Zur Erstellung eines Expressionsmuster wurden mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase Biotin-gelabelte cDNA-Sonden aus unbestrahlter und bestrahlter RNA hergestellt, die anstelle von Uridin an jeder 20. bis 25. Stelle der Nukleotidkette Biotin-dUTP enthielten. Nach Hybridisierung der Biotin-markierten Sonden mit der Array Membran bei 42°C über Nacht, wurde die erfolgte Bindung unter Verwendung eines Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugates detektiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert u.a. die Oxidation von Luminolderivaten, was eine Freisetzung von Licht bewirkt. Die Membranen der bestrahlten und unbestrahlten Proben

wurden für wenige Minuten einem Röntgenfilm exponiert und die durch Chemilumineszenz erzeugten Signale der Membranen nach Normierung gegen ein Referenzgen und Hintergrundkorrektur densitometrisch ausgewertet. Um die gebundenen cDNA-Sonden zu entfernen und die Membranen für eine weitere Analyse zu nutzen, wurden diese im Anschluss an die Analyse jeweils einmal in Stripping-Puffer über eine Stunde bei 65°C inkubiert. Für die Kontrolle der Effizienz des Strippens wurden die gewaschenen Membranen erneut einem Röntgenfilm exponiert.

Stripping Puffer: 1M Tris-HCL (pH 8.0); 0,5 M EDTA und 0,5 ml 50x Denhardt's auf 500 ml Wasser

2.3.13. Isolierung, Auftrennung und Transfer von Proteinen

2.3.13.1. Proteinisolation mit RIPA-Puffer

Alle Schritte der Proteinisolation erfolgten auf Eis mit gekühlten Reagentien. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 600 µl RIPA-Puffer mit frisch zugefügten Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren aufgenommen, mehrmals durch eine 21G-Kanüle gezogen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Boden der Petrischale wurde mit 300 µl RIPA-Puffer nochmals gewaschen und beide Lysate vereinigt. Nach Zugabe von 10 µl Proteinaseinhibitor PMSF wurde das Zelllysate über 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Zellbestandteile bei 10.000 x g über 10 Minuten bei 4°C sedimentiert und der klare Überstand zur Proteinanalyse verwendet.

RIPA-Puffer: 1x PBS; 1% Igepal CA-630; 0,5% Natrium-Deoxycholate ; 0,1% SDS

Protease-Inhibitor Cocktail: (Sigma P2714) 250 µl pro 5 ml RIPA Puffer

Sodium Orthovanadate: (Sigma S6508) 100 mM Stocklösung, Gebrauchslösung 10 µl/ ml RIPA-Puffer

PMSF: (Alexis 270184) Stocklösung 10 mg/ ml in Ethanol; Gebrauchslösung. 10 µl/ ml RIPA-Puffer

2.3.13.2. Quantifizierung von Proteinen

Die Messung der Proteinkonzentration zytoplasmatischer Extrakte erfolgte mit Hilfe eines auf der Bradford-Methode basierenden *Protein Assays* nach Herstellerangabe (Biorad, München, Deutschland). Bei der Bindung des *Coomassie Brilliant Blue*-Farbstoffes an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Der *Coomassie Blue*-Farbstoff bindet an basische und aromatische Aminosäuren-Reste, speziell an Arginin. Die Absorptionzunahme ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Doppelstrahl-Photometer (U-3310, Hitachi, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) gemessen und die Proteinkonzentration unter Verwendung einer BSA-Eichkurve errechnet.

2.3.13.3. Elektrophorese und Western-Blotting der Proteine

Die Auftrennung der Proteine im Gel und der anschließende Transfer auf eine Nylonmembran wurden im *Phast System* (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) unter Verwendung

homogener 12,5%iger SDS-Polyacrylamid-Fertiggele durchgeführt. Zur Dissoziation der Proteine wurden die Proteinproben in einem SDS-haltigen Probenpuffer aufgenommen und über fünf Minuten bei 100°C erhitzt. Die optimale Probenkonzentration war anhand einer Verdünnungsreihe in Vorversuchen ermittelt worden. Als Standardmarker der Proteingröße wurde ein niedrigmolekularer Proteinmarker mitgeführt. Unmittelbar nach Beendigung der Protein-Elektrophorese wurde der Proteintransfer auf eine Nylonmembran (Nylonbind B, Serva, Heidelberg, Deutschland) im *Semi-Dry-Verfahren* bei 25 mA vorgenommen. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran mit 5% Blocking Reagenz abgesättigt und nach ausreichendem Waschen mit TBST mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBST wurde die Membran über eine Stunde mit dem sekundären Antikörper, *ECL Anti-Rabbit IgG*, nach Herstellerangabe inkubiert. Die jeweilige Inkubationszeit und Konzentration der Antikörper waren in Vorversuchen optimiert worden. Die Antikörper-Detektion erfolgte mit dem *ECL-Detektion-System* und wurde durch Exposition mit Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL) unter Variation der Belichtungszeit visualisiert. Zum Strippen der Membran wurde diese über 30 Minuten in Stripping Puffer bei 50°C inkubiert und anschließend in TBST-Puffer bei Raumtemperatur über zweimal 10 Minuten gewaschen. Nach Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Blocking Reagenz wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Entfernung der Antikörperbindung eine erneute Immunodetektion durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden über Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) bezogen.

Probenpuffer: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA (pH 8); SDS 2,5%; 5% 2-Mercaptoethanol; 5% Bromphenolblau 0,01%

Transfer Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin pH 8,3; 20% Methanol

Blocking Reagenz: 5% Trockenmilch; 0,1% Tween-20 in TBS

TBS-Puffer: 0,2 M Tris Base; 1,5 M NaCl (pH 7,2)

TBST-Puffer: TBS-Puffer mit 0,1% Tween 20

Stripping Buffer: 100 mM 2-Mercaptoethanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7)

Proteinmarker: *PageRuler*. Prestained Protein Ladder; SM0671, Fermentas GmbH

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Kultivierungsbedingungen

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank (*Hera safe*, Kendro, Berlin, Deutschland). Alle Zelllinien wurden als Monolayer-Kultur bei 37°C in einem CO₂-begasteten Brutschrank mit 5% CO₂ in Zellkulturflaschen oder Petrischalen kultiviert. Jede Zelllinie wurde in einem für sie optimierten Medium mit Zusatz von Antibiotika kultiviert (Tab. 2-4).

Tab. 2-4: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Zelllinie	Medium	Zusatz	Gehalt FCS** [%]	Antibiotika
MCF-7	Instamed®- Alphamedium*	3,2 g Glucose 2,0 g/l NaHCO ₃ 1 mM Na-Pyruvat 10 µg/ml bovines Insulin	10	5 ml Amphotericin B* (250 µg/ml) 5 ml Penicillin/Streptomycin* (10.000 IE / 10.000 µg/ml)
A549	Ham's F-12 K*	1,5 g/l NaHCO ₃ 2 mM L-Glutamin	10	5 ml Neomycin/Bacitracin* (1 mg / 50 U/ml)
AGS	Ham's F-12 K*	1,5 g/l NaHCO ₃ 2 mM L-Glutamin	10	
NHF	Instamed®- Alphamedium*	3,2 g Glucose 2,0 g/l NaHCO ₃	15 - 20	*Biochrom, Berlin ** FCS = Fetales Kälberserum

2.4.1.1. Subkultivieren der Zellen

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die adhärent wachsenden Zellen mit Hilfe des proteolytisch wirkenden Enzyms Trypsin passagiert. Dazu wurde der Zellrasen in Phosphatpuffer (PBS, *phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend, je nach Fläche des Kulturgefäßes, mit bis zu 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die abgerundeten Zellen durch Resuspendieren vereinzelt und die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellzahl einer 1:10 Verdünnung in PBS wurde visuell in der *Fuchs-Rosenthal-Zählkammer* bestimmt. Bei der Aussaat der Zellen wurde die Zelldichte der MCF-7-Zellen auf 5×10^4 Zellen/cm² und der AGS- und A549-Zellen auf 2×10^4 Zellen/cm² eingestellt. Ein Wechsel des Mediums erfolgte nach 3-4 Tagen, eine Passage in neue Kulturgefäße nach 7 Tagen.

5x PBS: 80g NaCl; 2g KCl; 14,4g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 2g KH₂HPO₄ ad 2000 ml Aqua dest.

10x Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05%/ 0,02%ig in PBS (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)

2.4.1.2. Wachstumskinetik der verwendeten Zelllinien

Zur Erfassung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl in Petrischalen (Ø 6 cm) ausgesät. Jeweils morgens und abends wurden die Zellen trypsiniert und in einer *Fuchs-Rosenthal* Zählkammer gezählt. Die Verdopplungszeit (VZ) der

jeweiligen Zelllinien wurde anhand der Steigung der Regressionsgeraden innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase berechnet.

2.4.1.3. Erfassung der zellkinetischen Daten der Zelllinien aus Primärzellen

Der Zeitraum zwischen Aussaat und Ernte der Fibroblasten betrug im Allgemeinen sieben Tage. Danach wurden neue Subkulturen angelegt. Jedem Transfer in der Massenkultur wurde eine fortlaufende Passagenzahl zugeordnet. Von Passage zu Passage wurden die Daten Aussaat (N_0), Ernte (N) und die Dauer des Wachstums zwischen zwei Passagen (t) erfasst, aus denen die in Tabelle 2-5 aufgeführten zellkinetischen Daten gewonnen werden konnten. Der Zeitpunkt der Konfluenz ist neben dem Alter der Zellen vor allem von der Aussaatdichte abhängig. Anhaltspunkt für die Errechnung des Alters und somit für die Vitalität der Zellen ist die so genannte kumulative Populationsverdopplung (KPD). Für die Arbeit mit Zelllinien aus primären, diploiden menschlichen Fibroblasten gilt: Nähert sich die KPD der Zahl 50, so gehen die Zellen einer Seneszenzphase entgegen und zeichnen sich durch eine zunehmende Teilungsträgheit aus (Hayflick, 1975). In diesem Stadium wurden keine weiteren Experimente durchgeführt und die Zellen durch frisch aufgetaute Zellen der gleichen Linie mit geringerer KPD-Zahl ersetzt.

Tabelle 2-5: Erfassung der zellkinetischen Daten der aus Primärzellen etablierten Fibroblastenzelllinie NHF

Zellteilungen pro Passage (n)	$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$
Teilungsrate (r)	$r = \frac{n}{t}$
Mittlere Generationszeit (g)	$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{r}$
Vermehrungsfaktor (V)	$V = \frac{N}{N_0}$
Kumulative Zellzahl (KZZ)	$KZZ_i = N_0 \times V_1 \times V_2 \dots \times V_i$
Kumulative Populationsverdopplungen (KPD)	$KPD = \sum_1^i n$

2.4.1.4. Gefrierkonservierung der Zellen

Stammkulturen aller Zelllinien bzw. transfizierter Zellklone wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen /ml gelagert. Um Zellschäden durch langsame Veränderung der Eiskristalle zu minimieren, wurden die Zellen in definierter Zellzahl nach Zentrifugation bei $80 \times g$ in Konservierungsmedium mit 10 % kryoprotektivem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Kryoröhrchen wurden zunächst 24 h in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Aussaat der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und die Zellsuspension in 20 ml Medium aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Wechsel des Mediums.

2.4.2. Messung der Fluoreszenz im Mikrotiterplattenfluorimeter

Die EGFP-Fluoreszenz stabil transfizierter Zellen wurde im MTP-Fluorimeter Lamda Fluoro 320 (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) gemessen. Dazu wurde eine EGFP-Filterkombination der Anregungs- und Emissionsfilter von 460/30 und 508/20 bzw. 485/20 und 535/25 verwendet.

2.4.3. MTT-Test

Alle Zellen mit messbarer Mitochondrien-Aktivität, d.h. lebende und frühe apoptotische Zellen, überführen das schwach gelbe Tetrazolium-Salz MTT mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen in einen kolorimetrisch messbaren blauen Formazan-Komplex (Mossmann, 1983). Da dieser Komplex nicht membranpermeabel ist, wird er in den Zellen zurück gehalten und kann bei einer Absorption von 562 nm im Plattenfluorimeter detektiert werden. Die Intensität der Blaufärbung korreliert dabei mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Der Test wurde neben anderen zur Untersuchung der Zelllinien auf Proliferation und Lebensfähigkeit nach Bestrahlung und Chemotherapeutika eingesetzt.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma M5655)

Mischung für Zellyse und Auflösung des Formazans: 99,4 ml DMSO; 0,6 ml Essigsäure; 10 g SDS

2.4.4. Test auf Mykoplasmenbefall

Mykoplasmen zählen zu den kleinsten, selbst vermehrungsfähigen Prokaryonten. Die meist extrazellulär (Ausnahme: *M. penetrans*) vorkommenden Einzeller mit einfacher Plasmamembran inhibieren die Zellproliferation befallener Kulturen durch Nährstoffentzug und Sekretion schädlicher Stoffwechselprodukte um bis zu 50% (McGarrity *et al.*, 1984). Sie beeinflussen nahezu alle Funktionen des Metabolismus der Wirtszelle und stellen ein ernsthaftes Problem in der Zell- und Molekularbiologie dar. Insbesondere die durch den Menschen übertragene Formen (*M. orale*), aber auch durch andere Quellen wie Fetales Kälberserum (*M. bovinis*) hervorgerufene Kontaminationen, führen zu einem hohen Durchseuchungsgrad von Mykoplasmen in der Zellkultur (Uphoff und Drexler, 2002). Da Mykoplasmen nur zu einem geringen Anteil an der Zellaußenwand anhaften und nur in seltenen Ausnahmen intrazellulär auftreten, stand für die routinemäßig durchgeführte PCR im Zellkulturüberstand ausreichend amplifizierbare DNA zur Verfügung. Für die Durchführung eines Routinetests wurden 200 µl Zellkulturüberstand in ein steriles Reaktionsgefäß gebracht und bei 99°C über 5 Minuten inkubiert. Nach ultrakurzer Zentrifugation wurden 2 µl des Zellkulturüberstands in die PCR eingesetzt. Die zur Amplifikation verwendeten Primer wurden aus Bereichen hoch konservierter Regionen der 16S rRNA gewählt

(Wong-Lee und Lovett, 1993). Ergebnisse dieser Arbeit wurden ausschließlich mit Mykoplasmen-freien Kulturen erzielt.

Primer Mycoplasma fwd: GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG

Primer Mycoplasma rev: CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G

2.4.5. Gentechnische Methoden in der Zellkultur

2.4.5.1. Stabile Transfektion

Bei der stabilen oder permanenten Transfektion wird die transfizierte DNA ins Genom der Empfängerzelle integriert. Im Gegensatz zur transienten Transfektion, bei der die transfizierte DNA extrachromosomal in der Zelle vorliegt, kommt es hier zu einer Weitergabe mit dem Genom an die nachfolgenden Zellgenerationen. Zur Transfektion wurden 6 µl FuGENE® (Roche, Mannheim, Deutschland) in 94 µl Serum-freiem Medium und 0,5 bis 2 µg DNA über 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Liposomen-Komplex unter leichter Bewegung auf einen zu 60% konfluenten Zellrasen gegeben. Nach 48 Stunden Wachstum im Brutschrank wurden die Zellen in Selektionsmedium mit Geneticin über 10 Tage kultiviert.

2.4.5.2. Selektion stabil transfizierter Zellen

Die Isolierung stabiler, hoch exprimierender Säugerzellen ist ein zeitaufwendiger Prozess, der die Kultivierung und Testung vieler Zellklone erfordert. Dazu wird gleichzeitig mit der Gensequenz, die für das zu untersuchende Gen kodiert, die Information für ein Enzym übertragen, die ein für eukaryote Zellen toxisches Selektionsantibiotikum inaktiviert. Die verwendeten Reportervektoren kodieren für ein Enzym aus der Gruppe der Aminoglykosid-3'-phosphotransferasen (APH (3')), die entsprechende Antibiotika im Wachstumsmedium inaktivieren können. Zur Selektion transfizierter Säugerzellen wurde das Aminoglykosidantibiotikum Geneticin (G418) eingesetzt. Geneticin bindet an 80S-Ribosomen und hemmt die Translation. Der nötige Zeitraum um Zellen abzutöten, variiert mit der Aussaatdichte, dem proliferativen Status und der verwendeten Medienformulierung. Da auch die effektive Dosis des Antibiotikums bei verschiedenen Zelltypen variiert, musste zuvor die Geneticin-Toleranzdosis bestimmt werden. Dieser Wert wurde für jede Charge des Antibiotikums neu ermittelt.

Für den Erhalt stabil transfizierter Klone wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion trypsinisiert und in Petrischalen (Ø 10 cm) mit je 10 ml Selektionsmedium überführt. Nach 10-15 Tagen waren sichtbare Kolonien herangewachsen. Diese wurden nach Trypsinierung derart vereinzelt, dass statistisch gesehen jede Vertiefung einer 96-well Platte ausgesät jeweils eine Zelle beinhaltete. Nach weiteren 14 Tagen waren aus den Einzelzellen Makrokolonien herangewachsen. Konstitutiv EGFP exprimierender Kolonien konnten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops leicht identifiziert werden, während die mit den induzierbaren Vektorsystemen transfizierten Zellen erst nach Induktionsversuchen eindeutig beurteilt werden konnten.

Geneticindisulfat Stammlösung: 5 g gelöst in 20 ml 100 mM Hepes pH 7,3

2.4.6. Bestrahlungseinrichtungen und Dosimetrie

2.4.6.1. Exposition mit Röntgenstrahlen

Die Bestrahlungsexperimente mit Röntgenstrahlen wurden unter jeweils gleichen Bedingungen an einer *Müller MG 150 Röntgenröhre* (Philipps, Hamburg) mit einem Kathodenstrom von 19 mA und einer Röhrenspannung von 150 kV durchgeführt. Dosis und Dosisleistung wurden mit dem Strahlungsdosimeter *WK92G* (Wellhöfer Dosimetrie, Schwarzenbruck) gemessen. Die Dosisleistung wurde durch Variation des Abstands der Zellen zum Strahlungsfenster der Röntgenröhre auf 1,69 Gy /min eingestellt. Dieser Focus-Objekt-Abstand (31 cm) wurde bei allen weiteren Bestrahlungen konstant gehalten. Die Zellen wurden entweder als Monolayer oder nach Trypsinbehandlung als Zellsuspension bestrahlt. Dabei wurden die Zellkulturgefäße im zentralen Strahlungsfeld der Röntgenröhre angeordnet.

2.4.6.2. Exposition mit Alpha-Teilchen

Bestrahlungsexperimente mit dicht-ionisierenden Alpha-Teilchen (2,1 MeV, LET 160 keV/ μm) wurden am Mikrostrahlplatz der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig unter der Leitung von Hrn. Dr. Klaus Greif durchgeführt. Die computergesteuerte Anlage erlaubt eine mikrometeregenaue Auslenkung des Strahls. Die Dosimetrie erfolgte über eine CR39-Spurdetektion. Zur Untersuchung der strahleninduzierten Genexpressionsänderung in A549-Zellen wurden die Zellen auf den mit einer Biofolie versehenen Bestrahlungsträgern mit einer Fläche von 0,502 cm² aufgebracht (Abb. 2-5).

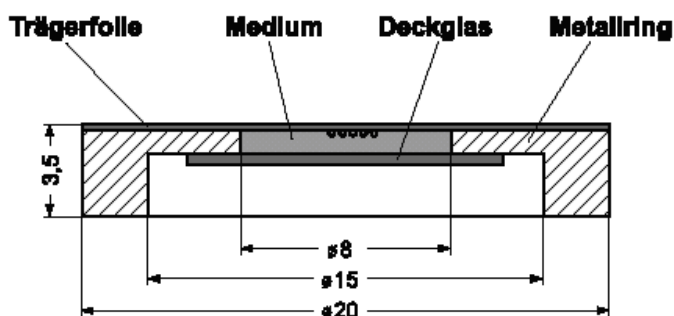
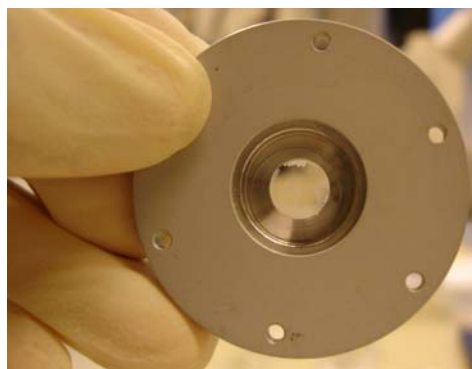


Abb 2-5: Mikroträger für die Bestrahlung mit Alpha-Teilchen

Bei einer Flächenbestrahlung mit 5×10^6 Alpha-Teilchen pro cm² entsprach dies bei einer Aussaatdichte von 40.000 Zellen pro Träger und einer durchschnittlichen Kerngröße von 247,1 (\pm 5) μm^2 durchschnittlich 12,4 Treffern pro Zellkern. Setzt man ein zylindrisches Zellvolumen mit einer Zelldicke von $\leq 5 \mu\text{m}$ voraus, so beträgt die absorbierte Dosis in etwa 100 mGy je appliziertem Alpha-Teilchen, also 1,24 Gy bei 5×10^6 Partikeln /cm². Der Aufbau des Experimentierplatzes der Mikro-Ionenstrahlanlage der PTB ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

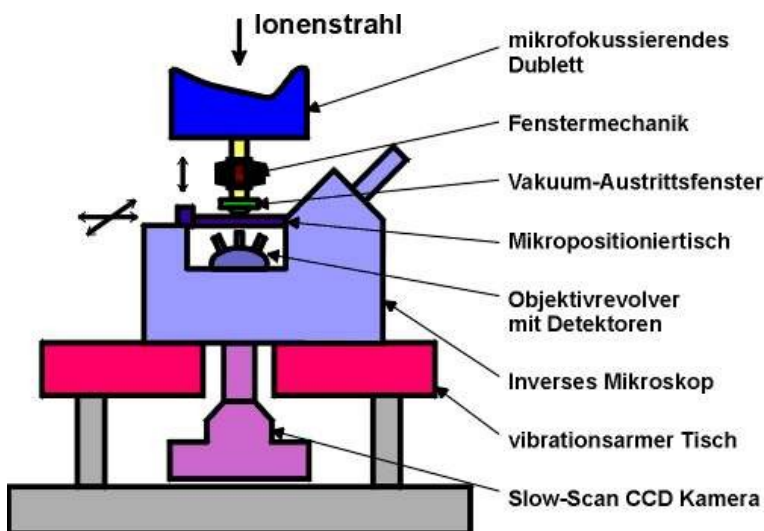


Abb. 2-6: Experimentierplatz des Mikro-Strahl-Einrichtung der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB). Mit freundlicher Genehmigung Dr. Klaus Greif

2.4.6.3. Exposition mit Schwerionen

Eine Möglichkeit der Simulation einzelner Komponenten der kosmischen Strahlung ist durch die Nutzung von Schwerionenbeschleunigern gegeben (Durante und Kronenberg, 2005). In Deutschland wird eine solche Anlage von der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt betrieben. Von besonderem Interesse innerhalb Europas ist die Arbeit am Schwerionenbeschleuniger GANIL (*Grand Accélérateur National d'Ions Lourds*; Caen, Frankreich), wo Bestrahlungsmöglichkeiten beschleunigter Ionen mit Energien in der Nähe des so genannten *Bragg-Peaks* angeboten werden. Bei der an ein Target abgegebenen Energie erreicht die Energiedeposition entlang der Wegstrecke an diesem Punkt ihr Maximum.

Am Schwerionenbeschleuniger GANIL (Abb. 2-7) wurden Experimente mit hochenergetischen Argon-, Kohlenstoff- und Blei-Ionen in A549 und MCF-7 Zellen durchgeführt. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden nach Transport wurden die Zellen in einem definierten Zellvolumen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden Bestrahlungsexperimente mit Argon-Ionen (36 Ar, 95 MeV/amu, LET-Wert 232.2 keV/μm); Blei-Ionen (208 Pb, 29 MeV/amu, LET-Wert 13000 keV/μm) und Kohlenstoff-Ionen (13 C, 75 MeV/amu, LET-Wert 29,28 KeV/μm) durchgeführt. Die Dosimetrie wurde von Dr. Isabelle Testard (*CIRIL, Centre Interdisciplinaire de Recherche Ions Lourds*, Caen, Frankreich) über einen CR-39 Spurnachweis mittels Ätztechnik durchgeführt.

Bestrahlungsexperimente mit beschleunigten, schweren Ionen wurden je nach Reichweite der Strahlung entweder in handelsüblichen Zellkulturflaschen aus Polystyrene (Argon- und Kohlenstoff-Ionen) oder speziellen Zellkulturschalen (Blei-Ionen) mit einem 25 μm dicken Folienboden aus Fluorocarbon (Iumox™, Greiner) durchgeführt.



Abb. 2-7: Blick auf das Zyklotron CSS des Schwerionenbeschleunigers GANIL (links) und Bestrahlungseinrichtung für Zellkulturproben mit Proben im Strahlfenster (rechts).

Die im Ionenstrahl ursprünglich abgegebene Energiemenge wird beim Durchtritt durch Materie durch verschiedene Mechanismen geschwächt. Unter Berücksichtigung der Dichte der verschiedenen Materialien wurde die Energiemenge berechnet, die auf das Target, d.h. die Zellen trifft. Zur Berechnung der Werte wurde das Programm *LET124* (Brookhaven National Laboratory's Tandem Van de Graaff Accelerator Facility, USA) verwendet.

Tab. 2-6: Energieverlust des Ionenstrahls nach Passieren verschiedener Materialien des Strahlaustrittsfensters. Die Ausgangsenergie des Ionenstrahls und die auf das Target abgegebene Energie sind hervorgehoben.

	Materie	Dichte [g/cm ³]	C13 [MeV/amu]	Ar 36 [MeV/amu]	Pb 208 [MeV/amu]
Ausgangsenergie			75	95	29
Detektor 1	Al 1,6 µm	2.71	74.99	94.79	28.87
	Ti 1 µm	4.705	74.98	94.76	28.74
Detektor 2	Zr 25 µm	6.51	74.73	94.06	24.85
Austrittsfenster	Inox 12,5 µm	8.023	74.58	93.67	22.57
Luft	1 cm	0.0013	74.56	93.56	22.08
Petrischale	800 µm	1.05	72.44	87.75	----
Lumox TM	25 µm	2.15	74.45	93.26	20.18

2.4.6.4. Exposition mit UV-Strahlen

Bestrahlungsexperimente mit UV-C wurden mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe Typ NN8/15 (Haereus, Kendro Laboratory Products, Berlin) durchgeführt. Die Hauptemissionslinie des Strahlers liegt bei 253,7 nm und wurde spektrometrisch bestimmt. Die Bestrahlungsstärke

wurde mit dem *UVX-25 Radiometer* (Ultra-Violet Products, San Gabriel, USA) mit einer kalibrierten Wellenlänge von 254 nm auf 50 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ eingestellt. Dieser Wert entspricht einer Bestrahlungsstärke von 0,5 $\text{J}/\text{m}^2 \times \text{s}$. Während der Bestrahlung wurde das Wachstumsmedium gegen PBS ersetzt.

2.4.7. Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit

2.4.7.1. Koloniebildungstest

Zellen vermehren sich und bilden dabei *in vitro* makroskopisch sichtbare Kolonien. Durch Strahlenschäden nimmt die proliferative Kapazität ab und es kommt zum reproduktiven Zelltod betroffener Zellen. Der Koloniebildungstest nach Puck und Marcus (1956) ist der methodische Standard für *in vitro* Untersuchungen in Strahlenbiologie und Medikamentenforschung. Er findet Anwendung bei Mikroorganismen wie Bakterien, Algen und Hefen als auch bei Säugerzellen. Zur Durchführung des Tests wurden Zellen in geeigneter Weise verdünnt und Zellzahlen von 100 bis 2×10^6 Zellen in Petrischalen geeigneter Wachstumsfläche plattiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen der zu untersuchenden Strahlung in unterschiedlichen Dosen ausgesetzt. Die überlebenden Zellen wuchsen in einem Zeitraum von 9-16 Tagen zu auswertbaren Makrokolonien heran. Zur Anfärbung der Kolonien wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums in PBS gewaschen und für 20 Minuten in der Fixier- und Färbelösung (10% Formaldehyd, 0,1% Kristallviolett) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Wasser gespült und getrocknet. Die Versuchsauswertung erfolgte unter einer Stereolupe mit 32-facher Vergrößerung. Es wurden nur solche Zellen als überlebend definiert, die im gewählten Zeitraum mindestens 50 Tochterzellen bilden konnten.

Trägt man im halblogarithmischen Maßstab das relative Überleben der Zellen nach Bestrahlung gegen die Bestrahlungsdosis auf, erhält man die für jeden Zelltyp charakteristischen Dosis-Effektkurven (Abb. 2-8). Diese beginnen oft mit einem flach verlaufenden Anteil, der dann in einen geraden, exponentiellen Teil übergeht. Der als „Schulter“ bezeichnete Anfangsteil der Kurve gibt Hinweise auf die individuelle Reparaturkapazität der Zellen. Für die mathematische Beschreibung der Kurvenverläufe und der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit, wird das *Dq/D₀-Modell* angewendet. Zur Charakterisierung einer Dosiseffektkurve wird diese durch drei Kenngrößen D_0 , Dq und n beschrieben, die nach logarithmischer Transformation der Überlebenswerte über eine lineare Regression für den linearen Teil der Kurve berechnet werden. Die Kenngröße D_0 ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden ($-1/m$).

Der Schnittpunkt der Geraden mit der 100%- oder 10^0 -Abzisse (entspricht dem Überleben der unbestrahlten Kontrolle) ist die Dosis Dq . Sie ist ein Maß für die Breite der Schulter und somit für die Reparaturkapazität der Zellen. D_0 ist ein Maß für die Strahlendosis, die das Zellüberleben im exponentiellen Teil auf $1/e$ reduziert und wird auch als „wahre“ Strahlenempfindlichkeit bezeichnet, da in diesem Dosisbereich Erholungsvorgänge eine untergeordnete Rolle für das Überleben spielen. Extrapoliert man den linearen Anteil der halblogarithmischen Kurve auf die

Dosis 0, so ergibt der Koordinatenabschnitt die Extrapolationszahl n . Die drei Kenngrößen stehen miteinander in folgender Beziehung: $Dq = D_0 \times \ln n$.

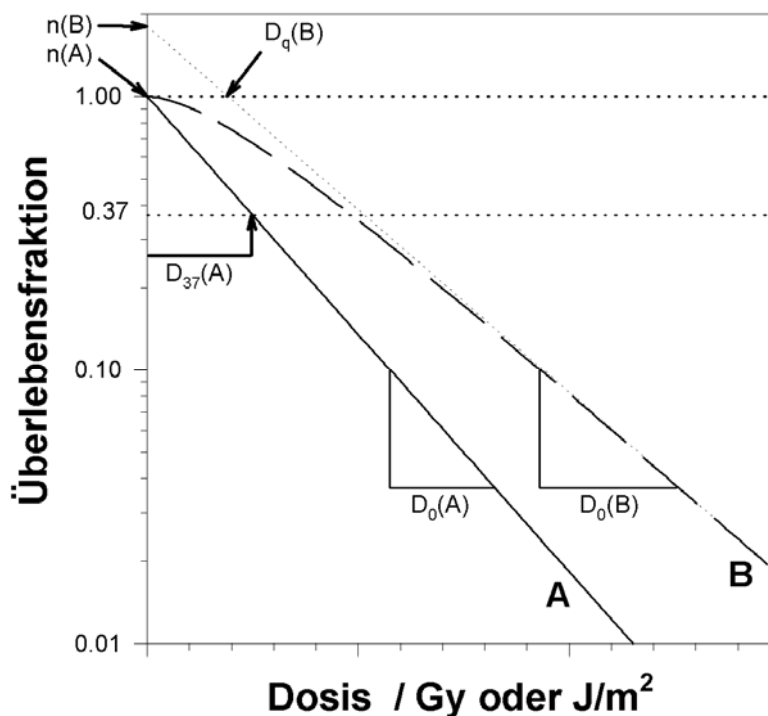


Abb. 2-8: Kenngrößen der Dosis-Effekt-Kurven: Der D_0 -Wert wird aus dem Kehrwert der Steigung des linearen Anteils der Dosis-Effekt-Kurve errechnet. Je flacher die Überlebenskurve abfällt, desto größer ist D_0 . Der D_{37} -Wert gibt die Dosis an, die benötigt wird, um das Überleben auf $1/e = 37\%$ zu reduzieren. Die Breite der Schulterkurve wird durch die Extrapolationszahl n charakterisiert. Extrapoliert man den linearen Anteil der halblogarithmischen Dosis-Effekt-Kurve auf die Dosis 0, so ergibt der Ordinatenabschnitt die Extrapolationszahl n . Der Quasischwelldosiswert D_q wird aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Gerade mit der 100 %-Überlebenslinie ermittelt und ist ebenfalls ein Maß für die Breite der Schulter der Dosis-Effekt-Kurve.

Die Auswertung der Überlebensdaten mit Berechnung der Dosis-effekt-Kurven erfolgte mit dem Statistikprogramm DOSE (Dr. Christa Baumstark-Khan, DLR, Köln). Für die statistische Behandlung der Daten wurden für jede Zelllinie mindestens drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt, innerhalb derer jeweils sechs Petrischalen pro Dosis verwendet wurden. Die relativen Überlebenswerte jeweils einer Dosis wurden zusammengefasst und Mittelwert und Standardabweichung berechnet, die halblogarithmisch gegen die Dosis aufgetragen wurden.

Aus den Ergebnissen verschiedener Versuchsreihen wurden mit statistischen Standardverfahren (Varianzanalyse, F-Verteilung, Regressionsanalyse, Vergleich der Regressionskoeffizienten mittels Student's-t-Test-Verfahren) die Parameter der Dosis-effekt-Kurve ermittelt und auf Signifikanzen überprüft (Woods *et al.*, 1982; Weichselbaum *et al.*, 1980). Für die statistische Behandlung der Daten wurde das Signifikanzniveau auf $2p \leq 0,05$ festgelegt.

2.4.7.2. Fluoreszenz Analyse der DNA-Entwindung (FADU)

Die FADU-Methode (**F**luorescent **A**nalysis of **D**N**A** **U**nwinding) beruht auf der zeitabhängigen Entwindung von DNA-Doppelsträngen durch Lösen von Wasserstoffbrücken in alkalischer Lösung (Birnboim und Jevcak, 1981) und erlaubt die Erfassung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie alkalilabile Läsionen.

Zur quantitativen Bestimmung der durch Strahlung induzierten Strangbrüche wurden die Zellen in einer Kulturflasche mit 80 cm² Wachstumsfläche bis zum Erreichen von etwa 80% Konfluenz kultiviert. Alternativ wurde die FADU-Methode in Mikrotiterplatten als μ -FADU durchgeführt (Baumstark-Khan *et al.*, 2000). Die lysierten Zellen wurden zur Unterbindung schneller Reparaturprozesse vor Versuchsstart auf 4°C herunter gekühlt und anschließend auf einem mit Eis gefüllten Metallblock additiv bestrahlt. Es wurden ausschließlich eisgekühlte Reagenzien und Materialien verwendet. Die Zellen wurden für 30 Minuten einem alkalischen Milieu ausgesetzt, in dem die DNA von Proteinen befreit wird und die Denaturierung der DNA eingeleitet wird. Die Spaltung der DNA-Moleküle beginnt an deren Enden, an den Einzel- oder Doppelstrangbrüchen sowie an alkalilabilen Stellen, die beispielsweise durch Verlust einer Base entstanden sind. Auch Replikationsgabeln dienen als Ansatzpunkte. Somit besteht ein direkt proportionales Verhältnis zwischen der Anzahl der Strangbrüche und der Menge an Einzelstrang-DNA. Eine Ultraschallbehandlung nach Neutralisation verhindert ein Wiederverknüpfen der DNA. Zur quantitativen Analyse der induzierten Strangbrüche wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid behandelt (Hoechst 33258) und die Fluoreszenz im Plattenfluorimeter gemessen (Exzitation 355 nm, Emission 460 nm). Bisbenzimid lagert sich bevorzugt zwischen den Adenin-Thymin Basenpaare der doppelsträngigen DNA an. Da der Adenin-Thymin-Gehalt diploider Zellen so gut wie konstant ist, hat die Affinität des Bisbenzimid keinen Einfluss auf die Bestimmung der Fluoreszenz, sondern nur die Anzahl der Gesamtstrangbrüche.

Experimentell wurden die Proben in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: Die **P-Werte** stellen die Messwerte der Proben dar, deren DNA unter dem Einfluss von Bestrahlung, anderer DNA-schädigender Agentien und der Einwirkung von NaOH unterschiedlich stark denaturiert und damit entspiralisiert wurde. Diese Proben wurden 30 Minuten in 0,1 molarer NaOH-Lösung bei 37°C inkubiert, anschließend durch 0,1 molare HCl-Lösung neutralisiert und mit Ultraschall (*Branson Sonifier Cell Disrupter*, Dietzenbach, Deutschland) behandelt. Die **T-Werte** stellen die Messwerte der Proben ohne Vorliegen einer DNA-Denaturierung dar. Diese Proben wurden in 0,1 molarer NaOH-Lösung aufgenommen und sofort im Anschluss mit 0,1 molarer HCl-Lösung neutralisiert. Nach Inkubation bei 37°C über 30 Minuten wurden die Proben mit Ultraschall behandelt. Bei den **B-Werten** handelt es sich um die Messwerte der Proben mit maximaler DNA-Denaturierung. Die DNA liegt nur in einzelsträngigen DNA-Bruchstücken vor. Dazu wurden die Proben mit 0,1 molarer NaOH-Lösung versetzt und mit Ultraschall behandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C und Neutralisation mit 0,1 molarer HCl-Lösung folgte eine zweite Ultraschall-

behandlung. Nach Zugabe des Bisbenzimid-haltigen FADU-Puffers wurde die Fluoreszenz gemessen und die Daten nach der Formel von Kanter (1982) ausgewertet.

$$F = \frac{P - B}{T - B}$$

F: Verhältnis noch vorhandener doppelsträngiger DNA zur Gesamt-DNA

T: T-Werte der Proben ohne DNA-Denaturierung

P: P-Werte der Proben, die durch DNA-Schädigung teilweise denaturiert wurden

B: B-Werte der Proben nach vollständiger Denaturierung der DNA

Es gilt: $T \geq P \geq B$

Für jede Zelllinie wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt, die Werte der einzelnen Dosen zusammengefasst und einer statistischen Auswertung zugeführt. Nach Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung wurde der relative Anteil doppelsträngiger DNA der behandelten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe halblogarithmisch gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt.

2.4.7.3. Visualisierung von Doppelstrangbrüchen mittels γ -H2AX Antikörperfärbung

Eine der ersten messbaren Antworten der Säugerzelle auf eine Doppelstrangbruch-Induktion ist die Phosphorylierung einer Variante des hoch konservierten H2A-Histons, des Histons H2AX, in der Umgebung des Bruchs zum so genannten γ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998; Paull *et al.*, 2000). Mittels γ -H2AX-spezifischen Antikörpern können γ -H2AX Foci innerhalb weniger Minuten immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Zellen konfluent bewachsener Deckgläser (\varnothing 12 mm) wurden nach unterschiedlichen Reparaturzeiten nach Bestrahlung in 3,5% Formaldehyd über 30 Minuten fixiert und nach Waschen in PBS mit 0,5% Triton X-100 über 30 Minuten auf Eis permeabilisiert. Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrunds wurden die Zellen nach Waschen in PBS mit 1% BSA in 50% FCS über eine Stunde inkubiert. Nach Inkubation mit dem primären *Anti-phospho-H2AX* Antikörper über eine Stunde wurden die Zellen nach ausgiebigem Waschen in PBS über eine weitere Stunde mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, die Präparate in Mowiol eingebettet und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

3,5% Formaldehyd: in PBS, pH 7,4

0,5% Triton X-100: in PBS mit 1% BSA

50% FCS: Fetales Kälberserum in PBS

DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol): 0,1 μ g / ml in PBS

Primärer Antikörper: Human Anti-phospho-H2AX, (Upstate, Katalog Nr. 07-164)

Sekundärer Antikörper: TRITC-conjugated Swine Anti-Rabbit Immunglobulins (DAKO R0156)

Mowiol Mounting Medium: 10% Mowiol; 25% Glycerin; 100 mM TRIS/HCl pH 8,5; 2,5% DABCO

2.4.8. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bestimmt für eine Population aus mehreren Tausend Zellen verschiedene Parameter wie Zellmorphologie und Fluoreszenzintensität. Dazu werden die Zellen in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom im Zentrum einer Messzelle fokussiert. Im Sensormodul passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl (Argon 488 nm) und emittieren dabei Streulicht. Außer den Standardparametern Größe und Granularität kann entweder die Eigenfluoreszenz (z.B. Eosinophile oder GFP) oder die nach Färbung mit einem fluorochrom markierten Antikörper emittierte Fluoreszenz detektiert werden.

Streulicht (Scatter) entsteht, wenn Partikel einfallendes Laserlicht beugen und wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Je nach Winkel der Streulicht-Detektion erhält man unterschiedliche Informationen: Das Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter, FCS*) wird in Richtung des einfallenden Laserstrahls detektiert und ist proportional der Zelloberfläche bzw. Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*Side scatter, SSC*) entsteht an Grenzflächen in der Zelle mit einem geänderten Brechungsindex (Zellmembran, Zellkern, granuläres Material in der Zelle usw.) und wird im 90° Winkel zum einfallenden Laser detektiert. Die vom optischen System des FACS Gerätes fokussierten und getrennten Lichtsignale treffen auf die Detektoren und erzeugen elektrische Signale proportional zur Intensität des einfallenden Lichts. Ein Analog-/Digitalverstärker konvertiert die in Volt registrierten Signalintensitäten für jeden Messparameter in eine Klassenzahl (Kanalzahl; 256 oder 1024 Kanäle), die am Computer über eine angeschlossene Software weiter verarbeitet werden. Die Verstärkung erfolgt entweder linear (Scatter) oder logarithmisch (Fluoreszenz). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mit dem *FACScan* Gerät (*Fluorescence activated cell sorting*) gewonnen und mit der angeschlossenen *CellQuestTM* Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

2.4.8.1. Messung der EGFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer

Zur Messung der EGFP-Fluoreszenz wurden die Zellen nach Trypsinieren und Pelletieren in PBS mit 3,5% Formaldehyd aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Die Analyse der Fluoreszenz wurde im Kanal FL-1 bei 530/30 nm Bandpassfilter vorgenommen und die Darstellung der Daten einer Einzelmessung aus 20.000 Zellen graphisch mit dem Programm WinMDI V2.8 (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*) von Joe Trotter (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA) vorgenommen.

2.4.8.2. Auswertung durchflusszytometrischer Ergebnisse

Um mit einem Mittelwert oder Median sinnvolle quantitative Aussagen treffen zu können, wurde die gesamte zu erfassende Population von 20.000 Zellen in einem Dot Plot abgebildet. In dieser FSC-SSC Darstellung (Abb. 2-9) wurde ein morphologischer Bereich (*region*) definiert, der nur vitale Einzelzellen repräsentiert und Bereiche, die Zellfragmente, Detritus oder Zellcluster aus der

weiteren Analyse ausschließt. Durch die Beschränkung auf diesen Bereich (*gate*) bei der Darstellung der Fluoreszenzintensität in einem Histogramm war es nunmehr möglich, alle Extreme vitaler Zellen zu erfassen.

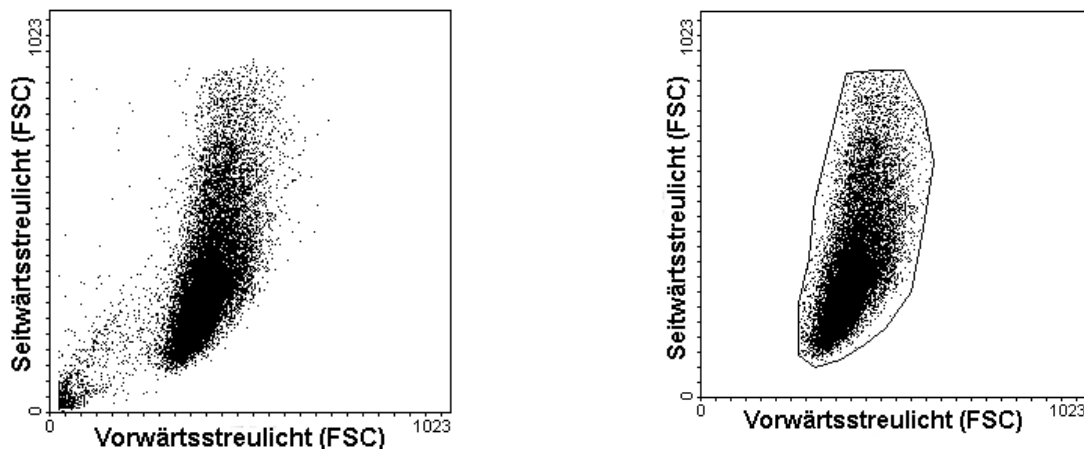


Abb. 2-9: FCS-SSC Darstellung einer Gesamtpopulation von 20.000 Zellen (links) bzw. die anhand morphologischer Kriterien definierte „Region“ von 18.918 intakten Zellen (rechts).

Jede Zelle besitzt eine Grundfluoreszenz, die in ihrer Intensität erheblich unter der fluoreszierender Zellen liegt (Abb. 2-10).

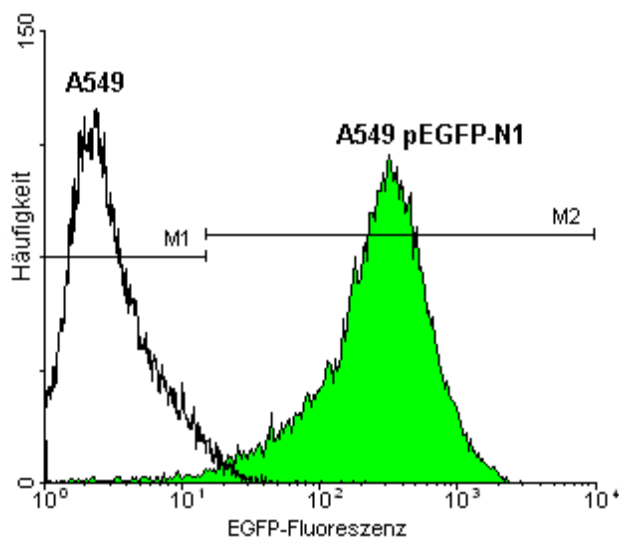


Abb. 2-10: Histogrammdarstellung als Overlay der Fluoreszenzintensität nativer und konstitutiv EGFP-exprimierender A549-Zellen. Die Marker M1 (native Zellen) und M2 (konstitutiv EGFP-exprimierende Zellen) wurden in der Auswertung willkürlich gesetzt und definieren einen oberen und unteren Grenzwert als Einschlusskriterium.

In der Histogramm Darstellung wurde der Messbereich des entsprechenden Parameters in Klassen eingeteilt (meist 1024, x-Achse) und entweder linear oder logarithmisch (Fluoreszenz) gegen die Häufigkeit der Ereignisse (y-Achse) aufgetragen. Durch Definieren oberer und unterer Grenzwerte (Marker) konnten vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Messungen im Overlay vorgenommen werden. Für die Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen den Messergebnissen verschiedener Zellpopulationen wurde der Kolmogorov-Smirnov Test (K-S Test) angewendet. Der K-S Wert D repräsentiert ein Maß der Signifikanz für die

maximale vertikale Verschiebung zwischen zwei kumulativen Frequenz-Verteilungen (Watson, 1992). Die Durchführung des Tests wurde mit Hilfe der CellQuest™ Software vorgenommen. Abbildung 2-11 zeigt exemplarisch die Analyse der Histogrammdata einer unbestrahlten Kontrollpopulation versus einer bestrahlten Zellpopulation (grün).

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests konnten Aussagen über die Verteilungsform der Daten vorgenommen werden. Als Charakterisierung der Fluoreszenz wurde der Median verwendet, da die Verteilung der Messwerte stark schiefsymmetrisch und nicht logarithmisch normalverteilt war. Der Kolmogorov-Smirnov Test, der in diesem Fall die Signifikanz zwischen Kontrolle und Behandlung prüft, lieferte in allen Fällen hoch signifikante Ergebnisse ($p \leq 0.001$).

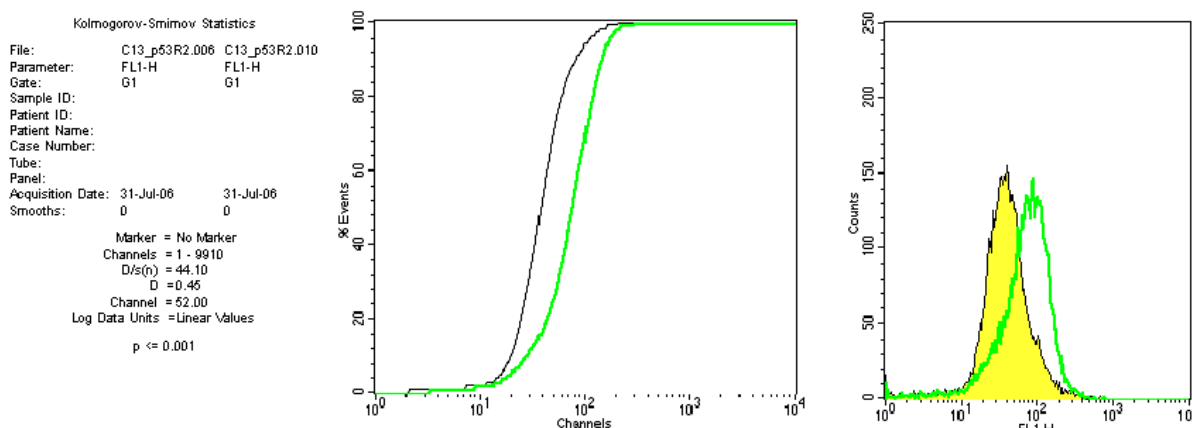


Abb. 2-11: Ergebnisfenster der Kolmogorov-Smirnov Statistik (CellQuest™ Software) zur Untersuchung der maximalen Differenz zwischen zwei Histogrammen.

2.4.8.3. Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung

Der Anteil der verschiedenen Zellzyklusphasen bestrahlter und unbestrahlter Zellpopulationen wurde nach Färbung mit dem interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) im Kanal FL-2 (585/42 nm Bandpassfilter) des Durchflusszytometers bestimmt. Dazu wurden bestrahlte und unbestrahlte Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten samt Medienüberstand und Waschpuffer geerntet, pelletiert und in 70% Ethanol bei -20°C fixiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit dem RNase-haltigen Färbepuffer über 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Erfassung des zellulären DNA-Gehalts wurde die Fluoreszenz von 20.000 PI-gefärbten Zellen gemessen und Histogramme über die *Cell-Quest*-Software erstellt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.8.

Propidiumiodid-Puffer: 10 µg/ml Propidiumiodid; 0,12% Nonidet P40 und 20 µg/ml RNaseA