

1. Einleitung

1.1. Der Mensch im Weltall

Langzeitaufenthalte im Weltraum, sei es auf der Internationalen Raumstation oder auf den geplanten Flügen zum Mond oder Mars, stellen nicht nur eine physische und psychische Herausforderung für den Menschen dar, sondern sind auch mit erhöhter Strahlenexposition verbunden. Auf der Erde bietet die Atmosphäre Schutz vor dem primären Strahlungsfeld des Weltraums. Die schützende Wirkung durch die Luftmassen der Atmosphäre ist vergleichbar mit der einer 10 Meter hohen Wassersäule. Raumschiffwände hingegen weisen nur eine Absorberdicke auf, die einer etwa 10 bis 30 cm hohen Wasserschicht entspricht. Die Schutzwirkung des Raumanzugs für Außenbordaktivitäten beträgt vergleichsweise nur einen Zentimeter Wasserschicht (Reitz, 2006). Die Gefährlichkeit der hochenergetischen, elektrisch geladene Teilchen der kosmischen Strahlung, die unsere gesamte Galaxis durchdringen, liegt in ihrer hohen Penetranz und der Fähigkeit, eine Reihe von ionisierter Sekundärteilchen (Elektronen, Hadronen und Myonen) durch Kernreaktionen zu erzeugen.

Die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung beruht auf ihrer Fähigkeit, Atome oder Moleküle zu ionisieren. Konsequenzen sind das Aufbrechen chemischer Bindungen und inelastischen Kollisionen mit den Elektronen des absorbierenden Atoms, die in betroffenen Zellen zur Induktion von Mutationen und chromosomalen Aberrationen führen können (Horstmann *et al.*, 2005; Durante *et al.*, 2003; Obe *et al.*, 2002; George *et al.*, 2002). Obwohl die Strahlendosen im Weltraum wesentlich höher sind als auf der Erde, werden im erdnahen Orbit innerhalb der Magnetosphäre keine Dosen erreicht, in denen akute Strahleneffekte ausgelöst werden können. Demzufolge richtet sich dort das Hauptinteresse auf die Auslösung von Spätschäden im Menschen in Form von genetischen Defekten. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Veränderungen der Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen eine frühe Stufe im mehrstufigen Prozess der onkogenen Transformation darstellen können. Grundsätzlich können DNA-Schäden in Säugerzellen veränderte Genexpressionsmuster bedingen, die von zurzeit nicht einschätzbarer Relevanz für den Strahlenschutz des Astronauten sind (Ohnishi *et al.*, 1999 und 2000).

Durch DNA-Reparatur-Mechanismen wird eine Vielzahl schadhafter Veränderungen der DNA-Struktur in einer Zelle beseitigt. Ungeklärt ist der Einfluss der Mikrogravitation auf das Reparaturverhalten von Zellen. In einer Vielzahl von Untersuchungssystemen wurde der Einfluss der kosmischen Strahlung unter Mikrogravitationsbedingungen im Weltraum untersucht (Horneck, 1992 und 1999, Kiefer *et al.*, 1996, Pross und Kiefer, 1999). Untersuchungen am Menschen als auch an verschiedenen Tiermodellen zeigten, dass sowohl Muskeln, Knochen, Blutkreislauf und das Immunsystem empfindlich auf das Fehlen der Schwerkraft reagieren (McPhee und White, 2003; Hinghofer-Szalkay, 1996; Biolo *et al.*, 2003). Auf zellulärer Ebene sind viele durch

Mikrogravitation bedingte Veränderungen in Säugerzellen beschrieben (Cogoli, 1996; Moore und Gogoli, 1996), die von der Beeinflussung des Stofftransports durch Membranen bis zur Änderung der Genexpression (Ward *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2000; Hughes-Fulford, 2001) und der Entstehung von Tumoren (Taga *et al.*, 2006) reichen. Anton *et al.* (1996 und 1998) haben gezeigt, dass reale und simulierte Schwerelosigkeit eine dauerhafte Erhöhung der Mitoserate bewirken. Experimente, die unter simulierten Laborbedingungen den Einfluss der Mikrogravitation auf das Reparaturverhalten und die Expression schadensrelevanter Gene untersuchten, zeigten teilweise sich widersprechende Ergebnisse (Mognato und Celotti, 2005; Degan *et al.*, 2001 und 2005).

Vor diesem Hintergrund ist die Durchführung von Weltraumexperimenten zur Untersuchung von Reparaturvorgängen in menschlichen Zellen unter dem Einfluss von Mikrogravitation notwendig. Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeiten sollte ein Testsystem entwickelt werden, das als Folge eines DNA-Schadens eine geänderte Genaktivität auf zellulärer Ebene anzeigt und das als Teil des Weltraumexperiments *CellPath* nach Errichtung des Weltraumlabor *Biolab* auf der Internationalen Raumstation zum Einsatz kommen wird.

1.2. Das Strahlenfeld im Weltraum

Das Strahlenfeld im erdnahen Orbit setzt sich aus der galaktisch kosmischen Strahlung, der solaren kosmischen Strahlung und den Teilchen des inneren Protonen-Strahlungsgürtels zusammen. Die **galaktisch kosmische Strahlung** entsteht außerhalb unseres Sonnensystems, vermutlich infolge von Supernova-Ausbrüchen und besteht zu 98 % aus Baryonen und zu 2 % aus Elektronen, Neutrinos und Gammastrahlung (Shea und Smart, 1998). Die baryonische Komponente setzt sich aus 87 % Protonen (Wasserstoffkerne), 12 % Alphateilchen (Heliumkerne) und weniger als 1 % schwerer Kerne mit Ordnungszahlen bis 92 (Uran) zusammen. Die biologische Wirksamkeit der schweren Teilchen ist besonders groß, da die von ihnen übertragene Energie und damit die Fähigkeit, chemische Bindungen aufzubrechen, mit dem Quadrat der elektrischen Ladung wächst. Ein Eisenkern mit der Kernladungszahl von 26 kann demzufolge 676-mal soviel Schaden anrichten wie ein Proton der gleichen Geschwindigkeit.

Das Strahlenfeld in erdnahen Umlaufbahnen verändert sich zeitlich und örtlich in Abhängigkeit von Form und Stärke des Erdmagnetfeldes, aber auch durch die Aktivität der Sonne. Die **solare kosmische Strahlung** setzt sich aus den niederenergetischen Partikeln des konstant von der Sonne emittierten Sonnenwinds und den hochenergetischen Partikeln der Sonneneruptionen (*solar flares*) aus magnetisch instabilen Regionen der Sonne zusammen. Die Intensität der solaren kosmischen Strahlung ist von der Eruptionshäufigkeit abhängig, die in kurzen (11-Jahres-Zyklus) und langen Zyklen (z.B. Schwabe-Zyklus) variiert. Der strahlenbiologisch relevante Teilchenfluss (größtenteils Protonen, aber auch Alpha-Teilchen und einige schwere Kerne) ist während des Maximums der Sonnenaktivität 5- bis 10-mal größer als während des solaren Minimums. Die unvorhersehbaren Teilchenenergien der Sonne entwickeln sich schnell und

können über Zeiträume von einigen Stunden bis hin zu Tagen anhalten. Bei großen Eruptionen können die emittierten Partikel Energien von mehreren GeV/amu erreichen. Die dabei absorbierten Dosen können für einen ungeschützten Astronauten außerhalb der irdischen Magnetosphäre tödlich sein.

In der Nähe von Planeten, die von einem Magnetfeld umgeben sind, kommt eine dritte Strahlenkomponente hinzu: Hochenergetische geladene Partikel, die in planetaren Magnetfeldern gefangen sind, den so genannten **Strahlungsgürteln** (Heynderickx, 2002). Durch das Magnetfeld der Erde werden aus dem Sonnenwind oder der kosmischen Strahlung stammende Teilchen „eingefangen“ und sammeln sich im Wesentlichen zwischen zwei Strahlungsgürteln (*Van-Allen-Gürteln*), die sich zwischen den magnetischen Polen der Erde aufbauen.

Für den Strahlenschutz auf der Internationalen Raumstation ist darüber hinaus die so genannte *Süd Atlantische Anomalie* (SAA) von Bedeutung, die fünfmal täglich durchquert wird. Die Abweichungen des Magnetfelds von einer idealen Dipolform über dem Südatlantischen Ozean ist dafür verantwortlich, dass dort höhere Teilchenflüsse auftreten als an anderen Orten gleicher Höhe über der Erdoberfläche.

1.3. Strahlenrisiken

Die hochenergetischen Partikel der Kosmischen Strahlung, die sich durch hohe Penetranz auszeichnen, stellen für die Astronauten ein bisher nicht überschaubares gesundheitliches Risiko dar. Die Höhe der Strahlenexposition bestimmt das Ausmaß möglicher Strahleneffekte. Akute Schäden treten kurzfristig nach Bestrahlung auf und reichen von einer Störung des Allgemeinbefindens über Funktionsstörungen der Organe bis hin zum Tod. Spätschäden treten erst nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren auf und können zur Bildung von Katarakten und Tumoren führen. Nach dem Entstehungsmechanismus des Strahlenschadens unterscheidet man deterministische und stochastische Strahlenschäden. **Deterministische Strahlenschäden** treten als Summe vieler elementarer Strahlenwirkungsprozesse oberhalb von Dosis-Schwellenwerten auf. Dazu gehören akute (Früh-) Schäden (z.B. Hauterythem, Strahlenkater und akutes Strahlensyndrom), nicht-kanzeröse Spätschäden (Kataraktbildung, fibrotische Gewebsveränderungen) und teratogene Effekte. Während einer Mission außerhalb der Magnetosphäre bzw. innerhalb der Strahlungsgürtel können akute Schäden nur durch eine hohe Strahlenexposition bei solaren Teilchenausbrüchen hervorgerufen werden. Dieses Risiko lässt sich durch sorgfältige Missionsplanung unter Berücksichtigung des solaren Aktivitätszyklus und durch konstruktive Maßnahmen, wie der Einrichtung eines Schutzraums im Raumfahrzeug, vermindern.

Durch Bestrahlung mit Einzeldosen, aber auch durch Dauerbestrahlung mit kleinen Dosen, können **stochastischen Strahlenschäden** (strahleninduzierte Tumore) auftreten. Dafür gibt es keine Schwellendosis, die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines solchen Schadens ist vielmehr proportional zur Dosis. Statistisch signifikant nachgewiesen ist der Zusammenhang zwischen Tumorinzidenz und Exposition erst für akute Dosen >0.2 Sv. Die Risikoabschätzung für

stochastische Strahlenschäden, die mit einer Latenzzeit von mehreren Jahren bis Jahrzehnten auftreten können, beruht auf Daten, die nach Bestrahlung mit hohen Dosen (0,8 - 2 Sv und mehr) gewonnen wurden. Eine Risikoabschätzung für kleinere Dosen wird durch Extrapolation zu niedrigen Dosiswerten hin vorgenommen. Bei Bestrahlung mit kleinen Dosen (unter 1 Sv pro Jahr) ist die Induktion von Tumoren die häufigste Langzeitfolge (Brooks, 2003). Die Bestimmung des individuellen Risikos, an einem strahleninduzierten Tumor nach Exposition mit niedrigen Strahlendosen zu erkranken, ist wegen der hohen Rate nicht-strahleninduzierter Tumore ausgesprochen schwierig, wenn nicht gar unmöglich (Pierce *et al.*, 1996). Eine Risikoabschätzung für das Auftreten stochastischer Strahlenschäden für den Astronauten im Weltraum kann nur mit einem Unsicherheitsfaktor von 3 -10 vorgenommen werden (pers. Mitteilung Dr. Facius, DLR Köln).

Zur Messung der Strahlenexposition des Astronauten und dem damit verbundenen Risiko wurde die Experimentierplattform MATROSHKA (Reitz und Berger, 2006) in der strahlenbiologischen Abteilung des DLR im Auftrag der Weltraumorganisation ESA entwickelt. Das Phantom, das in seinem inneren und äußeren Aufbau dem Menschen nachempfunden ist, beinhaltet an mehr als 800 Positionen 6000 passive und sieben aktive Detektoren zur Messung von Teilchenflüssen und Energiespektren. Nach 18 Monaten Expositionszeit an der Außenseite des russischen Service-Moduls *Zvezda* befindet sich MATROSHKA nach Austausch der Strahlungsdetektoren zurzeit wieder im Inneren der ISS. Erste Ergebnisse der aktiven Messgeräte ergaben vorläufige Werte für die Strahlenexposition während eines Weltraumspaziergangs von 1,3 mSv **pro Tag**, während im Inneren der Raumstation in der gleichen Zeit Werte zwischen 0,45 und 0,55 mSv gemessen wurden. Demnach ist die Strahlenexposition bei Außenbordaktivitäten um einen Faktor 3 höher als im Inneren der Raumstation (Berger und Reitz, 2006). Im Vergleich erhält ein Mensch auf der Erde durch die natürliche Strahlungsumgebung eine Dosis von 2-3 mSv **pro Jahr**.

1.4. Experimentieren unter Weltraumbedingungen

1.4.1. Internationale Raumstation (ISS)

Die in internationaler Kooperation entstehende Raumstation ist das größte gemeinschaftliche wissenschaftlich-technische Vorhaben der Menschheit. Seit November 1998 bauen 16 Nationen der Erde (USA, Russland, Japan, Kanada, Brasilien und 11 europäische Länder) in der Umlaufbahn gemeinsam an einer Raumstation, die im Jahr 2010 fertig gestellt werden soll. Mit dem Absturz der Raumfähre Columbia am 1.2.2003 hat sich der Ausbau durch Aussetzen der *Shuttle*-Flüge deutlich verschoben. Transport und Andocken des europäischen Forschungslabors Columbus an das Knotenelement 2 der Station sind voraussichtlich für November 2007 vorgesehen (Abb. 1-1).

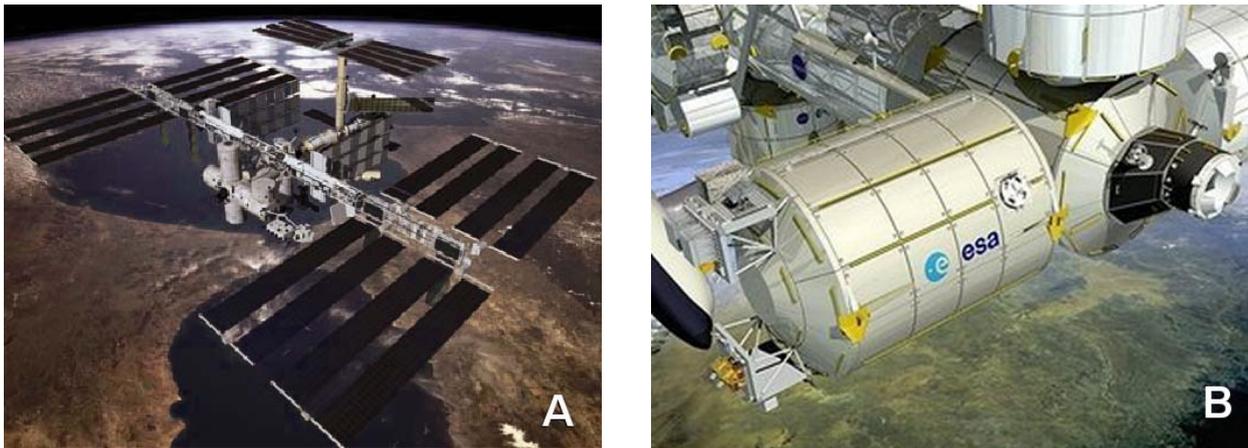


Abb. 1-1: **A:** Geplanter Endausbau der Internationalen Raumstation im Jahr 2010 (Quelle NASA).
B: Modell des Columbus Moduls, angedockt an die ISS (Quelle ESA).

1.4.2. Weltraumlabor Columbus mit der Experimentierplattform Biolab

Die „*Columbus Orbital Facility*“ ist ein Mehrzwecklabor, entwickelt als europäisches Gesamtprojekt für die multidisziplinäre Forschung in Material- und Lebenswissenschaften sowie für die Technologieentwicklung unter Schwerelosigkeit. Das acht Meter lange *Columbus* Labor beinhaltet zwölf international standardisierte Nutzlastschränke (*Racks*), in denen Experimentier-Anlagen untergebracht werden können.

Deutschland ist als Hauptauftragnehmer für das Weltraumlabor *Biolab* mit 41 Prozent an den Entwicklungskosten des europäischen Teils der Raumstation beteiligt. Geplant sind Experimente mit Invertebraten, Kleinpflanzen, Mikroorganismen und Zellkulturen. Dabei werden regulatorische Mechanismen der Zellproliferation und Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts, inter- und intrazellulärer Signaltransport, Biomineralisation von Knochengewebe, Strahlenschäden und deren Reparatur sowie die Graviperzeption unter Weltraumbedingungen untersucht. Die Ausstattung des *Biolabs* (Abb. 1-2) erlaubt eine nahezu automatisierte Steuerung in Hinblick auf Vorbereitung, Durchführung und Aufarbeitung der Experimente. Daten bzw. Bilder der Analyseinstrumente wie Videokamera, Mikroskop und Spektrophotometer werden in Echtzeit ins Kontrollzentrum nach Oberpfaffenhofen übermittelt.

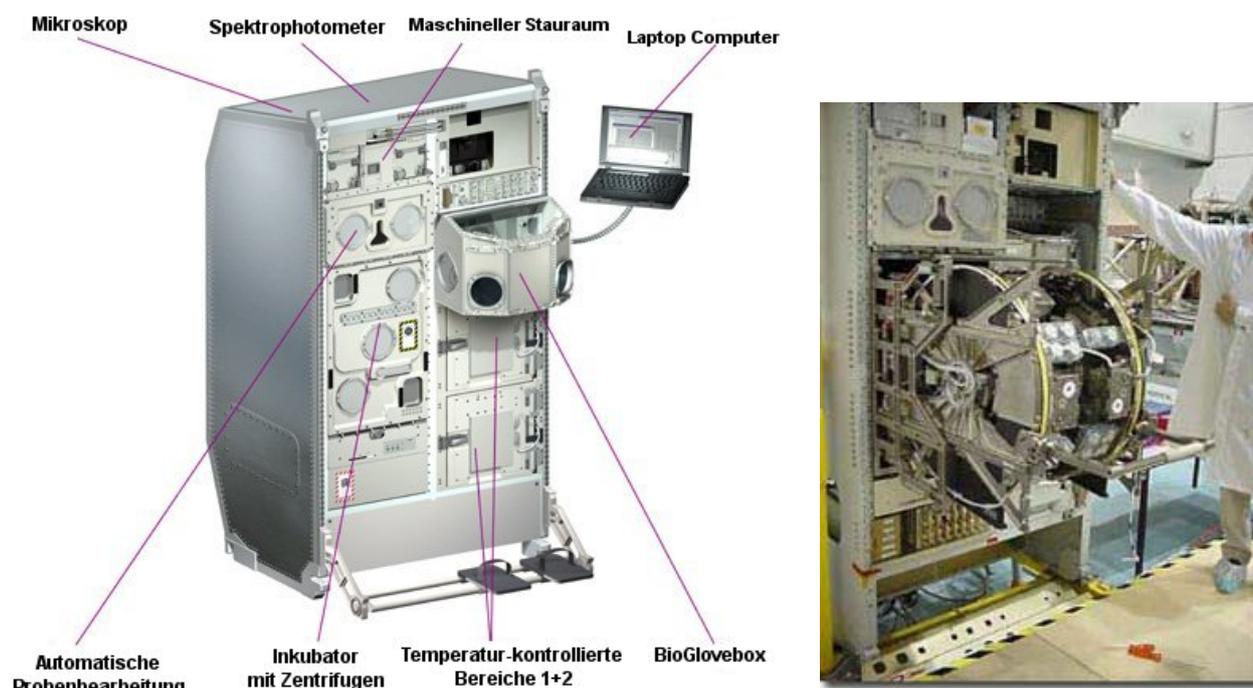


Abb. 1-2: Einen wesentlichen Bestandteil des Biolabs stellen die Zentrifugen und das Lebenserhaltungssystem dar. Die Zentrifugen befinden sich innerhalb des Biolab-Brutkastens (Abbildung rechts im geöffneten Zustand) und dienen als Plattform für die Durchführung von biologischen Experimenten unter Mikrogravitation bzw. mit variabler radialer Beschleunigung bis zu $2 \times g$. Über die so genannte *BioGlovebox* (Abbildung links), die zur Vermeidung von Kontaminationen des Kabinenraums unter negativem Druck steht, können die Proben über zwei Handschuhstore in einer geschlossenen Umgebung manipuliert werden.

1.4.3. Entwicklung von strahlenbiologischen Experimenten für die ISS

Die Arbeitsgruppe *Zelluläre Biodiagnostik* des DLR entwickelt unter Verwendung von Säugerzellen indikative Bioassays, mit denen der Einfluss von Strahlung bereits auf zellulärer Ebene untersucht werden kann. Diese Bioassays beruhen auf dem Wirkungsprinzip von Rezeptor-Reporter-Ketten. Die transkriptionelle Aktivierung des zu untersuchenden Gens, d.h. die Bindung des Transkriptionsinitiationskomplexes, führt zur Induktion des vektoreigenen Reportergens. Das Einbringen von Reportergenen in Säugerzellen erlaubt somit die Visualisierung modifizierter Genexpression.

Das deutsche Weltraumexperiment *CERASP* (*Cellular Responses to Radiation in Space*) des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR Köln wird als eines der ersten Strahlenexperimente nach Etablierung des *Biolabs* auf der ISS durchgeführt werden (Baumstark-Khan *et al.*, 2005a; Hellweg *et al.*, 2006; Hellweg *et al.*, 2007a und c). Als biologische Endpunkte werden (i) Überleben und Wachstum (ii) Apoptose, (iii) Ausmaß und Reparatur des DNA-Schadens, (iv) Aktivierung des NF κ B-Pathways und (v) Chromosomenaberrationen (Prof. Obe und Dr. Johannes, Universität Essen) unter Weltraumbedingungen untersucht.

Da die Dosis der Weltraumstrahlung in einem Kurzzeitexperiment zu gering ist (bei 16 Tagen liegt die erhaltene Dosis im Mittel bei 8 mGy; Reitz *et al.*, 1996), werden die Zellen einer künstlichen

Strahlenquelle ausgesetzt. Als Strahlenquelle wird Promethium-147 verwendet. Der Betastrahler ist in unterschiedlicher Konzentration in die Vertiefungen einer Metallplatte eingelassen (Abb. 1-3). Vor Beginn bzw. zum Ende des Experiments werden die in einer Multiwellplatte wachsenden Zellen vor der emittierten Strahlung über eine Folie (Aluminium, Titanium bzw. Kombination mit verschiedenen Metalllegierungen, zurzeit in Testung) abgeschirmt.

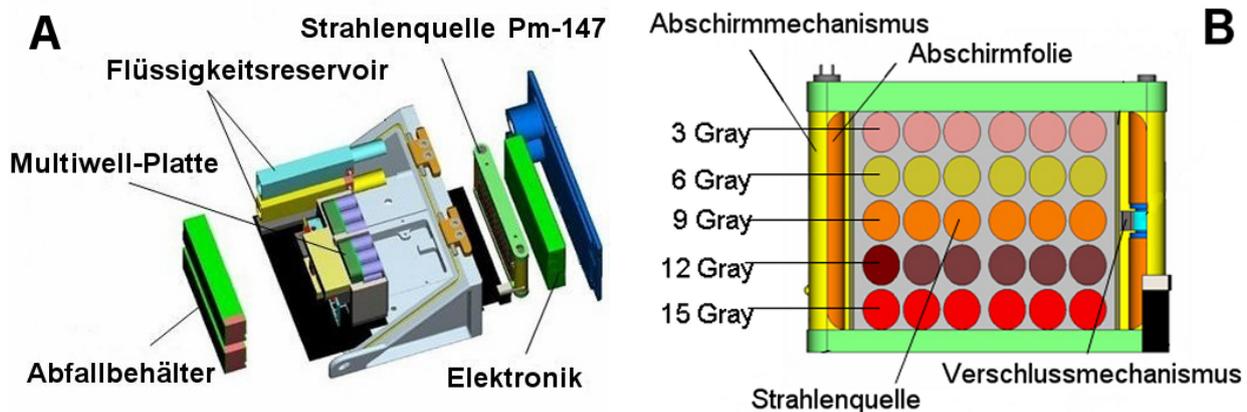


Abb. 1-3: Schematische Darstellung des Experimentcontainers (A) und der Bestrahlungsvorrichtung (B) für das Weltraumexperiment CERASP, die auch im Folgeexperiment *CellPath* zur Anwendung kommen werden.

Untersucht werden rekombinante menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293), die mit verschiedenen Reporter-Vektor-Systemen transfiziert sind. Für die Bestimmung des Überlebens nach Bestrahlung wird die konstitutive EGFP-Expression als Marker für die Zytotoxizität untersucht. Zum Nachweis induzierbarer Genexpression werden Reporterkonstrukte verwendet, die vier NF- κ B-Bindungsstellen als induzierbares Promotorelement und EGFP bzw. die destabilisierte Form (d2EGFP) als Reporter gen enthalten.

Im Experiment *CellPath* (*Modification of Cellular Signaling Pathways and DNA Damage Processing by Radiation in Space*) werden zwei experimentelle Ansätze verfolgt: Zum einen werden zu verschiedenen Zeiten der Mission Blut der Astronauten asserviert und für weiterführende Analysen gelagert, zum anderen werden Experimente an Säugerzellen durchgeführt werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wird auf der Detektion geänderter Genexpression unter Weltraumbedingungen liegen, wozu diese Arbeit einen Beitrag leisten soll. Mit verschiedenen molekularbiologischen Untersuchungsmethoden wie Microarray-Analysen und quantitativer Real-Time RT-PCR werden sowohl Blut- als auch Zellkulturzellen hinsichtlich ihrer Strahlenantwort unter Weltraumbedingungen untersucht. Im Focus des Interesses stehen (i) Überleben nach Bestrahlung, (ii) Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA, (iii) Induktion von Apoptose, (iv) Änderung des Genexpressionsprofils schadensrelevanter Gene (v) Untersuchung der mutagenen Strahlenbelastung der Astronauten bzw. Mutationsrate bestrahlter Säugerzellen und (vi) Visualisierung modifizierter Genexpression über Reporter-Vektor-Systeme.

Neben der Arbeitsgruppe der Zellulären Bodiagnostik des DLR sind weitere Forschergruppen aus Deutschland (*Drs. Abend und Scherthan, IRB München*), Frankreich (*Dr. Aeverbeck, Institut Curie Paris* und *Drs. Sabatier und Testard, CEA Fontenay-aux-Roses*) und Italien (*Dr. Durante, Universita di Napoli*) an dem Projekt beteiligt.

1.5. Wirkung von Strahlung auf molekularer und zellulärer Ebene

1.5.1. Strahlenarten

Unter Strahlung wird im Allgemeinen ein Energietransfer ohne vermittelndes Medium verstanden. Energiereiche „Teilchen“, die sich von einer Strahlenquelle wellenförmig ausbreiten und im Ruhezustand ohne Masse, also reine Energie sind, werden als **Photonenstrahlung** bezeichnet. Zur Photonenstrahlung gehören Lichtstrahlen, UV-Strahlen, Röntgen- und Gammastrahlung. Zur **Partikelstrahlung** werden Elektronen, Protonen, Neutronen, Atomkerne und Schwerionenstrahlung gerechnet. Gemeinsames Merkmal dieser Strahlenarten ist der Energietransport, wobei sie sich in der Menge der transportierten Energie unterscheiden. Im Gegensatz zur **nicht-ionisierenden Strahlung**, deren Quantummenge zur Auslösung von Ionisationsvorgängen an Atomen oder Molekülen nicht ausreicht, ist die **ionisierende Strahlung** besonders energiereich und kann zu Ionisationen führen. Dabei werden Elektronen aufgenommen oder abgegeben und die beteiligten Atome oder Moleküle werden in geladene Teilchen umgewandelt.

1.5.1.1. Nicht-ionisierende Strahlung: UV-Strahlung

Das Spektrum der nicht-ionisierenden Strahlung umfasst die elektromagnetischen Felder im Frequenzbereich von 0 Hz -300 Hz oder einer Wellenlänge von unendlich bis 1 mm und die optische Strahlung im Wellenlängenbereich von 1mm bis 100 nm (Infrarotstrahlung, sichtbares Licht, UV-Strahlung).

UV-Strahlen sind elektromagnetische Strahlen mit Wellenlängen zwischen 400 nm und 200 nm. Strahlen mit Wellenlängen unter 200 nm werden stark von Sauerstoff absorbiert und werden als Vakuum-UV bezeichnet, wobei die Begrenzung gegen kürzere Wellenlängen willkürlich durch das mögliche Einsetzen von Ionisationsprozessen gewählt wird. Das Band der UV-Strahlung wird in die Teilbereiche UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) und UV-C (200-280 nm) unterteilt. Je kürzer die UV-Wellenlänge ist, desto energiereicher ist die Strahlung und desto höher deren biologische Wirksamkeit. Als Bestandteil des Sonnenlichts erreicht nur der langwellige Anteil (290-400 nm) die Erdoberfläche, kurzwelligere UV-Strahlung wird durch die Atmosphäre, insbesondere die stratosphärische Ozonschicht, absorbiert.

Da Astronauten nicht ungeschützt der UV-Strahlung im Weltraum ausgesetzt sind, ist der Beitrag diese Strahlenart zum Strahlenrisiko zu vernachlässigen. Andererseits liefern experimentelle Daten zur biologischen Wirkung der UV-Strahlung aber grundlegende Erkenntnisse zur strahlenbiologischen Wirkungskette – ein Grund, sie in dieser Arbeit als Modellstrahlung zu untersuchen.

1.5.1.2. Ionisierende Strahlung: Röntgenstrahlen, Alpha-Strahlen und Schwerionen-Strahlung

Röntgenstrahlen (benannt nach Wilhelm Conrad Röntgen, 1845-1923) gehören wie die Gammastrahlen zur Photonenstrahlung und unterscheiden sich von diesen nur durch die Art ihrer Entstehung. Röntgenstrahlen entstehen, wenn Elektronen in metallischen Verbindungen abgebremst werden (Bremsstrahlung) oder durch Elektronenübergänge in kernnahen Elektronenstrahlen (charakteristische Röntgenstrahlung). In einer Röntgenröhre werden aus einer glühenden Kathode Elektronen ausgesendet, die durch die hohe Spannung zwischen Kathode und Anode beschleunigt werden. Treffen die derart beschleunigten Elektronen auf eine Wolframanode, so wird die Energiedifferenz als Röntgenstrahlung ausgesendet. Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Bremsstrahlung steigt mit der Ordnungszahl der abbremsenden Materie.

Alpha-Strahlung besteht aus zwei Protonen und zwei Neutronen, also einem Heliumatomkern. Die Geschwindigkeit der dabei austretenden Alpha-Teilchen liegt zwischen 15000 und 20000 km/s. Aufgrund ihrer elektrischen Ladung und relativ großen Masse haben Alpha-Teilchen eine nur sehr geringe Eindringtiefe in Materie. In Wasser bzw. organischem Material beträgt die Eindringtiefe eines 5 MeV-Alpha-Teilchen nur 40 μm .

Schwerionen-Strahlung: Bei freien Atomen heben sich die Ladungen von Protonen im Kern und Elektronen in der Hülle gegenseitig aus: das Atom ist nach außen elektrisch neutral. Werden Elektronen aus der Hülle entfernt, dominiert die positive Ladung im Kern und es entstehen geladene Teilchen (Ionen). Üblicherweise werden alle Ionen, die schwerer als Helium (Ordnungszahl 2) sind, als schwere Ionen bezeichnet. Die Energie der Ionen wird üblicherweise als spezifische Energie, also bezogen auf die atomare Masseneinheit (*amu*) angegeben. Ionen verlieren beim Durchtritt durch Materie durch Wechselwirkungsprozesse mit den Elektronen der Atomhülle an Energie, wodurch es zu Anregungen und Ionisationen kommt. Quantitativ wird dies durch das Massenbremsvermögen S [$\text{MeV mg}^{-1}\text{cm}^{-2}$] angegeben, das als die pro Wegstrecke übertragene Energie, dividiert durch die Dichte des Mediums, definiert ist.

1.5.2. Biologische Effekte ionisierender Strahlung unterschiedlicher Qualität

Die primären Reaktionen zwischen ionisierender Strahlung und den bestrahlten Zellen erfolgen durch direkte Ionisation oder indirekt durch Wirkung strahleninduzierter freier Radikale. Dabei sind die Effekte, die entlang eines Strahlendurchgangs ausgelöst werden, für die jeweilige Strahlenart charakteristisch. Die Energieübertragung (in keV) pro Wegstrecke (in μm) eines ionisierenden Teilchens wird als „Linearer Energie Transfer“ (LET) bezeichnet. Der LET-Wert kann in erster Näherung für die Charakterisierung der Ionisationsdichte einer Strahlung herangezogen werden. Er ist definiert als der mittlere Energieverlust (ΔE) entlang des Weges

(Δs) eines primären, ionisierenden Teilchens in Wasser:
$$\text{LET} = \frac{\Delta E}{\Delta s}$$

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf biologische Systeme beruht darauf, dass durch die Energiedeposition essentielle Strukturen zerstört werden können, was letztlich zu einer Veränderung oder dem Verlust biologischer Funktion führt. Dabei spielt nicht nur der Betrag der übertragenen Energie, sondern auch die räumliche Verteilung der Deposition eine Rolle. Bei der Bestrahlung einer Zellschicht geben Röntgenstrahlen ihre Energie gleichmäßig über die gesamte bestrahlte Fläche ab während beschleunigte Ionen ihre Energie konzentriert in einem schmalen Bereich um die Flugbahn herum deponieren (Abb. 1-4). Die typische radiale Ausdehnung einer solchen Bahnspur liegt bei einigen Mikrometern. Der Anstieg der Energiedeposition erreicht wenige Zentimeter vor dem kompletten Abstoppen einen extremen Spitzenwert, den *Bragg-Peak* (benannt nach dem britischen Physiker Sir William Bragg). Die biologische Wirksamkeit ist in diesem Bereich besonders hoch und geht mit einer drastisch erniedrigten Überlebensrate in den geschädigten Zellen einher. Die Wechselwirkung schwerer Ionen mit den Elektronen des durchstrahlten Materials erfolgt primär durch die Coulomb-Kraft und erzeugt die so genannten δ -Elektronen entlang ihrer Bahn (Abb. 1-4).

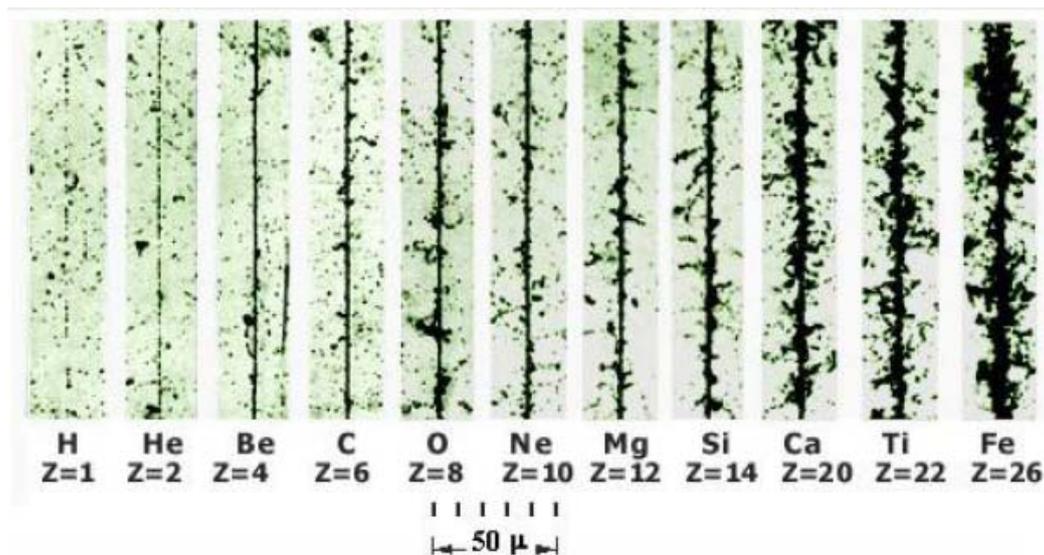


Abb. 1-4: Schnelle Ionen passieren die Materie weitgehend auf geradlinigen Bahnen und verlieren ihre Energie durch eine Vielzahl von Coulomb-Wechselwirkungen. Abhängig von der Primärenergie des Ions werden 65% bis 75% der abgegebenen Energie in kinetische Energie der Sekundärionen (δ -Elektronen) abgegeben. Die biologische Effektivität eines Teilchenstrahls steigt mit steigendem linearem Energietransfer bzw. steigender Ordnungszahl des Ions an. Die Abbildung zeigt Mikroskopbilder von Bahnspuren dicht-ionisierender Teilchen in einer Photoemulsion mit hohem Bromsilbergehalt, die nach Entwicklung eine Schwärzung hinterlassen.

Mikroskopisch betrachtet ähnelt die Energiedeposition nicht einem Nadelstich, sondern einem mehr oder weniger ausgedehnten Kanal, wobei die Verbreiterung durch die Sekundärelektronen hervorgerufen wird. Dieser Bereich wird als *Pänumbra* bezeichnet. Die δ -Elektronen, die sich von der Ionisationsspur des Primärions ausbreiten, transportieren die vom Primärion abgegebene Energie von seiner Trajektorie (Flugbahn) weg und bilden dabei büstenähnliche Strukturen aus.

Bei Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung verliert der Begriff „Dosis“ (absorbierte Energie pro Masseneinheit, Einheit Gy) aufgrund der inhomogenen Energieverteilung seine Bedeutung (Facijs *et al.*, 1984). Während ein Teil der Zellen in sensiblen Bereichen wie dem Zellkern getroffen werden, bleibt ein anderer Teil ungeschädigt. Aus diesem Grund wird hier die Fluenz F (Teilchenflussdichte in Partikeln / cm^2) verwendet. Bei einer Flussrate von 1×10^6 Partikel / cm^2 geht man bei einer durchschnittlichen Kernfläche von $100 \mu\text{m}^2$ von einem Treffer pro Kern als relevanten Bereich der Zelle aus.

Strahlenarten mit unterschiedlichen Energiedepositionsmustern weisen somit Unterschiede in der biologischen Wirkung auch bei gleicher Energiedosis auf. Dieser Effekt wird mit der **relativen biologischen Wirksamkeit (RBW)** beschrieben und ist als Quotient aus den Energiedosen, die bei der Referenzstrahlung und der zu untersuchenden Strahlung zu einem quantitativ gleichen biologischen Effekt führen, definiert. Die RBW-Werte sind sowohl vom biologischen System als auch vom gewählten Endpunkt (Apoptose, Wachstumsverzögerung, Doppelstrangbrüche usw.) abhängig und können für die gegebene Strahlung durchaus verschiedene Werte annehmen (Stellungnahme der Strahlenschutzkommission, 2003).

In dem breiten Spektrum der durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schäden gelten Doppelstrangbrüche als der entscheidende Schaden, der für das zelluläre Überleben sowie die Entstehung von Mutationen und Chromosomenaberrationen verantwortlich ist. Beta-, Gamma- und Röntgenstrahlen (niedriger LET) führen zu Basenschäden bzw. Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Alpha- und Neutronenstrahlen hingegen rufen Doppelstrangbrüche (DSB) hervor. In der DNA einer Säugerzelle werden durch 1 Gy ionisierender Strahlung etwa 35 dieser Läsionen erzeugt, ohne das Überleben der Zelle erheblich zu beeinflussen. Anhand zytogenetischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nur jeder zehnte Doppelstrangbruch zu einer Dissoziation der DNA führt.

1.6. DNA-Schäden und deren Reparatur

Das Genom humaner Zellen, bestehend aus drei Billionen Basenpaaren, die ihrerseits zwischen 30000 und 40000 Gene kodieren, wird fortlaufend von Substanzen endogenen und exogenen Ursprungs geschädigt, wodurch die Integrität des Genoms gefährdet wird. Nach Friedberg *et al.* (1995) finden in einer einzelnen menschlichen Zelle etwa 10^4 – 10^6 DNA-Schadensereignisse pro Tag statt, was in einem erwachsenen Menschen mit etwa 10^{12} Körperzellen demnach 10^{16} – 10^{18} Reparaturereignisse erfordert. Zur Vermeidung von Mutationen und Genominstabilitäten, die ohne Reparatur zu Apoptose bzw. Krebs führen würden, existieren eine Vielzahl von Reparaturmechanismen (Abb. 1-5).

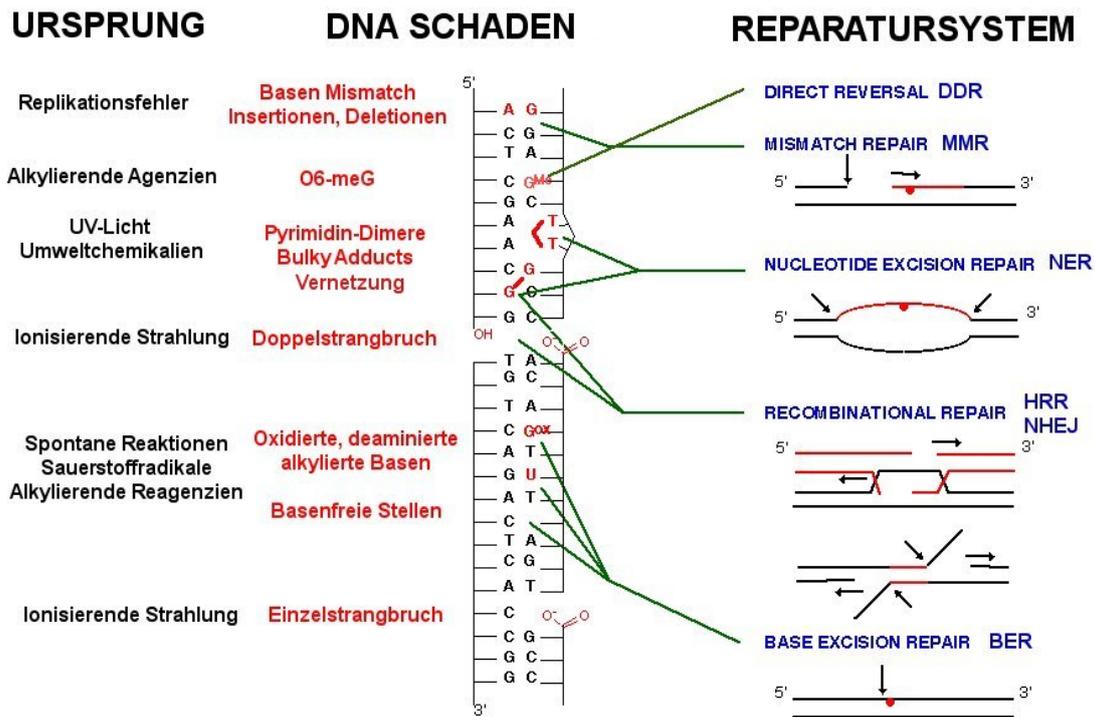


Abb. 1-5: Überblick über die häufigsten DNA-schädigenden Agenzien, Läsionen und Reparaturwege in menschlichen Zellen.

1.6.1. Direkte DNA-Reparatur (DDR)

Unter der Bezeichnung **direkte DNA-Reparatur** (*direct damage reversal*, DDR), die insbesondere in Bakterien und niederen Eukaryonten eine Rolle spielt, werden Reparaturwege zusammengefasst, die Nukleotide wiederherstellen ohne sie vom DNA-Molekül zu trennen. In Säugerzellen werden ausschließlich O⁶-Methylguaninaddukte mit Hilfe des Enzyms O⁶-Methyl-Guanin-DNA Methyltransferase (MGMT) repariert.

1.6.2. Base Excision Repair (BER)

Der Reparaturweg der *Base Excision Repair* wird hauptsächlich für die Reparatur kleinerer, endogen entstandener DNA-Schäden wie Depurinierung, Deaminierung oder Oxidierung von Basen über das Herausschneiden einer einzelnen Base entfernt (Lindahl, 1993; Lindahl und Wood, 1999; Nilsen und Krokan, 2001). Der prädominante „Short-Patch“-Pfad (Abb. 1-6) beginnt mit der Erkennung und Entfernung abnormaler Basen aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Die entstandene abasische Stelle wird durch das Zusammenwirken der AP-Endonuclease APE1 und der Poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) herausgeschnitten und das fehlende Nukleotid durch die Polymerase β (polβ) eingesetzt. Die Lücke in der DNA wird durch die DNA-Ligase III geschlossen, die mit Polβ über XRCC1 (*X-ray Repair Cross Complementing Group 1*) wechselwirkt.

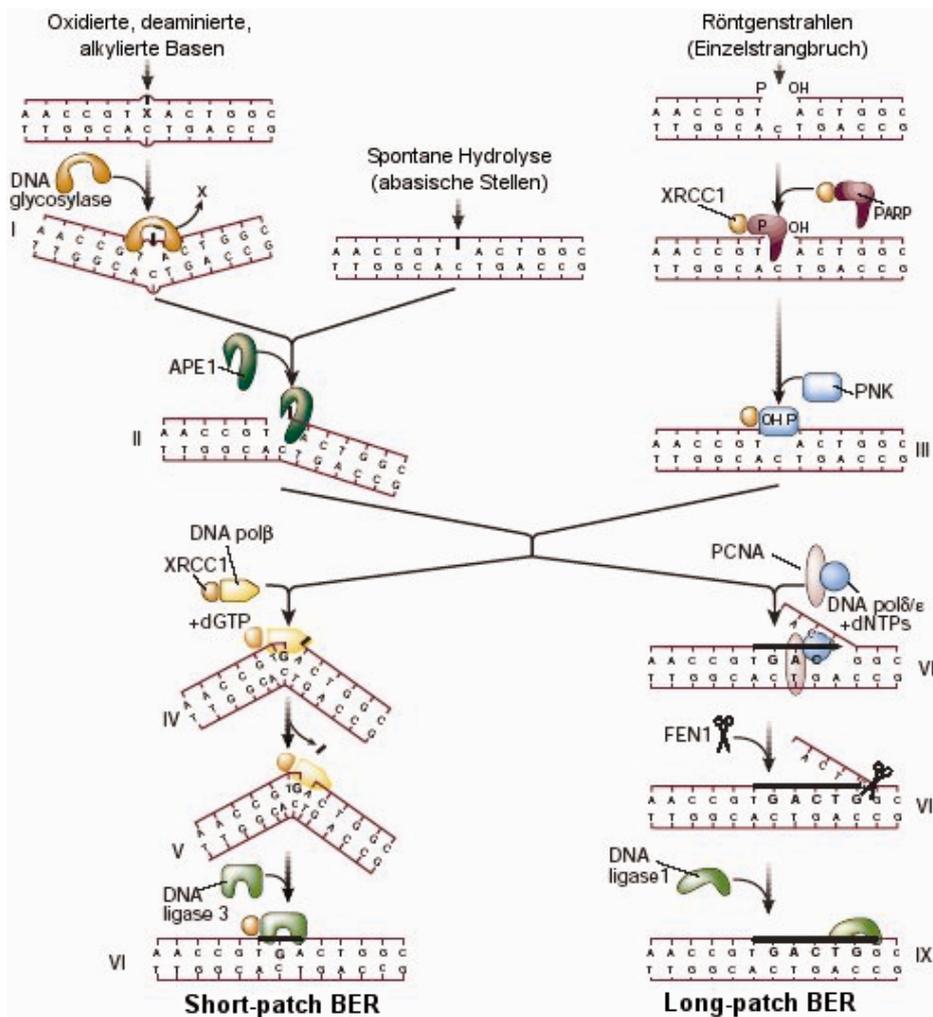


Abb. 1-6: Basenexzisions-Reparatur (BER) und Einzelstrangbruch-Reparatur (SSBR): Nach spontaner Hydrolyse bzw. nach Entfernen einer geschädigten Base durch eine DNA-Glycosylase wird die BER initiiert und APE1 schneidet die AP-Stelle endonukleolytisch ein. „**Short patch BER**“: Pol β baut ein Nukleotid ein und entfernt den dRP-Rest. „**Long patch BER**“: Pol β baut mehrere Nukleotide ein und FEN1 entfernt den ersetzten DNA-Einzelstrang. Zum Schluss wird der DNA-Einzelstrangbruch durch LigIII verschlossen. (Modifiziert nach Hoeijmakers, 2001)

Seltener ist der Pfad der „Long-Patch-BER“, charakterisiert durch das Herausschneiden von 2-10 Nukleotiden im Bereich der Läsion, der vorwiegend nach Induktion von Einzelstrangbrüchen in der DNA (Krokan, 2000) induziert wird. Nach Erkennen des Einzelstrangbruches durch den XRCC1/PARP-Komplex fügen Pol δ/ϵ und assoziierte Replikationsfaktoren zwei bis sechs Nukleotide nachfolgend zur abasischen Stelle ein und die Flap-Endonuklease FEN-1 trennt das kurze überhängende Oligonukleotid ab. Die bestehende Lücke wird abschließend von der DNA-Ligase I geschlossen. Die Funktion der Replikationsenzyme ist von den Aktivierungsenzymen „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), „replication protein A“ (RPA) und „replication factor C“ (RFC) abhängig. Störungen in diesem ubiquitär vorkommenden Reparaturweg sind aufgrund der essentiellen Bedeutung für die Zellfunktion grundsätzlich letal (Hoeijmakers, 2001).

1.6.3. Nucleotide Excision Repair (NER)

Die **Nukleotidexzisionsreparatur** ist der vielseitigste Reparaturweg der Zelle und ist in zwei Reparaturpfade unterteilt, die sich in der Art der Schadenserkennung unterscheiden (van Hoffen *et al.*, 2003). Die globale Genomreparatur („global genome NER“, ggNER) dient der Beseitigung von Schäden in nicht-transkribierten Regionen des Genoms während die Transkriptionsgekoppelte NER („transcription coupled repair“, TCR) Schäden aus aktiv transkribierten Regionen des Genoms entfernt (Tornaletti und Hanawalt, 1999; Mullenders und Berneburg, 2001; Costa *et al.*, 2003). In einem streng regulierten Multienzymprozess werden DNA Schäden, wie die durch UV-Strahlung induzierten Photoprodukte, durch Chemikalien hervorgerufene unförmige Basenaddukte oder durch Chemotherapeutika wie Cisplatin generierte Inter- und Intrastrangverbindungen repariert (Sugasawa *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist die NER auch an der Entfernung kleinerer Basenschäden, die beispielsweise durch Alkylierung und Oxidation entstehen, beteiligt (Sancar *et al.*, 2004). Diese Basenschäden werden zwar überwiegend über die BER (*Base excision repair*) beseitigt, die NER scheint aber bei Ausfall der BER die Reparatur dieser Schäden zu übernehmen (Satoh und Lindahl, 1994).

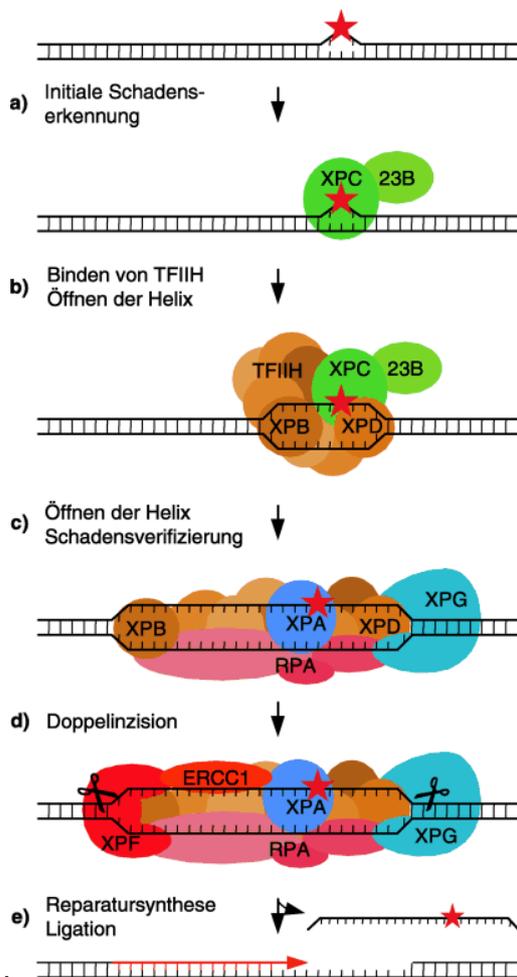


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der Nucleotidexzisionsreparatur (NER) (aus Schärer 2003)

Nach der initialen Erkennung des Schadens durch den XPC-hHR23B-Komplex (ggNER) (Abb. 1-7, a) bzw. Entfernung der DNA Polymerase II durch die beiden Proteine CSA und CSB (TCR)

verlaufen beide Reparaturwege identisch. XPC/hHR23B rekrutiert TFIIH zur Läsion, dessen Helicase-Untereinheiten (XPB und XPD) hauptsächlich an der partiellen Öffnung der DNA an der Schadensstelle verantwortlich sind (b). TFIIH rekrutiert XPG und XPA/RPA zur Läsion, die die weitere Öffnung der DNA bis zu einer Blase von etwa 25 Basenpaaren bewirken. Wahrscheinlich ist XPC zu diesem Zeitpunkt nicht mehr Teil des Komplexes (c). Nach erfolgter Schadensüberprüfung gewährleisten XPA und RPA die richtige Positionierung der beiden Endonukleasen XPG und ERCC1/XPF. Dabei schneidet XPG in 3'- und ERCC1/XPF in 5'-Position zum Schaden (d). Nach Freigabe eines Oligonukleotides aus 25 bis 32 Nukleotiden wird die Lücke durch die Replikationsmaschinerie gefüllt und durch die DNA-LigaseI geschlossen.

Defekte im NER-Reparatursystem führen zu den seltenen rezessiven Erbkrankheiten Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne-Syndrom (CS) und die Trichothiodystrophie (TTD) (de Boer und Hoesjmakers, 2000). Gemeinsam ist diesen Krankheiten eine hochgradige Sensitivität gegenüber Sonnen- bzw. UV-Strahlung.

1.6.4. Mismatch Repair (MMR)

Die Hauptaufgabe der **Mismatch-Reparatur** (MMR) liegt in der Behebung von Replikationsfehlern wie Basen-Basen-Fehlpaarungen und von Polymerasen eingefügte Nukleotid-Deletionen und -Insertionen (Aquilina und Bignami, 2001).

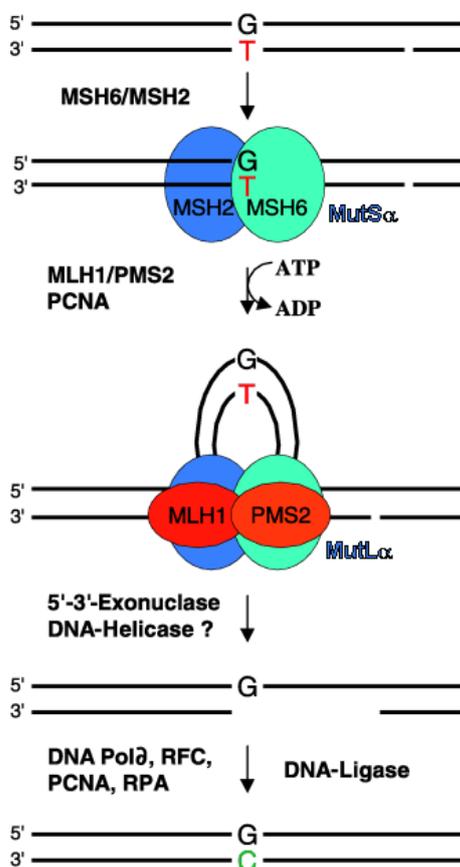


Abb. 1-8: Überblick über die humane Mismatch-Reparatur (MMR) (aus Schärer, 2003)

Die Erkennung und Reparatur geschieht beim Menschen im Wesentlichen durch die beiden Proteinheterodimere hMutS α und hMutS β , bestehend aus der Untereinheit hMSH2, die sich jeweils mit hMSH6 oder hMSH3 zum Dimer paaren. Beide Proteinheterodimere binden an DNA und erkennen - mit kleinen Unterschieden in ihrer Spezifität - Fehlpaarungen. Eine Basen-Basen-Fehlpaarung, resultierend aus einer fehlerhaften Replikation, wird vom MSH6-MSH2-Heterodimer (MutS α) erkannt (Abb. 1-8).

ATP ermöglicht das bidirektionale Einfädeln der DNA durch MutS α und das Zusammenkommen von MLH1 und PMS2 (MutL α) mit PCNA unter Bildung einer Schleifenstruktur, bei der die MMR-Proteine an der Basis und die Fehlpaarung in der Schleife angeordnet sind. Anschließend werden eine oder mehrere Exonukleasen und Helikasen aktiviert, um den fehlerbehafteten Strang abzubauen. PCNA rekrutiert die Replikationsmaschinerie, die die Lücke auffüllt, und die DNA-Ligase I, die den Nick schließt (Schärer, 2003). Schäden im MMR-Reparatursystem sind mit Auftreten einer familiären Form von frühzeitigem Darmkrebs, dem erblichem Dickdarmkarzinom vom nicht-polypösen Typ (HPNPCC *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*), verbunden.

1.6.5. DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Von besonderer Bedeutung für das Überleben der Zelle ist die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB), die auf eine Vielzahl von endogenen und exogenen Ursachen zurückgehen. DSB entstehen auf direktem Weg durch ionisierende Strahlung, freien Radikalen und chemischen Noxen sowie indirekt bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen und so genannten Strangvernetzungen (*interstrand crosslinks*). Ein einziger, unreparierter DSB kann letale Folgen für die Zelle haben, wenn er ein überlebenswichtiges Gen betrifft.

Für die Reparatur der DSBs, bei der zwei lose Enden doppelsträngiger DNA zusammen gefügt werden müssen, stehen zwei unabhängige Pfade zur Verfügung (Übersicht in Pfeiffer *et al.*, 2004; Khanna und Jackson, 2001). Die **Homologen Rekombination (HR)** ist in der späten S- und G2-Phase der vorherrschende Reparaturweg, wobei ein intaktes, homologes DNA-Molekül als Vorlage verwendet wird. Die vergleichsweise einfache koordinierte Verknüpfung gebrochener Enden, das **Nichthomologe End-joining (NHEJ)** benutzt keine oder nur extrem kurze homologe Regionen als Vorlage für die Reparatur und wird vor allem in der G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus aktiviert.

Der erste Schritt bei der Reparatur des DSB durch **Homologe Rekombination** besteht in der nukleolytischen Prozessierung der DNA-Enden am Ort des Strangbruches durch den Rad50-Mre11-Nbs1-Komplex unter Bildung jeweils einzelsträngiger Überhänge am 3'-Ende (Abb. 1-9, a). Nach Bindung der ssDNA-Enden durch das einzelstrangbindende Protein RPA wird Rad51 zur Bildung eines Nucleoproteinfilaments mit Hilfe von Rad52 und den Rad51-Paralogen (Rad51B, C, D und XRCC2, 3) auf die ssDNA geladen (b). Bei der Regulierung der Aktivität des Rad51 spielt BRCA2 eine wichtige Rolle und stimuliert wahrscheinlich die Bildung des Rad51-ssDNA-Filaments. Das Nucleoproteinfilament sucht nach Stimulation durch Rad54 nach

homologer Duplex-DNA und eine Strangaustausch-Reaktion führt zur Bildung eines Verbindungsmoleküls zwischen der beschädigten und der unbeschädigten DNA. In einem bislang ungenau verstandenen Prozess bewirken DNA-Polymerasen und ihre assoziierten Faktoren Reparatursynthesen unter Bildung einer Holliday-Verbindung (c). Die Holliday-Verbindungen lösen sich durch endonucleolytisches Aufbrechen und Wiederverbinden in einer Reaktion, die vermutlich vom Mus81-Protein abhängig ist (d) und letztlich zu zwei intakten DNA-Molekülen führt (Schärer 2003).

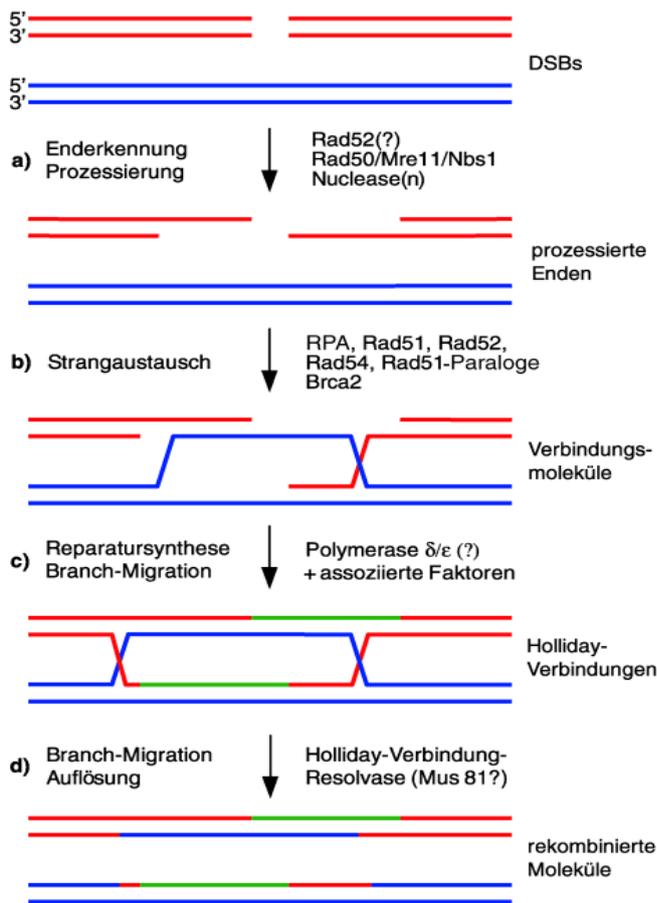


Abb. 1-9: DSB-Reparatur durch Homologe Rekombination (HR). (rot = beschädigte DNA; blau = homologes Template; grün = die durch Reparatursynthese eingefügte Sequenz). Aus Schärer (2003)

Im Vergleich zur Homologen Rekombination ist das **Nichthomologe End-joining** (Abb. 1-10) ein konzeptuell einfacher Pfad, der die Religation gebrochener Enden einschließt. Da die DNA-Enden beschädigt sein können, ist diese Art der Reparatur nicht zwangsläufig exakt und kann mit dem Verlust einiger Nukleotide einhergehen. NHEJ wird durch das Ku70/80-Heterodimer initiiert, das spezifisch an DNA-Enden bindet und einen Komplex mit der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK_{cs}) bilden (Abb. 1-10, a). Die DNA-Prozessierung der Strangbrüche wird über den Rad50-Mre-Nbs1-Komplex und einer Nuklease vorgenommen. Das Zusammenführen der Enden wird wahrscheinlich durch Rad50-Mre-Nbs1 und XRCC4-DNA-Ligase IV vorgenommen (b) während die Ligation der beiden Enden von dem XRCC4-DNA-Ligase IV – Komplex ausgeführt wird (Schärer 2003).

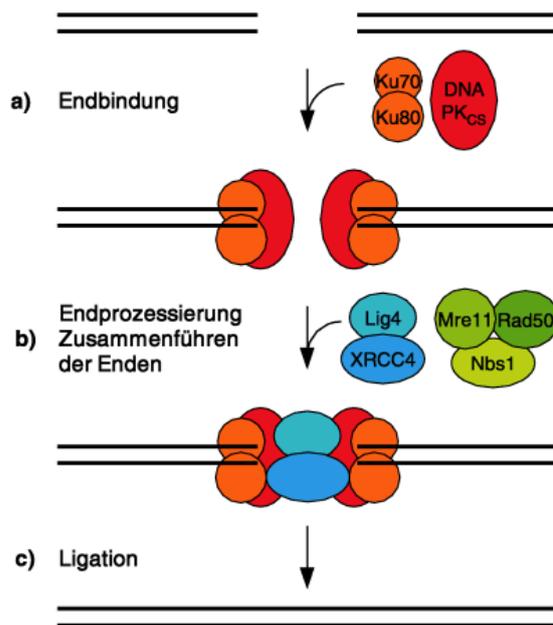


Abb. 1-10: DSB-Reparatur über den Reparaturweg des nichthomologen End-Joining (NHEJ). Aus Schärer (2003)

1.7. Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden: Zellzyklusarrest oder Apoptose?

Der Ablauf der Strahlenantwort wird allgemein so verstanden, dass mit der Wahrnehmung der DNA-Schäden durch mehrere Sensoren verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die zur Expression unterschiedlicher Gene führen. Die Produkte dieser Gene sind in den Überlebens- oder Todesstrategien der Zelle entscheidend (Martindale und Holbrook, 2002). Zu den Überlebensstrategien ist die Zellzyklusarretierung in der G₁- bzw. G₂-Phase zu zählen. Sie gibt der Zelle die Möglichkeit, die Reparatur des genetischen Materials möglichst fehlerfrei vor der Replikation bzw. Zellteilung durchzuführen (Kastan *et al.*, 1992). Schäden, die dabei unrepariert bleiben, sind Ausgangspunkte für die zelluläre Strahlenantwort. Zellen sind fähig, auf solche nicht- oder unzureichend reparierten DNA-Schäden zu reagieren. Zu den Todesstrategien zählt die Inaktivierung der Teilungsfähigkeit (mitotischer Zelltod), die permanente Arretierung des Zellzyklus gefolgt von Differenzierung und Seneszenz (Rodemann *et al.*, 1991; Ross, 1999) oder der programmierte Zelltod (Muschel *et al.*, 1998), der es dem Organismus ermöglicht, zu stark geschädigte Zellen mit unzureichendem Reparaturvermögen zu eliminieren (Burstein und Duckett, 2003). Diese strikte Einteilung von Überleben und Tod existiert in der Natur nicht. Vielmehr haben sich im Laufe der Zeit viele Übergangsstrategien entwickelt, die auch Zellen mit persistierenden Schäden das Überleben ermöglichen. Hier sind vor allem die Mechanismen der Mutagenese und der Anti-Apoptose zu nennen.

1.7.1. Der Zellzyklus und dessen Kontrolle

Säugerzellen verfügen über Zellzyklus-Kontrollpunkte, die durch DNA-Schäden aktiviert werden und die durch Inhibierung Cyclin-abhängiger Kinasen (CdK) den Übergang in die nachfolgende Zellzyklusphase verhindern. In Eukaryontenzellen existieren mindestens drei verschiedene Kontrollpunkte (*Checkpoints*), die als G₁/S-, S- und G₂/M-Kontrollpunkt bezeichnet werden. Eine

zentrale Bedeutung für die Steuerung der zellulären Antwort auf einen DNA-Schaden kommt den so genannten *Checkpoint-Kinasen* zu. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: 1. Proteine, die aufgrund ihrer Homologie zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-K) gezählt werden: Zu ihnen gehören die humanen Proteine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*ATM- and RAD3-related*). 2. Proteine mit klassischer Serin/Threonin-Kinaseaktivität wie CHK1 und CHK2 (Checkpoint-Kinasen 1 und 2) Diese Proteine stehen ganz am Anfang der Signaltransduktionsketten, die als zelluläre Reaktion auf DNA-Schädigung induziert werden. Am Ende der Kette stehen Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK, *cyclin-dependent kinase*) sowie weitere Zellteilungsproteine (CDC, *cell division control* Proteine).

1.7.1.1. Der G1/S Checkpoint

Der Zellzyklusarrest im G1/S-Checkpoint wird über die beiden PI3-Familienmitglieder ATM und ATR sowie die beiden Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 reguliert. Infolge von DNA-Schäden – zumeist DNA-Strangbrüche – wie sie durch ionisierende Strahlung oder ROS (*reaktive Sauerstoffspezies*) entstehen, erfolgt direkt durch ATM/ATR oder indirekt über CHK1 und 2 eine Phosphorylierung des p53 Proteins, wodurch dessen endogene Konzentration durch Verlangsamung seines proteolytischen Abbaus stabilisiert wird (Caspari, 2000). In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor induziert p53 die Expression des CDK2-Inhibitors p21 (CDKN1A), der die Aktivierung des CyclinE-CDK2-Komplexes inhibiert und somit den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert. Die Aktivierung der Phosphorylierung von p53 ist von der Art des schädigenden Agens abhängig: Durch ionisierende Strahlung wird p53 primär durch ATM modifiziert, nach UV oder durch Hydroxyharnstoff wird vor allem ATR zur p53-Phosphorylierung verwendet (Nelson und Kastan, 1994).

1.7.1.2. Der S-Phase-Checkpoint

Der Replikationsstopp nach Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Agentien lässt sich speziell in dieser Phase mit deutlich niedrigeren Konzentrationen auslösen als in anderen Phasen des Zellzyklus. Die DNA ist in der S-Phase besonders mutationsanfällig und entsprechend empfindlich wird der S-Checkpoint reguliert. Infolge eines DNA-Schadens während der Replikation erfolgt zunächst die Aktivierung der Checkpoint-Kinase CHK2 durch ATM oder ATR. CHK2 phosphoryliert CDC25A, das daraufhin proteosomal degradiert wird und dadurch die Aktivierung des der S-Phase regulierenden CyclinE(A)-CDK2-Komplexes verhindert. Nach Petrini (1999) und Xu *et al.* (2001) sind auch die Reparaturproteine NBS1 und BRCA1 in die Kontrolle des S-Checkpoints involviert.

1.7.1.3. G2/M-Checkpoint

In der G2-Phase (Postsynthesephase) findet eine Überprüfung der Vollständigkeit der Replikation statt. Als wichtigste Antwort auf einen DNA-Schaden, der in der späten S-Phase oder während

der G2-Phase auftritt, wird die Aktivierung des Cyclin B-Cdk2-Komplexes verzögert. Uneinigkeit herrscht über die Beteiligung der Zellzykluskontrollproteine: Während eine entscheidende Rolle von ATM nachgewiesen wurde, scheint p53 nicht in allen Zelllinien an der Auslösung des G2-Arrests mitzuwirken (Pietenpohl und Stewart, 2002). Es scheint zudem vom schädigenden Agens abzuhängen, ob ein p53-abhängiger G2-Phasen-Arrest, wie durch ionisierende Strahlung (Guillouf *et al.*, 1995) oder ein p53-unabhängiger G2-Phasen-Arrest, wie durch Bestrahlung mit UV-C erfolgt (Al-Mohanna *et al.*, 2001). Nach Abraham (2001) kommt es in Zellen, die während der G1- oder S-Phase einen DNA-Schaden erleiden aber dennoch bis G2 im Zellzyklus weiterlaufen, zu einer Aktivierung der ATR-Kinase, die nachfolgend CHK1 phosphoryliert. Kommt es hingegen während der G2-Phase zur Schädigung der DNA, so wird die ATM-Kinase aktiviert, die anschließend CHK2 phosphoryliert. Beide Checkpoint-Kinasen (CHK1 und CHK2) vermitteln die Bindung so genannter 14-3-3-Kinasen an CDC25C und verhindern dadurch den CyclinB-CDC2-vermittelten Eintritt der Zelle in die Mitose. Nach Aprelikova *et al.* (2001) und Taylor und Stark (2001) existiert ein alternativer ATM/ATR-unabhängiger Signaltransduktionsweg zur Arretierung der Zellen in der G2/M Phase, in den die Aktivierung bestimmter Gene durch p53 und/oder BRCA1 involviert ist, darunter p21 (CDKN1A), GADD45 α und 14-3-3 σ . Die Aktivierung der DNA-Reparatursysteme beim G2/M-Arrest erfolgt wiederum durch verschiedene Induktoren wie BRCA1, ATM oder den NBS/MRE11/RAD50-Komplex, die selbst alle in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur involviert sind.

1.7.2. DNA-Schäden und Apoptose

Ist der DNA-Schaden zu groß, kommt es nicht zur Arretierung des Zellzyklus mit nachfolgender Reparatur, sondern zur Einleitung der Apoptose. Die verschiedenen apoptotischen Signaltransduktionswege sind überaus komplex reguliert und sowohl miteinander als auch mit der DNA-Reparatur und/oder der Zellzykluskontrolle verknüpft (Coultas und Strasser, 2000). Der Prozess der Apoptose ist durch eine klar gegliederte Reihenfolge morphologisch erkennbarer Schritte gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1972). Diese beginnen mit der Kondensation von Zellkern und Zytoplasma mit nachfolgendem Volumenverlust der Zelle und damit verbundenen Ausstülpungen der Zellmembran. Im weiteren Verlauf werden Zellmembran und Kern fragmentiert und die Zelle zerbricht in so genannte „*apoptotic bodies*“, die von anderen Zellen aufgenommen und lysosomal abgebaut werden. Obwohl es auch andere Mechanismen der Apoptose gibt, wird dieser Prozess im Wesentlichen durch die Aktivität spezifischer Proteasen, den so genannten Caspasen, gesteuert. Von den mehr als zehn bislang bekannten Caspasen wurden die Caspasen 3, 6 und 7 als so genannte Effektor-Caspasen identifiziert, die für die oben geschilderten morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich sind. Die Aktivierung der Initiator-Caspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10), die die proteolytische Aktivierung der Effektor-Caspasen einleiten, kann über mindestens zwei Reaktionswege ablaufen (Abb. 1-12), die beide von p53 gesteuert werden (Orrenius *et al.*, 2003). Beide Wege sind durch sich gegenseitig aktivierende Faktoren

verbunden und laufen auf der Ebene der Effektor-Caspasen zusammen. Bei der **Rezeptor-vermittelten Apoptose** besteht das primäre Signal in der Bindung eines extrazellulären Liganden an Oberflächenrezeptoren der Zellmembran. Im Mittelpunkt dieser *extrinsischen* Form der Apoptose stehen die Wechselwirkungen der TNF-(*Tumour necrosis factor*) Rezeptorfamilie, die die *Todesrezeptoren* bilden. Liganden dieser Rezeptoren sind z.B. TNF- α , FasL (Fas Ligand = CD95L= Apo-1L) und TRAIL (Apo-2L)). Die Todesrezeptoren enthalten in ihrem intrazellulären Anteil eine so genannte *Death domain* (Todesdomäne), die für die Weiterleitung des apoptotischen Signals essentiell ist.

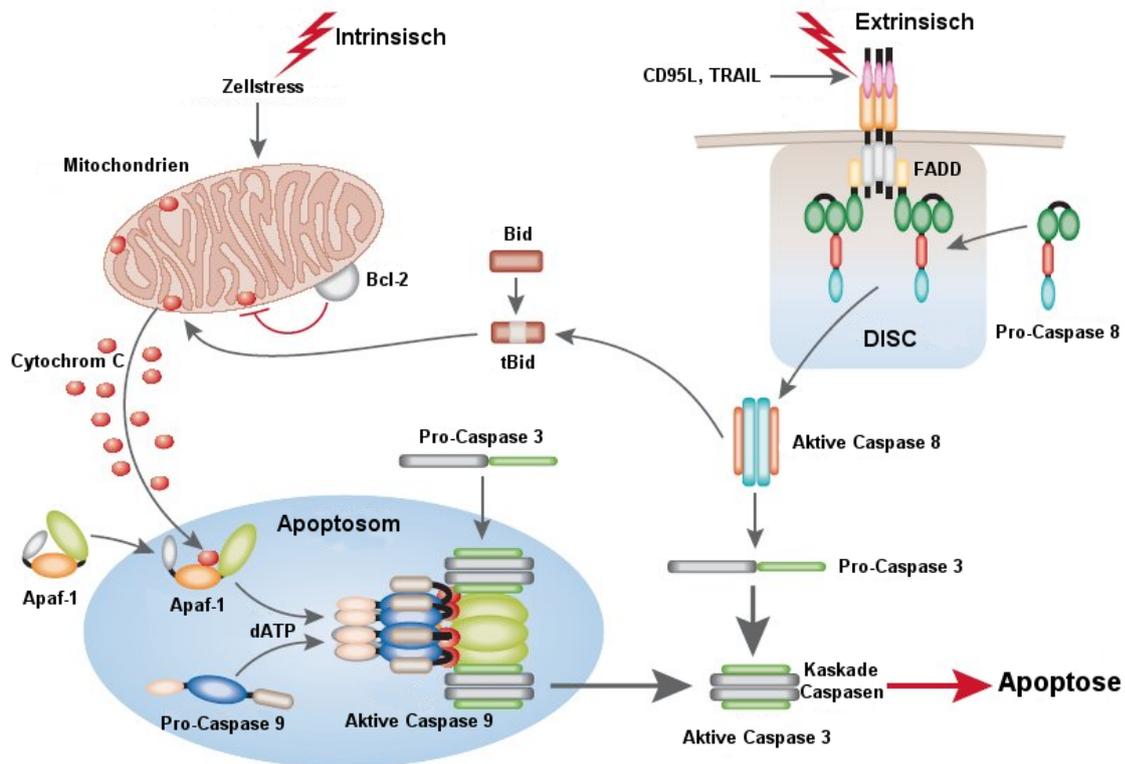


Abb. 1-12: Schema der apoptotischen Caspase-Aktivierung: **Extrinsische Faktoren** führen über die Bindung an Oberflächenrezeptoren der TNF-Superfamilie zu einer schnellen Aktivierung der Pro-Caspase 8, die zusammen mit dem Adaptormolekül FADD in einem Rezeptor-Ligand-Komplex (DISC) zur Aktivierung der Initiator-Caspase 8 führt. **Intrinsische Faktoren** führen über Stress-induzierte Stimuli zu einer Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C, welches mit Apaf-1 und ATP einen Apoptosom-Komplex bildet. Dieses löst über die Aktivierung der Caspase 9 die proteolytische Kaskade aus. Die Freisetzung von Cytochrom C wird teilweise über Mitglieder der Bcl-2 Familie moduliert, wobei anti-apoptotische Faktoren (Bcl-2/ Bcl_{xL}/ Mcl1) die Apoptose inhibieren und pro-apoptotische (Bax/ Bak/ tBid) diese fördern. (Abbildung modifiziert nach MacFarlane und Williams, 2004)

Entscheidend für die Eliminierung von Zellen nach einem DNA-Schaden sind die Signalwege der **intrinsischen Apoptose**, die durch Freisetzung mitochondrialer Moleküle in das Zytoplasma initiiert wird (Wang, 2001). Die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran wird dabei über die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie gesteuert. Zytoplasmatisches Cytochrom C bildet zusammen mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 das Apoptosom, das zur Aktivierung von der Caspasen 9 und 3 führt.

1.8. Regulatoren der zellulären Strahlenantwort

Die Aufklärung intrazellulärer Prozesse, die in die molekulare Strahlenantwort involviert sind, ist mit dem Bestreben verbunden, Kandidatengene zu identifizieren und diese als prädiktive Marker für eine Risikoabschätzung nach Strahlenexposition heranzuziehen. Die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse der strahleninduzierten molekularen Mechanismen zeigen, dass die in Strahlenantwort involvierten Gene keine singuläre Funktion ausüben, sondern in ein weit verzweigtes Netzwerk mit multiplen Funktionen eingebettet sind. Im Verlauf der molekularen Strahlenreaktion kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Prozesse wie Reparatur, Proliferation, Differenzierung und Apoptose im Rahmen der zellulären Strahlenantwort regulieren.

Für die Entwicklung eines Testsystems zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität sollte die biologische Antwort potentieller Kandidatengene verschiedener Signaltransduktionswege nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten charakterisiert werden. Im Focus des Interesses standen dabei Gene, die in Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktoren p53 und NF- κ B reguliert werden.

1.8.1. Der Tumorsuppressor p53 und seine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität

Die Strahlenreaktion der Zelle wird durch ein äußerst komplexes intrazelluläres Netzwerk von Regelmechanismen gesteuert. Der Tumorsuppressor p53 gilt als zentrales Protein in einem Multienzym-Multifunktions-Netzwerk nimmt in der Vermittlung der zellulären Strahlenantwort eine Schlüsselstellung ein. Nach Aktivierung infolge Stresses werden Faktoren exprimiert, die einerseits eine Arretierung des Zellzyklus und die Reparatur einleiten, andererseits - bei Vorliegen von irreparablen Schäden - den kontrollierten Zelltod induzieren (Vogelstein *et al.*, 2000). Obwohl p53 einer der Hauptregulatoren innerhalb dieses Netzwerks zu sein scheint, ist es sicherlich nicht ein unentbehrlicher Baustein, dessen Verlust unweigerlich zu einer Strahlenresistenz führt (Dahm-Daphi, 2000).

In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor liegt p53 in der Zelle normalerweise nur in latenter Form und geringer Konzentration vor, wobei die Funktion dieses „latenten“ Proteins weitgehend unklar ist. Durch Stresssignale wie Bestrahlung mit UV-Licht oder ionisierender Strahlung, einer Vielzahl von chemotherapeutischen Chemikalien, erhöhten Mengen von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS), viralen Infektionen, Hypoxie oder Aktivierung von Onkogenen (z.B. myc, ras) wird der Tumorsuppressor stabilisiert (Jin und Levine, 2001). Nachfolgend kommt es zu einer Akkumulation von p53 im Zellkern (Fritsche *et al.*, 1993), wo es die Transaktivierung von p53-abhängigen Zielgenen induziert. Voraussetzung für eine Stabilisierung und Aktivierung sowie die Regulation der vielfältigen biologischen Aufgaben des Tumorsuppressors scheint die Modifikation durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ribosylierung, O-Glycosylierung oder Sumoylierung zu sein (Appella und Andersen, 2001; Melchior und Hengst, 2002).

Die durch p53 transaktivierte Zielgene können entsprechend ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt werden. Darunter gehören Gene wie *p21*, *14-3-3* oder *GADD45*, die einen Zellzyklusarrest einleiten und zum anderen Gene wie *BAX*, *PIG-3*, *NOXA*, *Puma*, *Fas/Apo-1* und *KILLER/DR5*, deren Produkte zur Induktion des programmierten Zelltods führen. Eine Beteiligung von p53 an Reparaturvorgängen wurde durch Identifizierung der p53-abhängigen Reparaturfaktoren DDB2 (Hwang *et al.*, 1999) und p53R2 (Tanaka *et al.*, 2000) belegt. Darüber hinaus nimmt p53 über transkriptions-unabhängige Mechanismen wie etwa die Interaktion mit weiteren Reparaturfaktoren Einfluss auf die Erkennung und Beseitigung von DNA Schäden (Therrien *et al.*, 1999; Rubbi und Milner, 2003; Zhou *et al.*, 2001; Smith und Seo, 2002).

1.8.2. Der nukleäre Faktor kappa B als Regulator der Zellantwort auf Stress

Nach Bestrahlung ist das Zusammenspiel der Aktivierung pro- und antiapoptotischer Faktoren, die die Todes- oder Überlebensstrategie der Zelle steuern, von besonderem Interesse. In diesen Prozess ist der durch zahlreiche Stimuli aktivierbare Transkriptionsfaktor *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) involviert. Mit dem Begriff NF- κ B wird eine komplexe Familie von Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die als Homo- oder Heterodimer verschiedener Untereinheiten wirken. Spezifische Inhibitoren binden den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma. Nach Aktivierung kommt es zur Degradation des Inhibitor-Komplexes und zu einer Translokation in den Kern, wo die Transkription relevanter Zielgene gestartet wird. Die Aktivierung von NF- κ B geht mit der Inhibition apoptotischer Prozesse einher und steuert somit wichtige Überlebensmechanismen der Zelle wie die spezifische und unspezifische Immunantwort und die Reparatur von Gewebeschäden.

1.9. Fragestellung

Neben dem Aufenthalt unter Mikrogravitation ist die Strahlung im Weltraum ein unüberschaubares Risiko für den Langzeitaufenthalt des Menschen. Eine mögliche Interaktion zwischen Strahlung und Mikrogravitation, die auf der Erde nur unzureichend simuliert werden kann, ist nicht auszuschließen und bislang nur ungenügend untersucht. Zudem kann die erhöhte Strahlenbelastung, die eine auf der Erde nicht zu erfahrende Qualität besitzt und bislang im Weltraum nur bedingt abgeschirmt werden kann, mit einem erhöhten Krebsrisiko für den Astronauten einhergehen. Deshalb werden Experimente entwickelt, mit denen strahlenbiologischen Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene unter Mikrogravitationsbedingungen im Weltraum untersucht werden können.

Ziel der Arbeit ist es, ein solches Experiment zu konzipieren und ein geeignetes biologisches Testverfahren zur Detektion strahleninduzierter Genexpression zu entwickeln. Aufgrund der experimentellen Limitierung im Weltraumlabor ist dieses Testverfahren so zu gestalten, dass der Nachweis einer Genaktivierung ohne Manipulation durch den Astronauten eigenständig über ein so genanntes *Gen-Reporter-Assay* ablaufen kann. Diese Technologie arbeitet nach dem Prinzip der Rezeptor-Reporter-Ketten, wobei das zu untersuchende Gen mit einem Reporter-Gen

gekoppelt wird, so dass dessen transkriptionelle Aktivität untersucht werden kann. Als Rezeptor ist ein Gen mit möglichst hoher schadensinduzierte Expression zu verwenden, das zudem als zelluläre Reaktion auf einen DNA-Schaden wirkt, unabhängig von der Art des induzierenden Agens. Um geänderte Genexpression nach Bestrahlung unterschiedlicher Qualität zu erfassen, werden verschiedene Untersuchungsmethoden etabliert, die sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene differentielle Genregulation aufzeigen.

Neben der Identifizierung eines geeigneten Kandidatengens soll eine geeignete Zelllinie gefunden werden, die für Experimente unter den speziellen Kultivierungsbedingungen im Weltraumlabor geeignet ist. Aus diesem Grund werden die folgenden humanen Zelllinien hinsichtlich ihres strahlenbiologischen Verhaltens und ihrer Wachstumseigenschaften charakterisiert:

- die aus der Primärkultur eines gesunden Spenders etablierte Fibroblasten-Zelllinie NHF
- die embryonale Nierenzelllinie HEK 293
- die Mammakarzinomzelllinie MCF-7
- die Magenkarzinomzelllinie AGS
- die epitheliale Lungenkarzinomzelllinie A549

Neben der Untersuchung biologischer Endpunkte nach Bestrahlung wie das zelluläre Überleben, die Induktion von Strahlenschäden und deren Reparatur, soll die Modulation der Genexpression potentieller Kandidatengene auf Genexpressionsebene charakterisiert werden. Die Experimente sollen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten, die die Komponenten der Weltraumstrahlung simulieren, durchgeführt werden. Dazu gehören:

- Dünn-ionisierende Röntgenstrahlen
- Dicht-ionisierende leichte Ionen (Alpha-Teilchen)
- Dicht-ionisierende schwere Ionen (beschleunigte Kohlenstoff-, Argon- und Blei-Ionen)

Nach Identifizierung eines geeigneten Kandidatengens und Konstruktion eines Expressionsvektors soll das entwickelte *Reporter-Vektor-System* zur Detektion strahleninduzierter Genexpression in das Genom einer geeigneten Zelllinie stabil integriert werden und auf seine Induzierbarkeit nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten getestet werden.