

1. Einleitung	1
1.1. Der Mensch im Weltall	1
1.2. Das Strahlenfeld im Weltraum.....	2
1.3. Strahlenrisiken.....	3
1.4. Experimentieren unter Weltraumbedingungen.....	4
1.4.1. Internationale Raumstation (ISS)	4
1.4.2. Weltraumlabor Columbus mit der Experimentierplattform Biolab.....	5
1.4.3. Entwicklung von strahlenbiologischen Experimenten für die ISS.....	6
1.5. Wirkung von Strahlung auf molekularer und zellulärer Ebene	8
1.5.1. Strahlenarten	8
1.5.1.1. Nicht-ionisierende Strahlung: UV-Strahlung	8
1.5.1.2. Ionisierende Strahlung: Röntgenstrahlen, Alpha-Strahlen und Schwerionen-Strahlung	9
1.5.2. Biologische Effekte ionisierender Strahlung unterschiedlicher Qualität	9
1.6. DNA-Schäden und deren Reparatur	11
1.6.1. Direkte DNA-Reparatur (DDR)	12
1.6.2. Base Excision Repair (BER).....	12
1.6.3. Nucleotide Excision Repair (NER).....	14
1.6.4. Mismatch Repair (MMR).....	15
1.6.5. DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	16
1.7. Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden: Zellzyklusarrest oder Apoptose?	18
1.7.1. Der Zellzyklus und dessen Kontrolle	18
1.7.1.1. Der G1/S Checkpoint.....	19
1.7.1.2. Der S-Phase-Checkpoint	19
1.7.1.3. G2/M-Checkpoint.....	19
1.7.2. DNA-Schäden und Apoptose	20
1.8. Regulatoren der zellulären Strahlenantwort.....	22
1.8.1. Der Tumorsuppressor p53 und seine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität	22
1.8.2. Der nukleäre Faktor kappa B als Regulator der Zellantwort auf Stress	23
1.9. Fragestellung.....	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Zelllinien	25
2.1.1. A549	25
2.1.2. MCF-7.....	25
2.1.3. AGS.....	25
2.1.4. HEK 293	25
2.1.5. Fibroblasten (NHF)	26
2.2. Bakterienstämme	26
2.3. Standardmethoden der Molekularbiologie.....	27
2.3.1. Isolierung von DNA.....	27
2.3.1.1. Isolierung von genomischer DNA	27
2.3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
2.3.2. Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA	27
2.3.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	27
2.3.4. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	27
2.3.5. Elution von Nukleinsäuren aus Gelen	28
2.3.6. Polymerase-Kettenreaktion	28
2.3.7. Reinigung von PCR-Produkten	28
2.3.8. Sequenzanalyse.....	28
2.3.9. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	28
2.3.10. Klonierung und Subklonierung	29
2.3.10.1. Erzeugung von blunt-end DNA Fragmenten.....	29
2.3.10.2. Phosphorylierung von PCR-Produkten.....	29
2.3.10.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	29

2.3.10.4.	Präparation eines TA-Klonierungsvektors	30
2.3.10.5.	Ligation von DNA in Plasmide	30
2.3.10.6.	Transformation in kompetente E.coli-Zellen	30
2.3.10.7.	Herstellung transformationskompetenter E. coli-Zellen	31
2.3.10.8.	Selektion rekombinanter Klone	31
2.3.11.	Isolierung und Auftrennung von RNA	32
2.3.11.1.	Isolation von Gesamt-RNA über Tri Reagent	32
2.3.11.2.	Isolierung von Gesamt-RNA über RNeasy Kit	32
2.3.11.3.	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA	33
2.3.11.4.	Denaturierende Formaldehyd-Gele	34
2.3.12.	Quantifizierung geänderter Genexpression	34
2.3.12.1.	Northern Blotting: Hybridisierung mit radioaktiven Sonden	34
2.3.12.2.	Quantitative Real-Time RT-PCR	35
2.3.12.2.1.	Primerdesign und prä-analytische Schritte	36
2.3.12.2.2.	Wahl des Referenz-Gens	38
2.3.12.2.3.	cDNA-Synthese	40
2.3.12.2.4.	Durchführung der qRT-PCR	40
2.3.12.2.5.	Überprüfung der Spezifität der Amplifikation	40
2.3.12.2.6.	Intra -und Inter -Assay Reproduzierbarkeit	41
2.3.12.2.7.	Linearität und Effizienz der Amplifikation	41
2.3.12.2.8.	Quantitative Auswertung der qRT-PCR Daten	42
2.3.12.2.9.	Statistische Analyse der qRT-PCR-Daten	42
2.3.12.3.	TranSignal p53 Target Gene Array	43
2.3.13.	Isolierung, Auftrennung und Transfer von Proteinen	44
2.3.13.1.	Proteinisolation mit RIPA-Puffer	44
2.3.13.2.	Quantifizierung von Proteinen	44
2.3.13.3.	Elektrophorese und Western-Blotting der Proteine	44
2.4.	Zellbiologische Methoden	46
2.4.1.	Kultivierungsbedingungen	46
2.4.1.1.	Subkultivieren der Zellen	46
2.4.1.2.	Wachstumskinetik der verwendeten Zelllinien	46
2.4.1.3.	Erfassung der zellkinetischen Daten der Zelllinien aus Primärzellen	47
2.4.1.4.	Gefrierkonservierung der Zellen	47
2.4.2.	Messung der Fluoreszenz im Mikrotiterplattenfluorimeter	48
2.4.3.	MTT-Test	48
2.4.4.	Test auf Mykoplasmenbefall	48
2.4.5.	Gentechnische Methoden in der Zellkultur	49
2.4.5.1.	Stabile Transfektion	49
2.4.5.2.	Selektion stabil transfizierter Zellen	49
2.4.6.	Bestrahlungseinrichtungen und Dosimetrie	50
2.4.6.1.	Exposition mit Röntgenstrahlen	50
2.4.6.2.	Exposition mit Alpha-Teilchen	50
2.4.6.3.	Exposition mit Schwerionen	51
2.4.6.4.	Exposition mit UV-Strahlen	52
2.4.7.	Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit	53
2.4.7.1.	Koloniebildungstest	53
2.4.7.2.	Fluoreszenz Analyse der DNA-Entwindung (FADU)	55
2.4.7.3.	Visualisierung von Doppelstrangbrüchen mittels γ -H2AX Antikörperfärbung	56
2.4.8.	Durchflusszytometrie	57
2.4.8.1.	Messung der EGFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer	57
2.4.8.2.	Auswertung durchflusszytometrischer Ergebnisse	57
2.4.8.3.	Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung	59

3. Ergebnisse	60
3.1. Charakterisierung der Zelllinien.....	60
3.1.1. MCF-7.....	60
3.1.2. A549.....	60
3.1.3. AGS.....	61
3.1.4. HEK 293.....	61
3.1.5. Normale Humane Fibroblasten aus einer Primärkultur (NHF).....	61
3.2. Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit.....	62
3.2.1. γ -H2AX als gewebsspezifischer Biomarker für die Induktion von Doppelstrangbrüchen.....	62
3.2.2. Bestimmung der Targetgröße.....	64
3.2.3. Zelluläres Überleben nach Bestrahlung: Koloniebildungstest.....	64
3.2.4. FADU.....	71
3.2.5. Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung.....	71
3.3. Analyse der strahleninduzierten Modulation der Genexpression.....	74
3.3.1. Identifizierung strahleninduzierbarer Gene mittels Macroarray-Analyse: Effekt von Bestrahlung auf die Expression p53-abhängiger Gene.....	74
3.3.2. Analyse der p53R2-Expression mittels Northern Blot Analyse.....	79
3.3.3. Analyse der p53R2-Expression auf Proteinebene.....	80
3.3.4. Analyse der Genexpression mittels Quantitativer Real-time RT-PCR.....	80
3.3.4.1. Genexpressionsänderung nach Bestrahlung mit nicht-ionisierender Strahlung.....	81
3.3.4.1.1. Expression von GADD45alpha nach Bestrahlung mit UV-C.....	82
3.3.4.1.2. Expression von p21 (CDKN1A) nach Bestrahlung mit UV-C.....	84
3.3.4.1.3. Expression von p53R2 (RRM2b) nach Bestrahlung mit UV-C.....	85
3.3.4.2. Genexpressionsänderung nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung.....	86
3.3.4.2.1. Expression von GADD45alpha nach Exposition mit Röntgenstrahlen.....	87
3.3.4.2.2. Expression von p21 (CDKN1A) nach Exposition mit Röntgenstrahlen.....	88
3.3.4.2.3. Expression von p53R2 (RRM2b) nach Exposition mit Röntgenstrahlen.....	89
3.3.4.3. Modulation der Genexpression nach Bestrahlung mit dicht- ionisierender Strahlung.....	90
3.3.4.3.1. GADD45alpha nach dicht-ionisierender Strahlung.....	91
3.3.4.3.2. p21 (CDKN1A) nach Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung.....	92
3.3.4.3.3. p53R2 nach Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung.....	94
3.3.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalysen nach Bestrahlung mit ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung.....	96
3.4. Rekombinante Zelllinien für ein Weltraumexperiment.....	96
3.4.1. Konstitutive Expression des pEGFP-Gens als Marker für Vitalität in lebenden Zellen.....	96
3.4.2. Induzierbare Expression von p53R2 als Markergen für den Einsatz auf der Internationalen Raumstation.....	98
3.4.2.1. Plasmidkonstruktion des p53R2 (RRM2b) Vektors als Marker für Genotoxizität.....	98
3.4.2.2. Stabile Transfektion in A549 Zellen.....	100
3.4.2.3. Identifizierung EGFP-positiver Klone mittels Durchflusszytometrie.....	101
3.4.2.4. Visualisierung der EGFP-Fluoreszenz nach Bestrahlung.....	102
3.4.2.5. Untersuchung der Hintergrundfluoreszenz: Basisaktivität oder mögliche Antwort auf Stressinduktion?.....	103
3.4.2.6. Bestimmung der Insertionshäufigkeit des klonierten Vektors in der rekombinanten Zelllinie A549-RRM2b.....	104
3.4.2.7. Nachweis der Spezifität des induzierbaren Vektorsystems.....	105
3.4.2.8. Analyse der Induzierbarkeit des Reporter-Vektor-Systems.....	106

3.4.2.8.1.	Induktion durch Behandlung mit DNA-Strangbruch induzierenden Agentien.....	106
3.4.2.8.2.	Induzierbarkeit durch Strahlung unterschiedlicher Qualität	107
4.	Diskussion	111
4.1.	Entwicklung von Testsystemen für den Einsatz auf der ISS	111
4.1.1.	Das <i>Green Fluorescent Protein</i> als Reportergen	111
4.1.2.	Charakterisierung der Zelllinien.....	113
4.1.3.	Screening potentieller Markergene zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität.....	115
4.1.1.1	Screening Methoden zur Genexpressionsanalyse.....	116
4.1.1.2	Transkriptionelle Aktivierung von p53-abhängigen Genen nach Bestrahlung mit beschleunigten Ionen mittels Macroarray-Analyse	118
4.1.1.3	Modulation der Genregulation ausgewählter Gene nach Bestrahlung in zellulären Modellsystemen und humanen Fibroblasten.....	121
4.1.1.3.1	Zellzyklusinhibitor p21(CDKN1A/ CIP1/ WAF1).....	121
4.1.1.3.2	GADD45 (Growth arrest and DNA damage-inducible gene)	123
4.1.1.3.3	Das DNA-Reparaturgen p53R2 (hRRM2b)	125
4.1.1.3.4	Das Reparaturgen BRCA2	128
4.1.1.3.5	NF- κ B und I κ B α	129
4.1.1.3.6	Abschließende Wertung der Ergebnisse der Expressionsanalysen nach Bestrahlung.....	133
4.1.4.	Reporter-Vektor-System auf Basis der p53-abhängigen Form der Ribonukleotid Reduktase.....	135
4.1.5.	Verifizierung des entwickelten zellulären Testsystems unter Einsatz Weltraum-relevanter Strahlenqualitäten	137
5.	Zusammenfassung	139
6.	Summary	140
7.	Literaturverzeichnis	141
8.	Anhang	150
8.1.	Glossar ausgewählter Begriffe	150
8.2.	Danksagung	152
8.3.	Selbstständigkeitserklärung	153
8.4.	Publikationen.....	153
8.5.	qRT-PCR Ergebnisse der Gene GADD45 β , NFKBIA und BRCA2	154
8.5.1.	GADD45 β	154
8.5.2.	BRCA2.....	156
8.5.3.	I κ B α	159
8.6.	Vektorkarten	161