

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Zelllinien

Genauere Kenntnisse über Wachstumsbedingungen und strahlenbiologischen Charakteristika sind Grundlagen für die Identifizierung einer geeigneten Zelllinie für ein Weltraumexperiment. Das Wachstumsverhalten der adhären wachsenden Zellen zeigte in allen untersuchten Zelllinien Gemeinsamkeiten: Nach der Aussaat, in der *lag*-Phase des Wachstums, setzen sich die nach Trypsinierung abgerundeten Zellen mit einer für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Effizienz auf dem Boden des Kulturgefäßes fest. Daher kommt es in dieser Phase zu einem kurzfristigen Abfall der Zellzahl (Abb. 3-1). Nach Anpassung an die Wachstumsbedingungen folgt die exponentielle Wachstumsphase, in der die Zellen unter optimalen Bedingungen eine maximale Teilungsrate zeigen. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens 5 bis 7 Tage nach Aussaat treten die Zellen durch Ausbildung einer Kontaktinhibition in die stationäre Phase des Zellwachstums ein. Zur Kontrolle des Wachstumsverhaltens der verschiedenen Zelllinien wurden Wachstumskinetiken aufgenommen. Diese wurden entweder durch tägliche Zellzählung der Zellen oder durch Messung des Gesamt-DNA-Gehalts der Zellpopulation ermittelt.

3.1.1. MCF-7

Das Wachstum der Östrogen-Rezeptor-positiven Zellen wird durch Zugabe von Insulin ins Wachstumsmedium geringfügig beschleunigt. Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von MCF-7 Zellen mit und ohne Insulinzugabe bei einer Aussaat von 3×10^4 Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche. Um eine Passagedauer von 7 Tagen zu gewährleisten, wurden die Zellen in geringerer Zelldichte ausgesät und standardmäßig unter Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin kultiviert. Die Eigenschaft dieser gut untersuchten Brustkrebszellen, übereinander liegende Zellaggregate zu bilden, erwies sich in Bezug auf den experimentellen Umgang als sehr problematisch aus. Während die Zellen eine ausgeprägte Zell-Zell-Adhäsion zeigten, die durch Trypsin-Behandlung nur schwer zu lösen war, war das Adhäsionsvermögen der Zellpopulation auf dem Boden der Kulturgefäße dagegen herabgesetzt. So kam es oft zum ungewolltem partiellen Lösen der Zellpopulation vom Boden der Kulturgefäße.

3.1.2. A549

Die morphologisch etwas kleineren Zellen der epithelialen Lungenkarzinom- Zelllinie A549 (Abb. 3-2) wiesen bei einer Aussaatdichte von 1×10^4 Zellen / cm^2 Wachstumsfläche eine Verdopplungszeit von 19,16 Stunden auf. In der Routinekultivierung waren die Zellen unproblematisch und ließen sich im Gegensatz zu den Brustkrebszellen durch Trypsin-Behandlung leicht vereinzel.

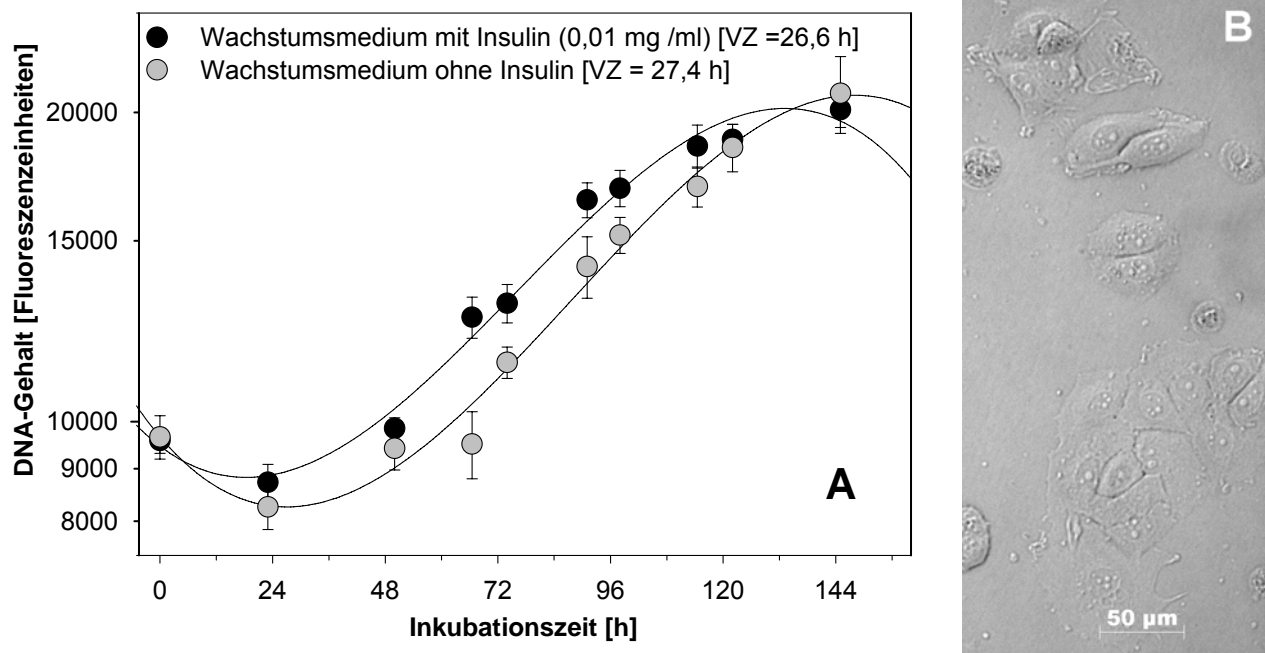


Abb. 3-1: Wachstumskinetik (A) und Morphologie (B) der Brustkrebszelllinie MCF-7.

A: Die Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte durch Messung der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffs Bisbenzimid zu definierten Zeitpunkten nach Aussaat von 3×10^4 Zellen /cm² pro Vertiefung einer 96-well Platte. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen mit $n = 6$ pro Zeitpunkt. [VZ = Verdopplungszeit]

3.1.3. AGS

Auch die Magenadenokarzinom-Zelllinie AGS (Abb. 3-3) zeigte in der Routinekultivierung keinerlei Besonderheiten. Sie wies bei einer Aussaatdichte von 2×10^4 Zellen /cm² Wachstumsfläche eine Verdopplungszeit von 18,3 Stunden auf.

3.1.4. HEK 293

Die Experimente mit der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 erforderten eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid, das in einer monomolekularen Schicht als Polykation eine stärkere Bindung der Zellen an das Substrat ermöglicht. Die Zelllinie zeigte unter Standardkulturbedingungen bei einer Aussaatdichte von 3×10^4 Zellen pro cm² Wachstumsfläche eine Verdopplungszeit von 22,9 Stunden.

3.1.5. Normale Humane Fibroblasten aus einer Primärkultur (NHF)

Wie unter 2.2.3.2 beschrieben wurden beim Umgang mit Fibroblasten aus Nabelschnurgewebe (Abb. 3-5) die zellkinetischen Daten der Zellpopulation erfasst. Von der ersten bis etwa dreißigsten Passage lag die Verdopplungszeit der Kultur bei 20 bis 24 Stunden. Mit steigender Passagezahl nahm die proliferative Kapazität ab, so dass bei Abweichungen der Daten eine neue Kultur aus dem Stickstoffvorrat angelegt wurde.

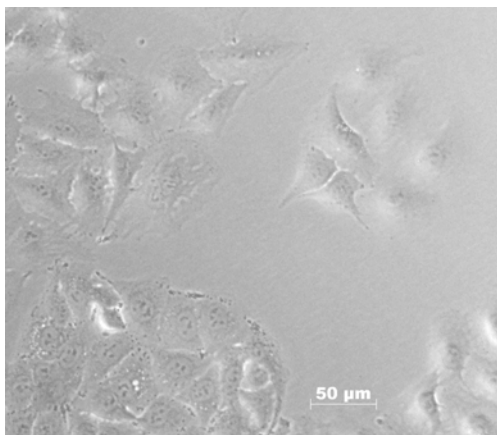


Abb. 3-2: Phasenkontrastdarstellung eines wachsenden Zellrasens von A549 Zellen.

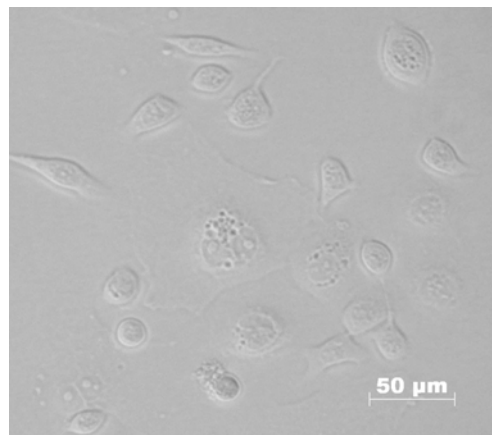


Abb. 3-3: Phasenkontrastdarstellung wachsender AGS-Zellen

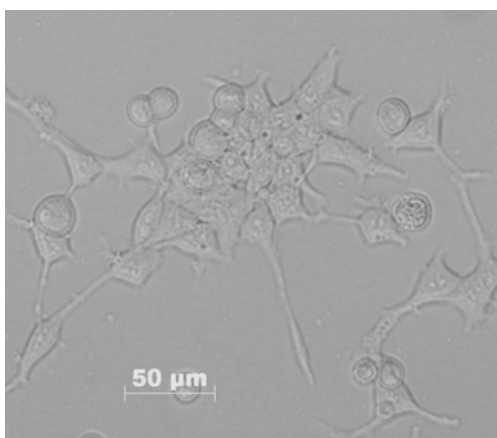


Abb. 3-4: Phasenkontrastdarstellung einer wachsenden Kolonie von HEK-Zellen

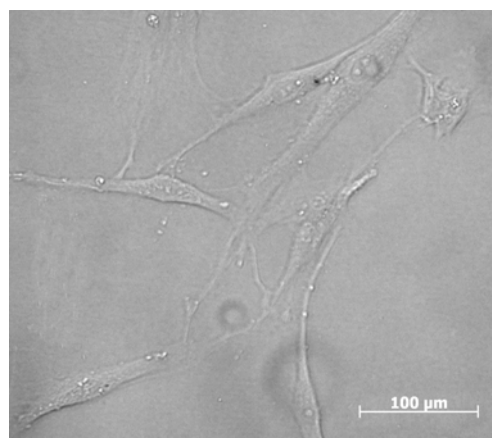


Abb. 3-5: Zellmorphologie von normalen humanen Fibroblasten (NHF) aus Nabelschnur-gewebe eines gesunden Spenders

3.2. Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit

3.2.1. γ -H2AX als gewebsspezifischer Biomarker für die Induktion von Doppelstrangbrüchen

Auf zellulärer Ebene gilt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) als entscheidende Läsion nach Exposition mit ionisierender Strahlung. Die Anzahl der pro Gy induzierten Doppelstrangbrüche variiert zwischen unterschiedlich strahlenempfindlichen Zellen nur wenig, wohl aber die Fähigkeit zur Reparatur. Daher wird zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit die Zahl der nach einer Reparaturinkubation verbleibenden Strangbrüche bestimmt. Im Focus des Interesses stand hierbei das Reparaturverhalten der A549 Zellen, die die Kriterien einer geeigneten Zelllinie für ein Weltraumexperiment erfüllten.

Zur Detektion der Strangbrüche nach Bestrahlung wurde der immun-fluoreszenzmikroskopische Nachweis von γ -H2AX-Foci, die innerhalb weniger Sekunden nach Induktion über eine Phosphorylierung von H2AX an Serin 139 in der Umgebung von Doppelstrangbrüchen auftreten, benutzt. Dazu wurden nahezu konfluent wachsende A549 Zellen einer Strahlendosis von 1 Gy Röntgenstrahlen exponiert, zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und mit γ -H2AX-

spezifischen Antikörpern gefärbt.

Die γ -H2AX-Foci waren im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 125, Zeiss) als punktförmig sichtbare Strukturen zu erkennen (Abb. 3-6) und wurden nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen zu den angegebenen Zeitpunkten ausgezählt (Tabelle 3.1).

Tab. 3-1: Kinetik der Doppelstrangbruchreparatur in A549-Zellen nach Exposition mit 1 Gy Röntgenstrahlen

| | Mittelwert | Standardabweichung (\pm) | Anzahl Zellen |
|-------------|------------|------------------------------|---------------|
| Kontrolle | 0,03 | 0,25 | 443 |
| 10 Minuten | 37,02 | 12,5 | 208 |
| 30 Minuten | 30,06 | 13,4 | 213 |
| 120 Minuten | 15,32 | 16,1 | 342 |
| 360 Minuten | 1,44 | 2,5 | 832 |
| 24 Stunden | 0,5 | 1,0 | 442 |

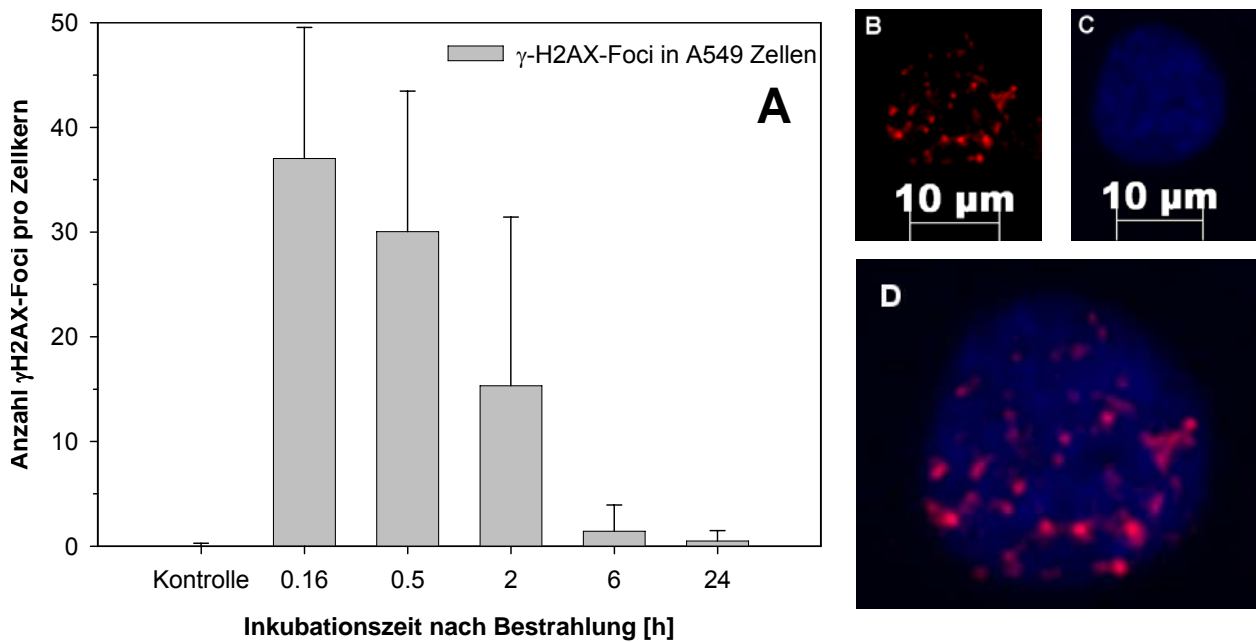


Abb. 3-6: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Doppelstrangbrüchen in A549 Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen. **A:** Kinetik der Doppelstrangbruchreparatur: Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens 250 Zellen ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der γ -H2AX-Signale aller auswertbaren Zellen. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der γ -H2AX-Foci 30 Minuten nach Bestrahlung. Die induzierten Doppelstrangbrüche konnten über den gesamten Zellkern verteilt nachgewiesen werden. **C:** Kernfärbung mit DAPI und **D:** Überlagerung mit Fluoreszenzbild

Im Verlauf der Kinetik bis 24 Stunden nach Bestrahlung nahmen sowohl Anzahl als auch Größe der Foci ab. Ein Maximum an γ -H2AX-Signalen wurde 10 Minuten nach Bestrahlung mit 1 Gy detektiert. Die Anzahl der Foci reduzierte sich im weiteren Verlauf der untersuchten Kinetik. Sechs Stunden nach Bestrahlung war die Mehrzahl der induzierten DSBs repariert, wobei die Anzahl detektierter γ -H2AX-Signale 24 Stunden nach Bestrahlung über Kontrollniveau lag.

3.2.2. Bestimmung der Targetgröße

Bei der Bestrahlung mit hochenergetischen Ionen ist der Spurdurchmesser im Vergleich zum Durchmesser des Zellkerns groß. Für die Berechnung der Energiedosen wurde die mittlere Fläche der Kernprojektion, deren Größe bei den verschiedenen Zelllinien variierte, nach Färbung des Zellkerns mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) bestimmt. Die ermittelten planimetrischen Werte wiesen innerhalb der untersuchten Zelllinien große Unterschiede auf (Tabelle 3-2). So differierte die Kernfläche der Fibroblasten im Vergleich mit der der Zelllinien A549 und MCF-7 um einen Faktor von 3 und mit der der Zelllinien AGS und HEK um einen Faktor von etwa 2.

Tab. 3-2: Kernfläche [μm^2] und Kernumfang [μm] der untersuchten Zelllinien. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens 100 ausgewerteten Zellkernen pro Zelllinie.

| Zelllinie | Anzahl n | Kernfläche [μm^2] | Kernumfang [μm] |
|-----------|----------|--------------------------------|------------------------------|
| MCF-7 | 106 | 278,26 \pm 131.32 | 60,85 \pm 10.87 |
| A549 | 102 | 247,11 \pm 50.17 | 58,97 \pm 6.18 |
| AGS | 100 | 145,20 \pm 57.44 | 45,92 \pm 7.64 |
| HEK | 101 | 142,20 \pm 22.89 | 44,23 \pm 4.44 |
| NHF | 101 | 77,28 \pm 38.21 | 32,30 \pm 7.05 |

3.2.3. Zelluläres Überleben nach Bestrahlung: Koloniebildungstest

Als Maß für die Zellschädigung nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten und den Einfluss der Strahlendosis auf Zellwachstum und Vitalität wurde der Koloniebildungstest nach Puck und Markus (1995) durchgeführt. Für jede untersuchte Strahlenart wurden die Kenngrößen der Dosiseffektkurven ermittelt und zum Vergleich der verschiedenen Zelllinien bezüglich ihrer individuellen Strahlenempfindlichkeit tabellarisch dargestellt.

Bestrahlung mit locker-ionisierender Strahlung

Die Dosiseffektkurven der Zelllinien MCF-7, HEK, A549, AGS und NHF (Abb. 3-7) zeigen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung im Bereich niedriger Dosen eine Schulter und gehen im Bereich höherer Strahlendosen in einen exponentiellen Kurvenverlauf über. Im Bereich höherer Strahlendosen lassen sich deutliche Unterschiede feststellen. Die Empfindlichkeit der Zelllinien nimmt in der Reihenfolge HEK \rightarrow A549 \rightarrow MCF-7 \rightarrow AGS \rightarrow NHF zu (Tab. 3-3).

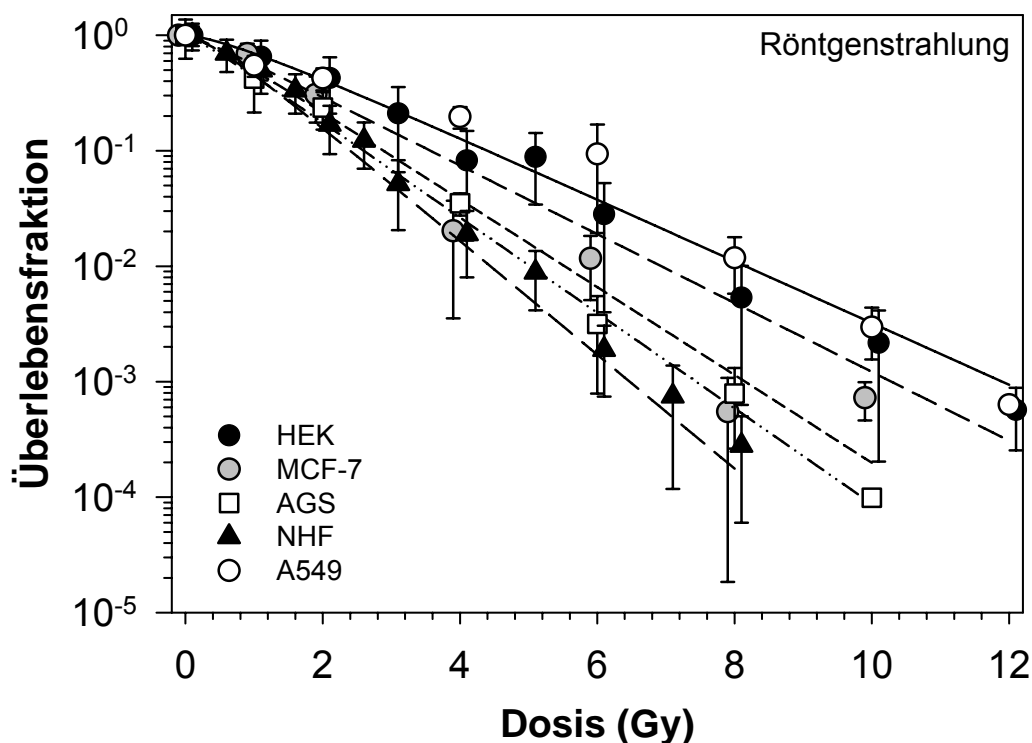


Abb. 3-7: Dosis-Effektkurven nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen der Zelllinien A549, NHF, AGS, HEK und MCF-7. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unterschiedlichen Versuchen mit jeweils sechs Petrischalen.

Tabelle 3-3: Kenngrößen der Dosis-Effektkurven nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

| Zelllinie | D_0 | n | Dq | r^2 |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| MCF-7 | $1,142 \pm 0,048$ | $1,260 \pm 0,184$ | $0,263 \pm 0,173$ | 0,8827 |
| HEK | $1,456 \pm 0,033$ | $1,167 \pm 0,088$ | $0,225 \pm 0,113$ | 0,8833 |
| NHF | $0,908 \pm 0,008$ | $1,300 \pm 0,036$ | $0,241 \pm 0,027$ | 0,9447 |
| A549 | $1,402 \pm 0,052$ | $1,518 \pm 0,230$ | $0,585 \pm 0,227$ | 0,9005 |
| AGS | $1,050 \pm 0,058$ | $1,191 \pm 0,326$ | $0,183 \pm 0,278$ | 0,9610 |

Der D_0 -Wert entspricht dem negativen Kehrwert der Steigung der Regressionsgeraden. Die Extrapolationszahl n der Regressionsgeraden entspricht dem Schnittpunkt der extrapolierten Regressionsgerade mit der Ordinate. Der Quasischwelldosiswert Dq wird aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Gerade mit der 100 %-Überlebenslinie ermittelt. Bestimmtheitsmaß oder Determinationskoeffizient r^2 ist das Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r .

Beschleunigte Schwerionen

Die räumliche Verteilung der Energiedeposition ist längs einer Teilchenspur nicht konstant, sondern steigt bei Bestrahlung mit hochenergetischen Ionen langsam mit wachsender Eindringtiefe an um nach einem scharfen Maximum - dem so genannten *Bragg-Peak*- steil abzufallen. Unter Berücksichtigung des Energieverlusts, die ein beschleunigtes Teilchen vor Auftreffen auf die Zellschicht nach Durchqueren verschiedener Materialien erfährt (siehe 2.4.6.3), wurde für jede Ionenart ein Profil der Tiefendosisverteilung erstellt (Abb. 3-8). Bei Annahme einer durchschnittlichen Zelldicke von $\leq 5 \mu\text{m}$ wurde die in der Teilchenbahn deponierte Energie bei Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Argon-Ionen konstant abgegeben und zeigte bei Blei-Ionen einen sehr geringen

Anstieg des LET zum Ende des durchstrahlten Zellkörpers hin (LET im Bereich von 9563 bis 9603 keV/μm über eine Eindringtiefe von 5 μm).

Die Kalibrierung des Ionenstrahls erfolgte mit Kernspurfolien des Typs CR-39. Die Technik der Ionenspurdetektion basiert darauf, dass beschleunigte schwere Ionen entlang ihrer Flugbahn eindimensionale Störungszonen hinterlassen, die sich in Polymeren durch chemisches Ätzen zu mikroskopisch feinen Strukturen entwickeln lassen. Die Ätzung der Ionenspur wurde unter standardisierten Bedingungen (12 N KOH- Lösung bei 80°C über 5 Minuten für Kohlenstoff und Argon, bzw. 2 Minuten für Blei) von Dr. Isabelle Testard (GANIL, Frankreich) vorgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Visualisierung der unterschiedlichen Ionisationsdichte der Ionenstrahlung wurden Phasenkontrastaufnahmen der Detektorfolien nach Exposition mit Kohlenstoff-, Argon- und Blei-Ionen mit Aufnahmen nativer A549 Zellen überlagert (Abb. 3-9).

Das zelluläre Überleben nach Bestrahlung mit beschleunigten schweren Ionen wurde in den Zelllinien A549 und HEK untersucht. Aufgrund der Limitierung der möglichen Experimente wurden die Dosis-Effektkurven aus jeweils einem Bestrahlungsexperiment mit sechs Petrischalen berechnet.

Die Kenngrößen der Dosiseffektkurven nach Exposition mit beschleunigten Kohlenstoff-Ionen (13 C, 75 MeV/amu, LET-Wert 29,28 KeV/μm) im Fluenzbereich von $1,25 \times 10^7$ bis 1×10^8 (absorbierte Dosis 0,59 bis 4,68 Gy und einer mittleren Trefferzahl von 31,25 bis 250 pro Zellkern) in A549 und HEK Zellen weisen eine Extrapolationszahl $n < 1$ auf, wodurch mathematisch ein linearer Kurvenverlauf ohne Ausbildung einer Schulter beschrieben ist (Abb. 3-10). Infolgedessen ist der Quasischwellenwert D_q nicht definiert.

Nach Exposition mit beschleunigten Argon-Ionen (36 Ar, 95 MeV/amu, LET-Wert 232,2 keV/μm) im Fluenzbereich von 5×10^5 bis 1×10^7 Partikel /cm² (entsprechend einer Trefferrate von etwa 1,25 bis 24,7 in A549 Zellen bzw. 0,7 bis 14,2 pro Kern in HEK Zellen) zeigten die Dosis-Effektkurven beider Zelllinien einen vergleichbaren, rein exponentiellen Kurvenverlauf mit D_0 -Werte von $3,2 \times 10^6$ (A549) und $2,6 \times 10^6$ (HEK) (Abb. 3-11).

Nach Exposition mit beschleunigten Blei-Ionen (208 Pb, 29 MeV/amu, LET-Wert 13000 keV/μm) im Fluenzbereich von 5×10^5 bis 5×10^6 P/cm² (absorbierte Dosis 10,4 Gy bis 104 Gy) zeigten die Zelllinien A549 und HEK eine vergleichbare Strahlenempfindlichkeit mit D_0 -Werten von $1,16 \times 10^6$ (A549) und $1,18 \times 10^6$ P/cm² (HEK). Legt man eine durchschnittliche Kernprojektionsfläche von 247 μm² der A549 Zellen zugrunde, so erhielten die Lungenepithelzellen bei Bestrahlung im oben angegebenen Fluenzbereich etwa 1,25 bis 12,5 Treffer pro Zellkern. Die wesentlich kleineren HEK-Zellen erhielten hingegen 0,7 bis 7 Treffer pro Kern. Beide Dosiseffektkurven weisen einen rein exponentiellen Verlauf ohne Ausprägung einer Schulter auf (Abb. 3-12).

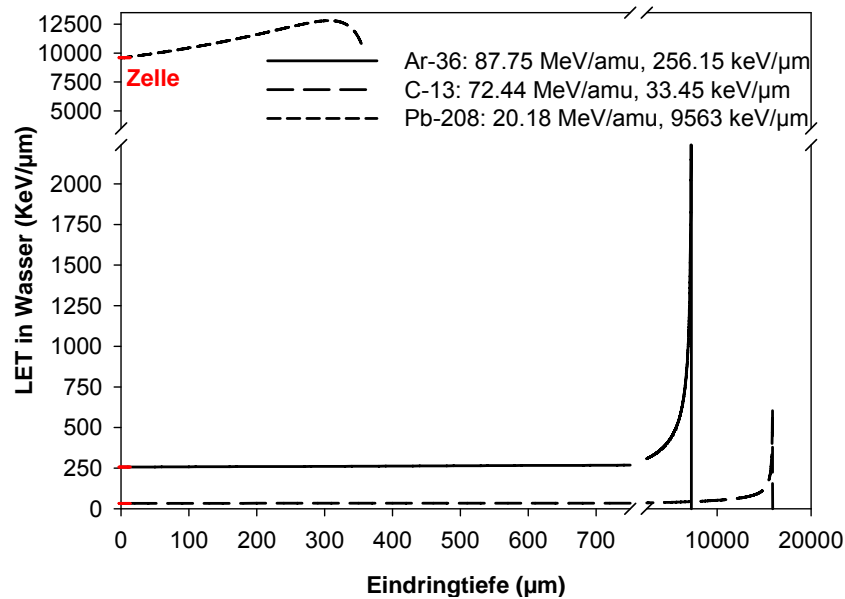


Abb. 3-8: Tiefendosisverteilung der verwendeten Ionenarten in Abhängigkeit des Linearen Energietransfers (LET) in Wasser. Dargestellt ist die Energie, die nach Passieren verschiedener Materialien des Strahlaustrittsfensters und des Gefäßbodens auf die Zellen trifft. Setzt man ein zylindrisches Zellvolumen mit einer durchschnittlichen Zelldicke von $\leq 5 \mu\text{m}$ (rot) voraus, so zeigt der Ionenstrahl beim Durchtritt durch die bestrahlte Zelle eine nahezu konstante Ionisationsdichte. Das Maximum der deponierten Energie- der *Bragg –Peak* – befindet sich hinter der Projektionsebene der Zelle.

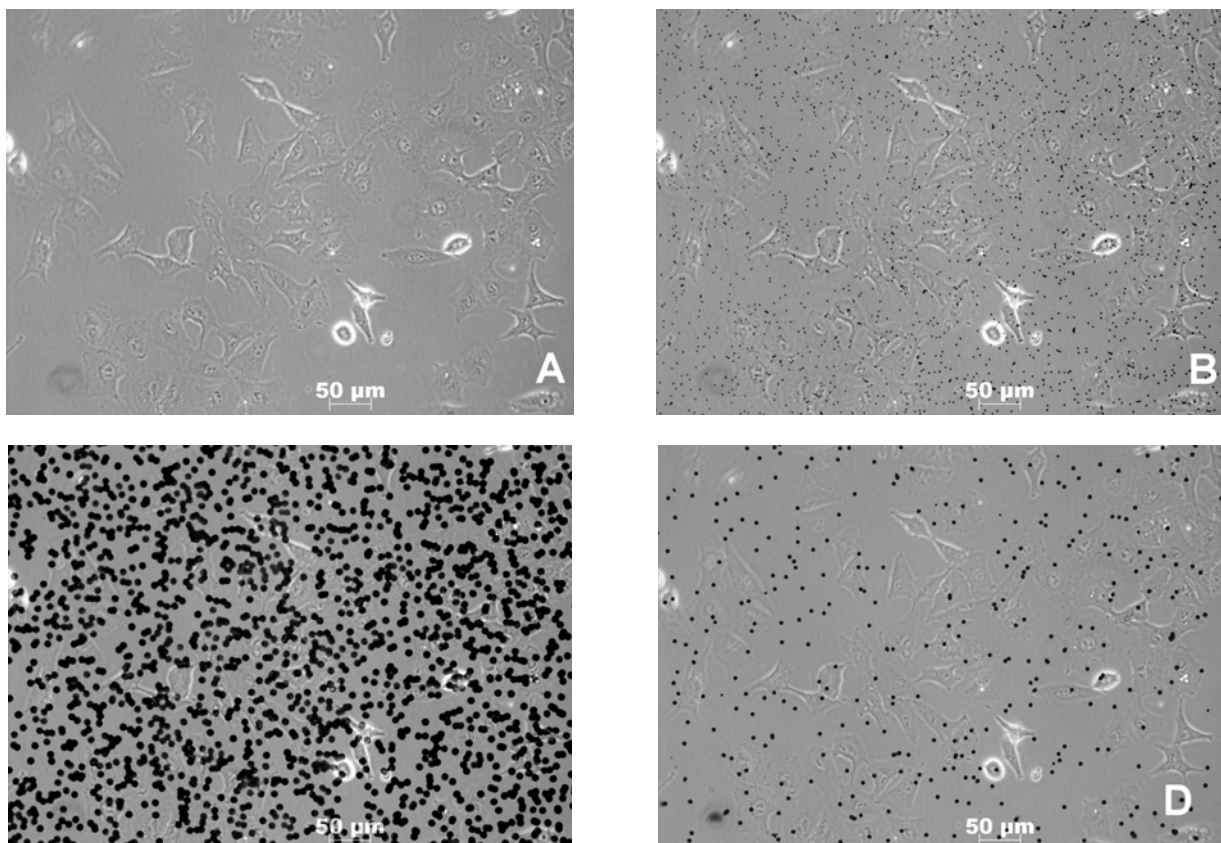


Abb. 3-9: (A) Phasenkontrast-Aufnahmen nativer A549 Zellen (B) überlagert mit Mikroskopaufnahmen von CR-39 Kernspurfolien beschleunigter Kohlenstoff-Ionen (Fluenz 1×10^6 Teilchen / cm^2) (C) Argon-Ionen (Fluenz 1×10^6 Teilchen / cm^2) und (D) Blei-Ionen (Fluenz 1×10^5 Teilchen / cm^2). Während die Ätzung für CR-39 Spurnachweis nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Argon-Ionen über 5 Minuten durchgeführt wurde, erfolgte die Ätzung nach Exposition mit Blei nur für 2 Minuten, wodurch ein etwas geringerer Spurdurchmesser bedingt ist.

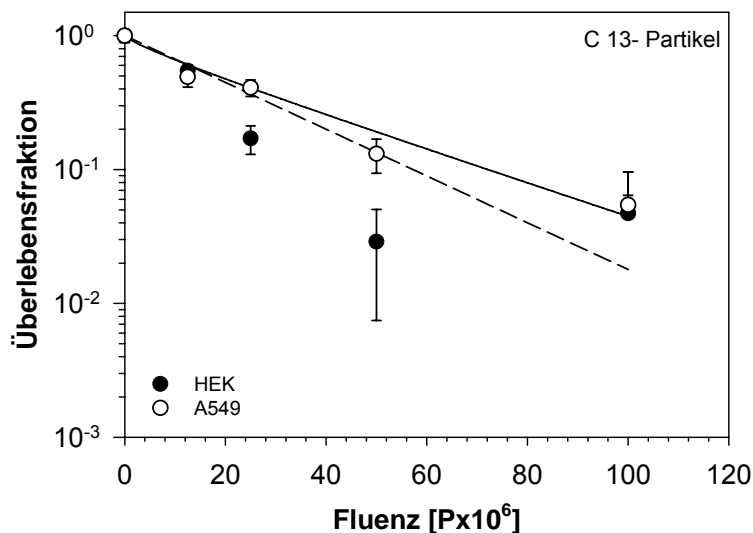


Abb. 3-10: Dosis-Effektkurven der Zelllinien A549 und HEK nach Exposition mit Kohlenstoff-Ionen (13 C, 75 MeV/amu, LET-Wert 29,28 KeV/ μ m)

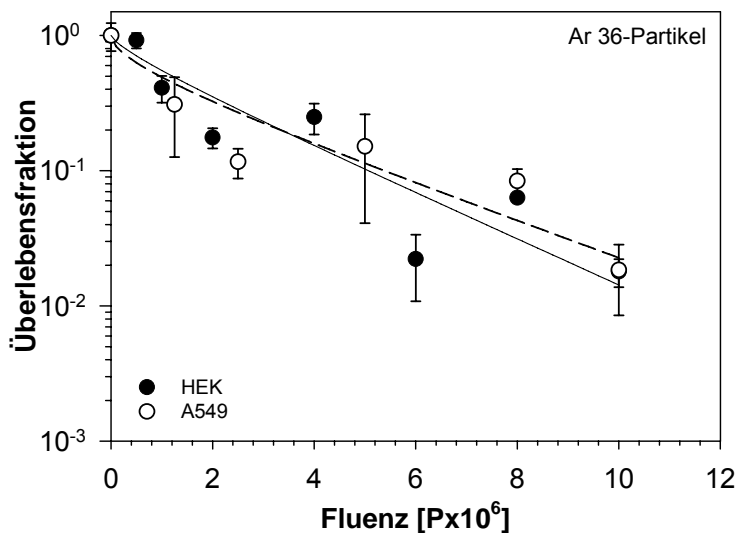


Abb. 3-11: Dosis-Effektkurven der Zelllinien A549 und HEK nach Exposition mit Argon-Ionen (36 Ar, 95 MeV/amu, LET-Wert 232.2 keV/ μ m).

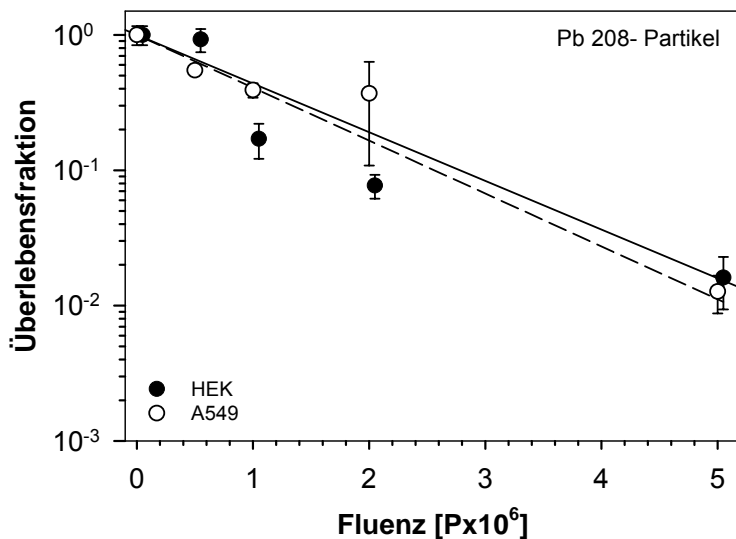


Abb. 3-12: Dosis-Effektkurven der Zelllinien A549 und HEK nach Exposition mit Blei-Ionen (208 Pb, 29 MeV/amu, LET-Wert 13000 keV/ μ m).

Die Kenngrößen der Dosis-Effektkurven der Zelllinien A549 und HEK nach Exposition mit beschleunigten Schwerionen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

| Tab. 3-4: | | Zelllinie A549 Beschleunigte Ionen | | | |
|---|--|------------------------------------|---|--------|--|
| Strahlenart | D_0 | n | Dq | r^2 | |
| C13, 75 MeV /amu 29,98 KeV/ μ m | $3,489 \times 10^7$ $\pm 0,201 \times 10^7$ | 0,779 $\pm 0,047$ | $-8,696 \times 10^6$ $\pm 1,660 \times 10^6$ | 0,9232 | |
| 36 Ar, 95 MeV /amu LET 232,4 keV/ μ m | $3,195 \times 10^6$ $\pm 0,293 \times 10^5$ | 0,513 $\pm 0,064$ | $-2,131 \times 10^6$ $\pm 0,213 \times 10^5$ | 0,7098 | |
| Pb 208, 29 MeV /amu LET 13000 keV/ μ m | $1,160 \times 10^6$ $\pm 0,831 \times 10^5$ | 1,038 $\pm 0,134$ | $4,280 \times 10^4$ $\pm 1,542 \times 10^5$ | 0,9115 | |
| | | Zelllinie HEK Beschleunigte Ionen | | | |
| Strahlenart | D_0 | n | Dq | r^2 | |
| C13, 75 MeV /amu 29,98 KeV/ μ m | $2,494 \times 10^7$ $\pm 0,316 \times 10^7$ | 0,588 $\pm 0,127$ | $-1,323 \times 10^7$ $\pm 0,380 \times 10^7$ | 0,6322 | |
| 36 Ar, 95 MeV /amu LET 232,4 keV/ μ m | $2,558 \times 10^6$ $\pm 0,222 \times 10^5$ | 0,710 $\pm 0,090$ | $-0,876 \times 10^6$ $\pm 0,257 \times 10^6$ | 0,8086 | |
| Pb 208, 29 MeV /amu LET 13000 keV/ μ m | $1,178 \times 10^6$ $\pm 0,968 \times 10^5$ | 0,738 $\pm 0,085$ | $-0,358 \times 10^6$ $\pm 0,112 \times 10^6$ | 0,8610 | |

Auch nach Bestrahlung mit beschleunigten Alpha-Partikeln zeigen die Kurven keine Schulter (Extrapolationszahl ≈ 1) (Abb. 3-13). Aufgrund der beschränkten Anzahl an Experimenten, die eine Bestrahlung an Fremdanlagen mit sich bringt, konnten die Versuche in vier Strahlzeiten pro Jahr nicht beliebig oft wiederholt werden, wodurch die ermittelten Dosis-Effektkurven mit 0,614 bzw. 0,467 schlechte Korrelationskoeffizienten aufwiesen (Tab. 3-5).

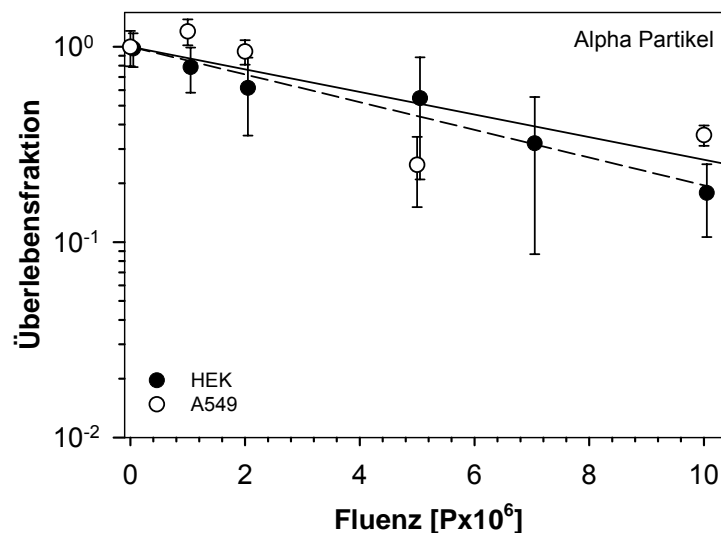


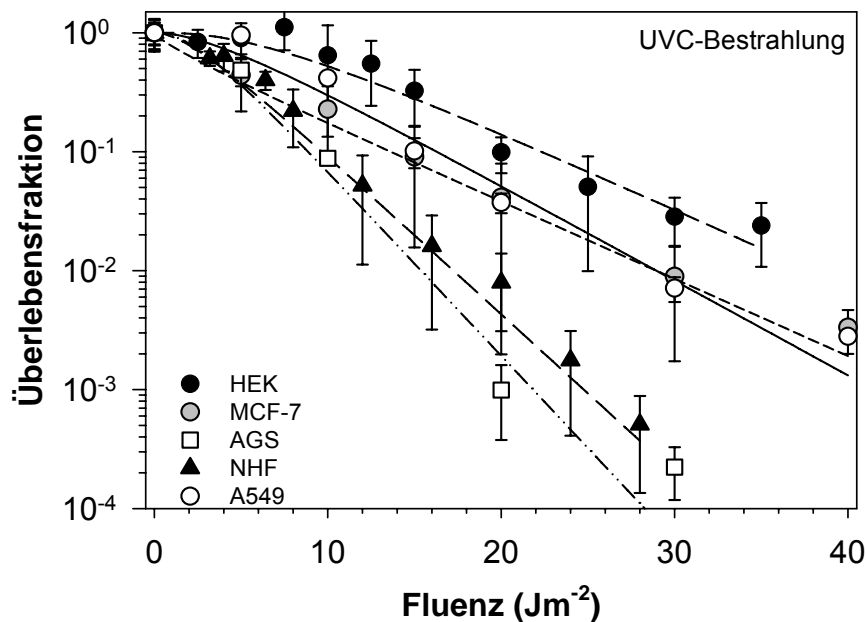
Abb. 3-13: Dosis-Effektbeziehung nach Bestrahlung mit dicht-ionisierenden Alpha-Teilchen für die Zelllinien A549 und HEK. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen.

Tab. 3-5: Dicht-ionisierende Alpha-Teilchen (2,1 MeV, LET 160 keV/ μm)

| Zelllinie | D_0 | n | Dq | r^2 |
|-----------|--|-------------------|---|--------|
| A549 | $7,061 \times 10^6$ $\pm 2,080 \times 10^6$ | $1,033 \pm 0,161$ | $2,340 \times 10^5$ $\pm 1,394 \times 10^6$ | 0,4674 |
| HEK | $5,839 \times 10^6$ $\pm 0,372 \times 10^6$ | $0,914 \pm 0,034$ | $-0,525 \times 10^5$ $\pm 0,190 \times 10^6$ | 0,6140 |

Nicht-ionisierende Strahlung: UV-C

Die Dosiseffekt-Kurven der Zelllinien HEK, A549, AGS und NHF nach Bestrahlung mit UV-C zeigten einen mehr oder weniger gekrümmten Verlauf und gehen erst im Bereich höherer Dosen in einen exponentiellen Verlauf über (Abb. 3-14). Eine Ausnahme bilden die MCF-7 Zellen: Hier wird keine Schulter ausgebildet, was auf eine verminderte Reparaturkapazität im Bereich kleiner Dosen hinweist. Hinsichtlich der Strahlensensitivität zeigen sich auch bei Exposition mit nicht-ionisierender Strahlung deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien, ersichtlich in den ermittelten D_0 -Werten von $2,8 \text{ J/m}^2$ (AGS) bis $6,67 \text{ J/m}^2$ (MCF-7) (Tab. 3-6).

**Abb. 3-14:** Dosis-Effektkurven nach Bestrahlung mit UV-C. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils drei unterschiedlichen Versuchen.**Tab. 3-6** UV-C Strahlung

| Zelllinie | D_0 | n | Dq | r^2 |
|-----------|-------------------|-------------------|--------------------|--------|
| MCF-7 | $6,697 \pm 0,264$ | $0,751 \pm 0,074$ | $-1,918 \pm 0,578$ | 0,8611 |
| HEK | $6,676 \pm 0,470$ | $2,918 \pm 0,804$ | $7,747 \pm 0,227$ | 0,9668 |
| NHF | $3,484 \pm 0,105$ | $1,779 \pm 0,238$ | $2,008 \pm 0,511$ | 0,8339 |
| A549 | $5,448 \pm 0,165$ | $2,035 \pm 0,202$ | $3,871 \pm 0,647$ | 0,9666 |
| AGS | $2,799 \pm 0,181$ | $2,448 \pm 0,833$ | $2,506 \pm 1,036$ | 0,9377 |

3.2.4. FADU

Die FADU-Methode erlaubt die Erfassung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie alkali-lablen Läsionen und beruht auf der zeitabhängigen Entwindung von DNA-Doppelsträngen durch Lösen von Wasserstoffbrücken in alkalischer Lösung (Birnboim und Jevcak, 1981).

Zur Untersuchung von primären Einzel- und Doppelstrangbrüchen und Unterbindung von Reparaturvorgängen während der Bestrahlung wurden die Zellen auf Eis bestrahlt und bis zur Durchführung der FADU-Analyse auf gekühlten Aluminiumplatten inkubiert. Nach Bestimmung des Anteils der intakten doppelsträngigen DNA wurden die Daten logarithmisch gegen die Dosis aufgetragen. Der so ermittelte Schaden wird als initialer Schaden angesehen, da er nicht durch den Einfluss von DNA-Reparaturmechanismen modifiziert ist (Abb. 3-15). In den analysierten Zelllinien wurde unmittelbar nach Bestrahlung eine hohe Anzahl von Einzel- und Doppelstrangbrüchen nachgewiesen. Der Verlauf der Kurven ist dabei exponentiell von der applizierten Dosis und vermutlich von der Größe des Targets und dem Ploidiegrad abhängig. Gemäß ihrer Kerngrößen (3.2.3.) und ihres Ploidiegrades (2.1.) können die Zellen in Gruppen unterteilt werden. So weisen die Zelllinien A549 und MCF-7 bei einem nahezu triploiden Chromosomensatz vergleichbare Kernflächen auf während die wesentlich kleineren Zellen der Linien AGS und NHF (hyper-)diploid sind.

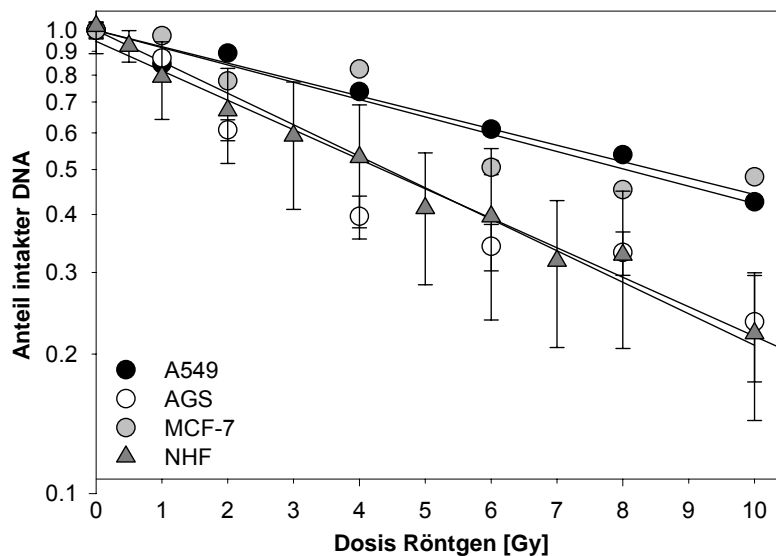


Abb. 3-15: Messung der relativen Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffs Bisbenzimid zur Ermittlung des Anteils intakter DNA nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5. Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung

Der Einfluss ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusprogression wurde in asynchron wachsenden A549 Zellen durch eine durchflusszytometrische Analyse nach Bestrahlung untersucht. Die Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen wurde über die Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalators Propidiumiodid erfasst, die direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist.

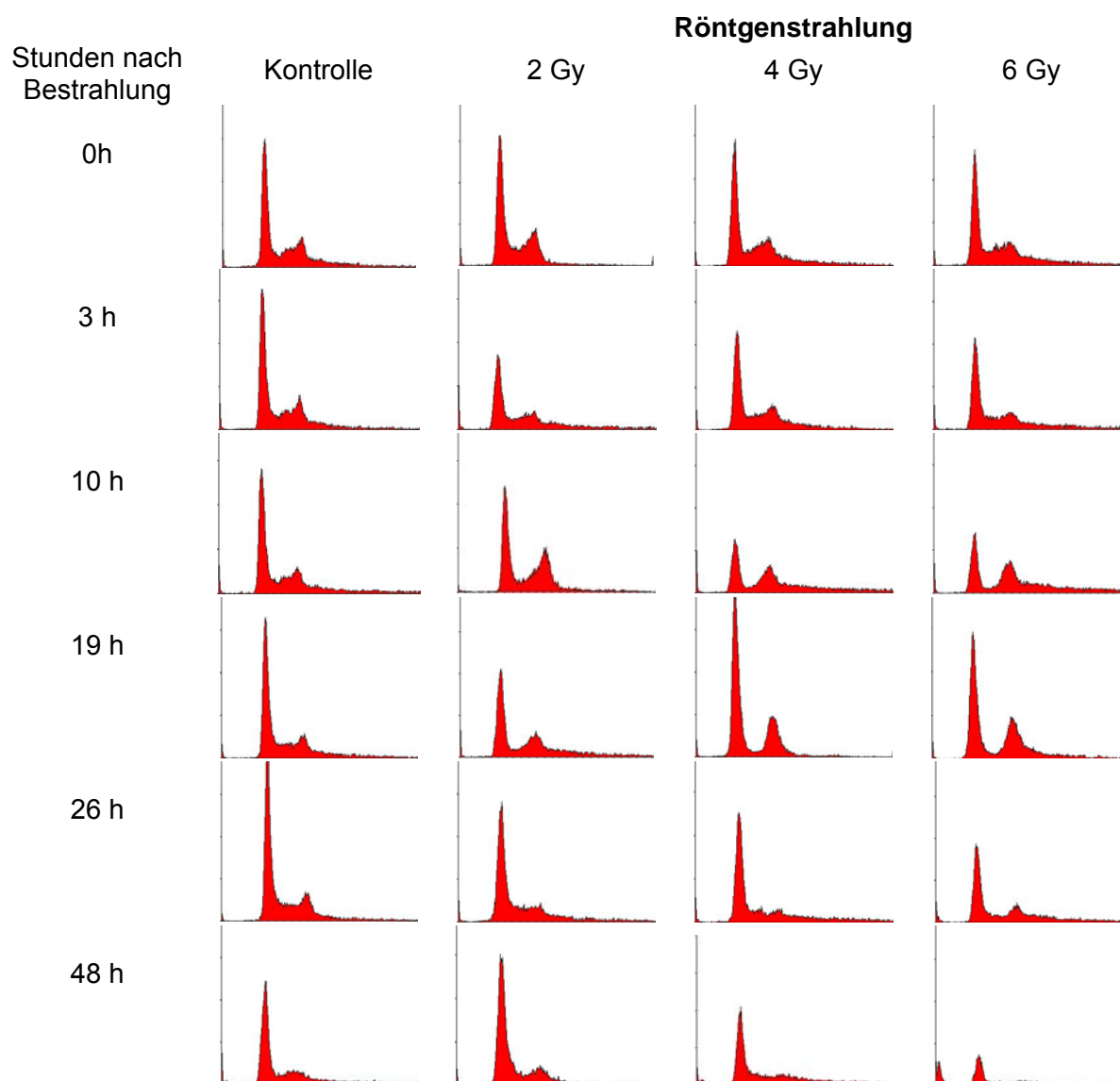


Abb. 3-16: Asynchron wachsende Lungenepithelzellen wurden mit aufsteigenden Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse erfasste jeweils 20000 Zellen.

Abbildung 3-16 zeigt die FACS-Profile bestrahlter A549-Zellen nach Exposition mit 2, 4 und 6 Gy Röntgenstrahlen. Ausgehend von einer für proliferierende Zellkulturen normalen Verteilung der unbestrahlten Zellen führte eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen im o.g. Dosisbereich zu einer signifikanten Änderung der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. Exposition mit 2 Gy Röntgenstrahlen führte zu einem temporären Anstieg der G2-Population 10 Stunden nach Bestrahlung, die nach Exposition mit höheren Dosen von 4 und 6 Gy darüber hinaus bis 19 Stunden nach Bestrahlung nachgewiesen werden konnte.

Mit steigender Bestrahlungsdosis konnte eine Abnahme der G1-Population beobachtet werden, während die Zahl der als apoptotisch definierten Sub-G1 Zellen zunahm. Apoptotische Zellen zeigen einen Verlust der PI-Fluoreszenz deutlich unter dem Fluoreszenzlevel der G1-Phase-Zellen (Nicoletti *et al.*, 1991; Darzynkiewicz *et al.*, 1992), vermutlich infolge der bereits eingetretenen DNA-Fragmentierung bei noch erhaltenem Zellvolumen (Walter *et al.*, 1993) und werden aus

diesem Grund als Sub-G1 Zellen bezeichnet. Während die Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlen nur zu temporären Veränderungen der Verteilung der Zyklusphasen führte und die Zellen zum Ende des Untersuchungszeitraums von 66 Stunden eine normale Zellzyklusprogression zeigten, induzierten hohe Dosen starke DNA-Schäden mit einer Zunahme der apoptotischen Ereignisse. 43 Stunden nach Exposition mit 6 Gy Röntgenstrahlen war die Mehrzahl der Population durch Apoptose vollständig eliminiert.

Um der Frage nachzugehen, ob sich Qualität und Kinetik der Veränderung der Zellzyklusprogression nach Exposition mit beschleunigten Schwerionen unterscheidet, wurden vergleichende Profile nach Bestrahlung mit beschleunigten Argon-Ionen in A549 Zellen erstellt (Abb. 3-17).

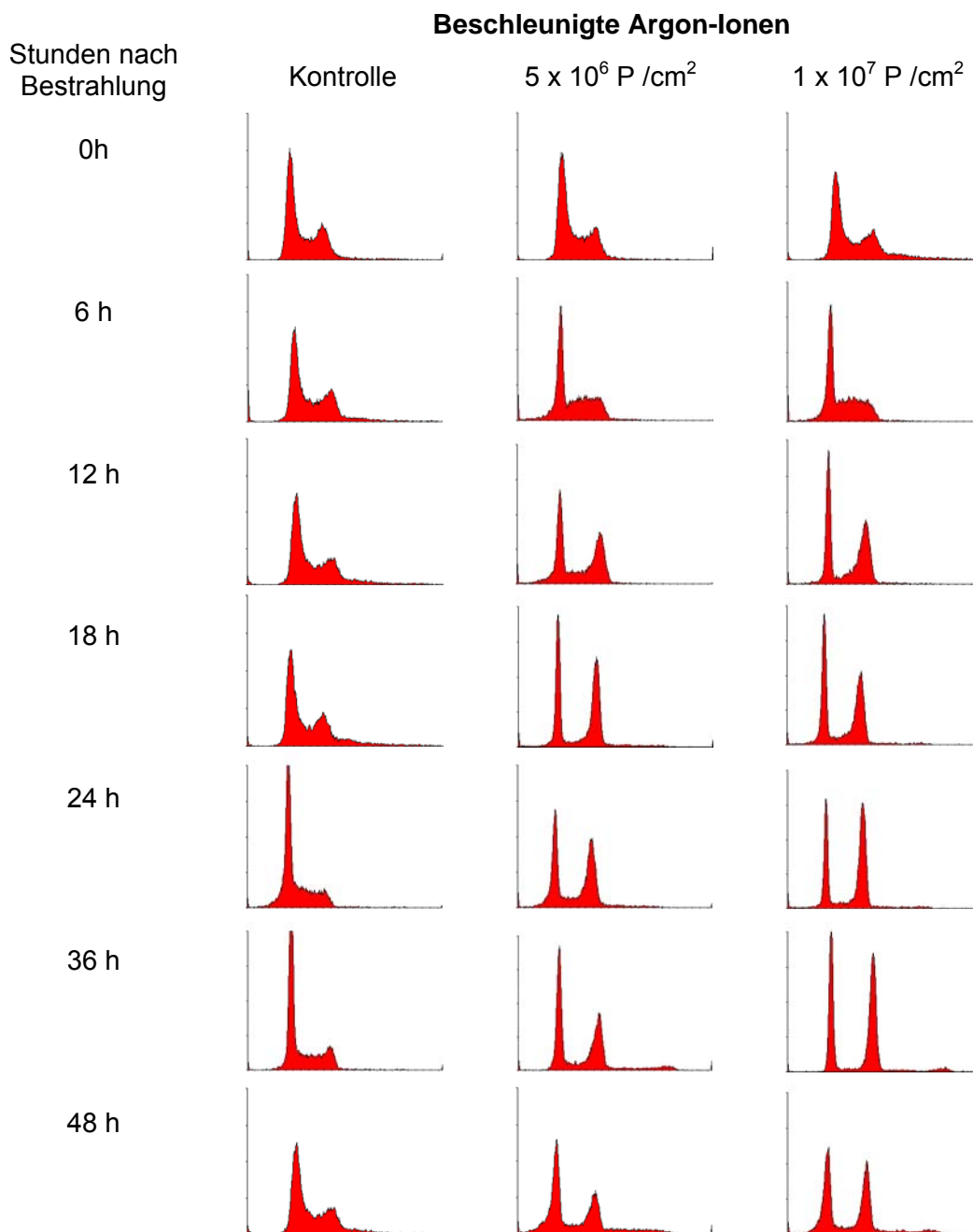


Abb. 3-17: A549 Zellen wurden mit Argon-Ionen bestrahlt, zu den angegebenen Zeiten fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils 20000 Zellen erfasst.

3.3. Analyse der strahleninduzierten Modulation der Genexpression

Strahlung stellt einen äußerst komplexen Stimulus für die Zelle dar, da sie in der Lage ist, eine Vielzahl molekularer Zielstrukturen direkt oder indirekt über Reparaturprozesse zu beeinflussen. Je nach Art des induzierten Schadens stehen der Zelle eine Vielzahl von DNA-Reparaturprozessen zur Wahrung ihrer genomischen Integrität zur Verfügung. Diese sind wiederum mit anderen Reaktionen der Zelle auf Strahlung vernetzt wie etwa der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose. Um ein geeignetes Markergen für die Entwicklung eines indikativen Bioassays zu finden, wurde nach Genen gesucht, die entscheidend in den Prozess der DNA-Reparatur involviert sind. Zunächst wurde die Expression einer Vielzahl von p53-abhängigen Genen mittels eines Macroarray untersucht und anschließend weiterführende Analysen ausgewählter Gene über die Methoden der Northern Analyse und der quantitativen Real-Time RT-PCR vorgenommen.

3.3.1. Identifizierung strahleninduzierbarer Gene mittels Macroarray-Analyse: Effekt von Bestrahlung auf die Expression p53-abhängiger Gene

Für die Macro-Array Analyse wurden Nylonmembranen verwendet, auf denen 146 kommerziell hergestellte Oligonukleotide p53-abhängiger Gene in Duplikaten direkt auf die Trägermatrix synthetisiert wurden (*TranSignal p53 Target Gene Array*, Panomics, USA). Durch Hybridisierung mit komplexen cDNA Sonden konnte die Wirkung von Bestrahlung mit beschleunigten 36-Argon Ionen unterschiedlicher Fluenz auf die Expression dieser Gene in MCF-7 Zellen untersucht werden.

Die Hybridisierungssignale der Autoradiogramme wurden zur Gewinnung semiquantitativer Daten eingescannt, im Bitmap-Format gespeichert und densitometrisch ausgewertet. Signale, die nicht mindestens fünffach über dem lokalen Hintergrund lagen oder deren Replikate sich um mehr als den Faktor 1,5 voneinander unterschieden, wurden ausgeschlossen. Die Rohdaten der unterschiedlichen biologischen Experimente wurden in Microsoft Excel Tabellen aufgenommen und mit dem Statistikprogramm SigmaPlot 8.0 (Systat Software, USA) weiter bearbeitet. Das Niveau der Signalintensitäten der einzelnen Arrays variierte infolge unterschiedlicher Expositionszeiten des Röntgenfilms, ersichtlich an der unterschiedlichen Signalstärke der Kontrollhybridisierungen im rechten und unteren Randbereich der Filter (Abb. 3-18).

Nach Festlegung von Hintergrundfluoreszenz und maximaler Signalstärke wurden die Arrays derart normiert, dass bestrahlungsunabhängige Signalunterschiede, bedingt durch unterschiedliche mRNA-Konzentrationen, ausgeschlossen werden konnten. Dies erfolgte über einen Intensitätsabgleich der Expression des mitgeführten Haushaltsgens GAPDH (*Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase*). Die Expression der Referenzgene Ubiquitin und Beta Actin wiesen Schwankungen auf und konnten daher zur Normalisierung nicht verwendet werden. Nach Normierung wurden die Signalstärken der experimentellen Filter gegen die der Kontrollfilter dividiert $[D/D_0]$. Der erhaltene Wert gibt die relative Induktion eines Gens (Werte >1) bzw. Repression (Werte <1)

nach Bestrahlung an. Tabelle 3-7 zeigt die Expressionsdaten der Gene, die in der Macroarray-Analyse nach Bestrahlung mit beschleunigten Ionen mit einem Faktor von mindestens 2,5 differentiell exprimiert waren.

Von den 146 p53-abhängigen Genen, die auf jedem Array repräsentiert waren, waren 20 Gene durch Bestrahlung mit beschleunigten Ionen eindeutig differentiell exprimiert. Davon wurden elf Gene in ihrer Expressionsintensität herauf reguliert, während neun der Gene in ihrer Expression relativ zur unbestrahlten Kontrolle nach Bestrahlung herunter reguliert wurden.

Die Hybridisierungen erfolgten mit Material aus vier biologischen Experimenten und wurden nach Entfernen (stripen) Filter-gebundener cDNA technisch jeweils einmal wiederholt. Anhand der Ergebnisse des Macroarrays erwies sich das durch Strahlung induzierbare Reparaturgen p53R2, eine durch p53-induzierbare Form der Ribonukleotid Reduktase (RRM2b) als viel versprechender Kandidat für ein Markergen. Aus diesem Grund wurde seine Induzierbarkeit nach Bestrahlung auf RNA- und Proteinebene weiter untersucht.

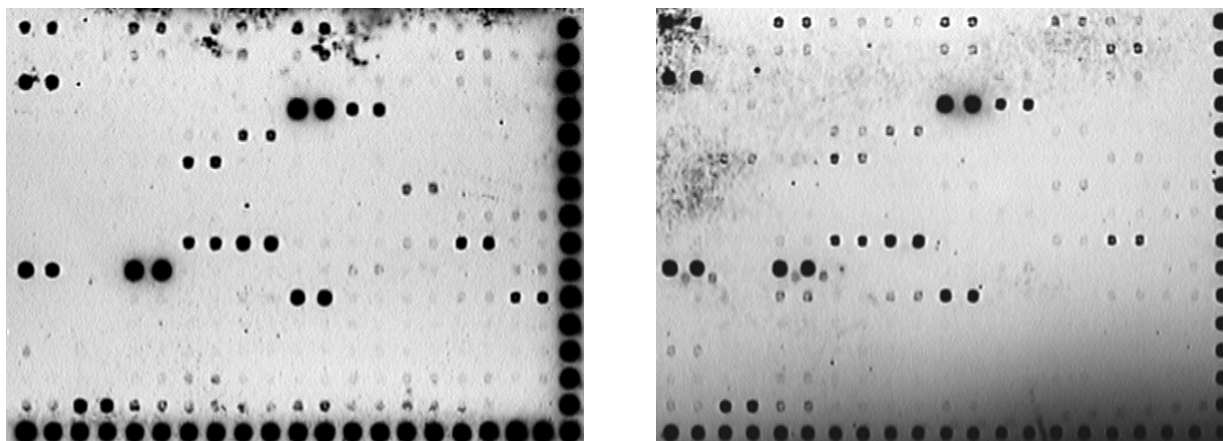


Abb. 3-18: Exemplarische Darstellung von Autoradiogrammen der Macro-Arraymembranen, hybridisiert mit cDNA Argon-bestrahlter Zellen. Links: Kontrollansatz; Rechts: 12 Stunden nach Bestrahlung (Fluenz 2×10^7 Partikel /cm²)

Tab. 3-7: Expressionsdaten der Macroarray-Analyse in MCF-7 Zellen zwei und zwölf Stunden nach Exposition mit beschleunigten Argon-Ionen unterschiedlicher Fluenz. Angegeben ist die relative Induktion bzw. Repression, berechnet als Quotient der Signalstärken der Hybridisierungsintensitäten experimenteller und Kontrollmembranen.

| | Gen | Funktion | 2h 2 x10 ⁷ P /cm ² | 12h 2 x10 ⁷ P /cm ² | 12h 4 x10 ⁷ P /cm ² |
|---------------------|--|--|---|--|--|
| Zellzykluskontrolle | p63 <i>Homo sapiens tumour protein 63 kDa with strong homology to p53 (TP63)</i> | Große Homologie zu p53 (65%), es wird postuliert, dass die Überwachung des Zellzyklus nicht nur durch p53 alleine erfolgt, sondern von einem Protein-Netzwerk, bestehend aus p53, p73 und p63 bewerkstelligt wird. | 34.08 | 0.91 | 1.10 |
| | GADD45 <i>Human growth arrest and DNA-damage-inducible protein</i> | Wird infolge DNA-Schädigung exprimiert, das Genprodukt spielt eine Rolle im G2-Kontrollpunkt des Zellzyklus. | 33.67 | 13.59 | 44.11 |
| | p21 <i>Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor</i> | Zellzykluskontrollgen, das Genprodukt p21 fungiert als Inhibitor des G1-S-Phasenübergangs, indem es an Cyclin-cdk-Komplexe bindet. | 6.12 | 3.62 | 8.82 |
| | REPRIMO <i>Homo sapiens candidate mediator of the p53-dependent G2 arrest</i> | Eine Herunterregulierung infolge Stress wurde nur in Krebszellen beschrieben, in gesunden Zellen hingegen Funktion der Zellzyklusarretierung in der G2 Phase | 0.02 | 0.75 | 0.48 |
| | LATS2 <i>Homo sapiens HsLATS2 mRNA for large tumour suppressor 2</i> | Tumor Suppressor mit entscheidender Rolle bei der Centrosom-Verdopplung, reguliert negativ den Übergang von G1/S durch Inhibierung der cyclinE/CDK2 Kinaseaktivität. | 0.61 | 0.35 | 0.05 |
| | MAD1 <i>Homo sapiens MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) (MAD1L1)</i> | Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Apoptose, gehört zum Netzwerk der bHLHZip-Transkriptionsfaktoren, Inhibitor der Fas-TRAIL-abhängigen Apoptose. | 0.06 | 0.04 | 0.10 |
| Wachstum | IGF-2 <i>Human insulin-like growth factor II</i> | Peptidhormon mit struktureller Verwandtschaft zu Insulin; stimuliert Glucoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen, gilt als pluripotenter Wachstumsfaktor mit anaboler Wirkung. | 30.60 | 43.49 | 212.85 |
| | BAI1 <i>Homo sapiens BAI 1, brain-specific angiogenesis inhibitor 1</i> | Inhibitor der Neoangiogenese | 11.09 | 51.19 | 61.76 |

| | Gen | Funktion | 2h 2 x10 ⁷ P /cm ² | 12h 2 x10 ⁷ P /cm ² | 12h 4 x10 ⁷ P /cm ² |
|--------------------|--|---|---|--|--|
| Apoptose | BAX <i>Human bax gene</i> | Bcl-2-assoziiertes X-Protein: Intrazellulärer Gegenspieler zu Bcl-2, bewirkt Apoptoseinduktion. | 3.47 | 11.18 | 15.32 |
| | KILLER/DR5 <i>Homo sapiens tumour necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i> | Transmembranrezeptor der TNF-Rezeptor Superfamilie mit intrazellulärer Todesdomäne. Nach Ligandenbindung von TRAIL, einem Typ2-Transmembranprotein, kann Apoptose induziert werden. | 1.36 | nd | 3.31 |
| | Fas-Antigen <i>Human Fas antigen (Apo-1)</i> | Zelloberflächenmolekül, Mitglied der TNF-Superfamilie, Mediator des Apoptosesignals. | 6.16 | 1.91 | 3.31 |
| | PUMA/BBC3 <i>Homo sapiens Bcl-2 binding component 3</i> | Proapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie, wird in der Zelle als Stressantwort produziert. | 0.06 | 0.60 | 0.21 |
| | LRDD/PIDD <i>Homo sapiens leucine-rich and death domain containing</i> | Regulator des zellulären Wachstums und der Proapoptose | 0.72 | 0.10 | 0.23 |
| | WIG1 <i>Homo sapiens p53 target zinc finger protein</i> | Nukleäres Zinkfingerprotein, hat eine unterstützende Funktion bei den apoptotischen Aktivitäten von p53. | 0.21 | 0.14 | 0.34 |
| Signaltransduktion | p85 <i>Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit beta</i> | Regulatorische Untereinheit der Phosphoinositide-3-kinase (PIK3R2) | 0.22 | 0.88 | 0.28 |
| | RGS14 <i>Homo sapiens regulator of G-protein signalling 14</i> | Regulator des G-Protein Signaltransduktionsweges | 0.45 | 0.30 | 0.75 |
| | Stat3 <i>Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 3</i> | Mitglied des JAK-STAT-Signalweges, der die Information extrazellulärer Signalpeptide von der Zellmembran zu intrazellulären Zielgenpromotoren weiterleitet | 1.36 | 9.51 | 12.13 |

| | Gen | Funktion | 2h 2 x10 ⁷ P/cm ² | 12h 2 x10 ⁷ P/cm ² | 12h 4 x10 ⁷ P/cm ² |
|----------------------|--|--|--|---|---|
| DNA-Reparatur | MSH2 <i>Homo sapiens mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)</i> | Mismatch Reparatur Gen; ein Anstieg wird nur in Abhängigkeit von UV-C beschrieben | 0.08 | nd | 0.11 |
| | p53R2 <i>Homo sapiens gene for ribonucleotide reductase (RRM2b)</i> | Kodiert für eine modifizierte Untereinheit der eukaryonten Ribonukleotid Reduktase, die für die schnelle Bereitstellung von dNTPs für die DNA-Reparatur im Zellkern sorgt. | 0.68 | 1.91 | 3.31 |
| | PCNA <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> | Beteiligt an der Basenexcissionsreparatur (BER) und Mismatch-Reparatur (MMR) | 0.68 | 2.72 | 2.21 |

3.3.2. Analyse der p53R2-Expression mittels Northern Blot Analyse

Das im Jahr 2000 von Tanaka *et al.* erstmals beschriebene Gen kodiert für die kleine Untereinheit der p53-induzierbaren Form der Ribonukleotid Reduktase (p53R2, RRM2b), die für die schnelle Bereitstellung von DNA-Bausteinen während der DNA Schadensreparatur verantwortlich ist. Mit Hilfe der Northern Analyse können RNA-Moleküle aus der Gesamt-RNA einer Zellpopulation spezifisch nachgewiesen werden. Zur Verifizierung der Macroarray-Analysen wurden die RNA-Präparationen der mit beschleunigten Argon-Ionen (95 MeV/amu, LET-Wert 232.2 keV/μm) bestrahlten MCF-7 Proben verwendet. Die Northern Analyse (Abb. 3-19) zeigt für die Zeitpunkte von zwei und zwölf Stunden nach Bestrahlung eine dosisabhängige Zunahme der p53R2-Transkriptmenge bei vorhandener Grundaktivität. In der Untersuchung wurde eine zweite, kleinere Bande detektiert, die entweder auf eine alternative Spleißvariante des Transkripts oder auf eine Markierung anderer RNAs mit homologen Sequenzen hinweist. Die Sequenz für die Sondenherstellung wurde nach eingehender Blast-Analyse aus dem für die p53R2 (RRM2b) spezifischen Teil der mRNA Sequenz gewählt, die keinerlei Homologie zur kleinen Untereinheit der Ribonukleotid Reduktase (RRM2) aufweist, womit eine Kreuzhybridisierung von Genen mit ähnlicher Sequenz ausgeschlossen werden kann.

In der Analyse nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlen in MCF-7 Zellen (Abb. 3-20) konnte keine zweite Bande detektiert werden, was durch die geringere Signalstärke der Hybridisierung begründet sein kann. Ein Maximum der Signalintensität und damit der Transkriptmenge konnte nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlen für den Untersuchungszeitraum von 90 bis 180 Minuten identifiziert werden.

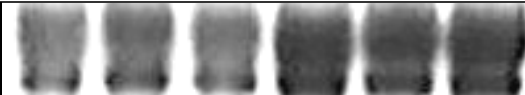

| | | | | | | | | |
|---|--|------|------|------|------|------|-------|--|
| 2 Stunden nach Bestrahlung mit Argon-Ionen |  | | | | | | | |
| 12 Stunden nach Bestrahlung mit Argon-Ionen |  | | | | | | | |
| Fluenz [$\times 10^6$ P/cm ²] | 0 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 20 | 40 | |
| Treffer pro Kern | 0 | 3,5 | 7 | 14 | 28 | 56 | 112 | |
| Absorbierte Dosis [Gy] | 0 | 0,46 | 0,93 | 1,86 | 3,71 | 7,42 | 14,85 | |

Abb. 3-19: Northern Blot-Analyse zur Detektion strahleninduzierter p53R2-Expression nach Exposition mit Argon-Ionen in MCF-7 Zellen. Von jeder biologischen Probe wurden 7 μg Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Der Nachweis des p53R2 Transkripts erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde und nachfolgender Exposition auf Röntgenfilm. Die Überprüfung der Lademenge erfolgte durch Anfärben der filtergebundenen RNA mit Methylenblau und Vergleich der Signalintensität der 18S und 28S rRNA.

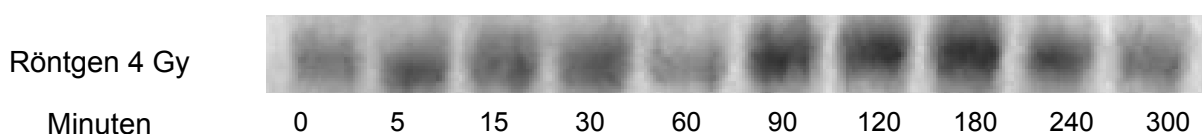


Abb. 3-20: Zeitkinetik strahleninduzierter p53R2 Genexpressionsänderung in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlen. In der Northern-Analyse wurden jeweils 8 μg RNA pro Spur aufgetragen.

Nach Induktion mit ionisierender Strahlung konnte - bei vergleichbarer Grundaktivität des p53R2 Gens - auch in den Zelllinien A549 und AGS eine vermehrte Transkriptmenge nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.3. Analyse der p53R2-Expression auf Proteinebene

In der Western Blot Analyse sollten die auf RNA-Ebene identifizierten Veränderungen der Genexpression von p53R2 nach Bestrahlung auf Protein-Ebene analysiert werden. Nach Auftrennung der Proteinfractionen bestrahlter und unbestrahlter A549 Zellen mittels SDS-PAGE und Hybridisierung mit einer Nitrocellulosemembran erfolgte eine Inkubation mit einem gegen p53R2 gerichteten Antikörper. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte über eine Chemilumineszenz-Detektion und Röntgenfilmexposition.

Die Bestrahlung mit 6 Gy Röntgenstrahlen führte in A549 Zellen zu einer Hochregulierung der p53R2 Protein-Expression innerhalb der untersuchten Zeitkinetik von 48 Stunden (Abb. 3-21). Bestrahlte MCF-7 Zellen wiesen vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der induzierten p53R2-Proteinexpression auf (Daten nicht gezeigt).

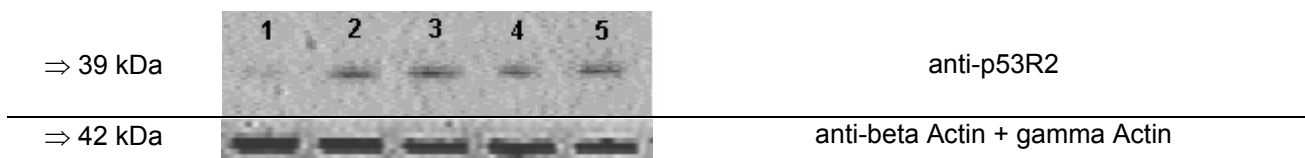


Abb. 3-21: Zeitkinetik der Proteinexpression von p53R2 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy Röntgenstrahlen. Der Western Blot wurde mit spezifischen Antikörpern gegen p53R2 (ab8105) bzw. Beta-Actin + Gamma-Actin (ab1801, Abcam) als Ladekontrolle durchgeführt. Spur Kontrolle; 2: 8 Stunden; 3: 24 Stunden; 4: 32 Stunden; 5: 48 Stunden nach Bestrahlung

3.3.4. Analyse der Genexpression mittels Quantitativer Real-time RT-PCR

Die Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) ist aufgrund der hohen Sensitivität und des großen dynamischen Bereichs anderen Methoden weit überlegen. Aus diesem Grund wurden die durch Macroarray- und Northern-Analyse erzielten Ergebnisse verifiziert und weitere Untersuchungen ausgewählter Gene, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle und Reparatur haben, durchgeführt. Für die Entwicklung eines indikativen Bioassays sollte nicht nur ein geeignetes Markergen (Rezeptor) gefunden werden, sondern auch die Frage nach einer geeigneten Zelllinie (Wirt) geklärt werden. Daher wurde die Modulation der Genexpression nach Bestrahlung in verschiedenen immortalen Zelllinien und in der aus Primärzellen etablierten diploiden Fibroblasten-Zelllinie untersucht. Da der zu entwickelnde Reporter-Vektorassay nicht nur auf die Detektion eines bestimmten DNA-Schadens bzw. eines bestimmten Reparaturwegs beschränkt werden sollte, erfolgten die Expressionsanalysen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten.

Anhand der Array-Analyse nach Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung konnten bereits Gene identifiziert werden, deren Expression infolge der Bestrahlung herauf reguliert wurden. Von

besonderem Interesse für eine weiterführende Genexpressionsanalyse waren, neben dem mit Northern Analyse bereits untersuchten Reparaturgen p53R2, die den Zellzyklus kontrollierenden Gene GADD45 α (GADD45) und p21 (CDKN1A). Mittels quantitativer RT-PCR konnte für diese Gene eine Steigerung der Transkriptmenge nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten nachgewiesen werden und somit deren Induzierbarkeit bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Gene infolge einer Bestrahlung mit einem mehr als zweifachen Anstieg der Transkriptmenge zeit- und dosisabhängig reagieren.

Da bereits ein auf Basis des NF- κ B-Pfads funktionierendes Reporter-Vektor-System zur Detektion zellulärer Strahleneffekte erfolgreich verwendet wird und auch im Weltraumexperiment CERASP zur Anwendung kommt (Baumstark-Khan *et al.*, 2004; Baumstark-Khan *et al.*, 2005a; Baumstark-Khan *et al.*, 2005b; Hellweg *et al.*, 2005; Hellweg *et al.*, 2006, Hellweg *et al.*, 2007), wurde die Untersuchung auch auf Expression NF- κ B abhängiger Gene ausgeweitet. Aus diesem Grund wurden GADD45 β (MYD118) als physiologisches Zielgen des NF- κ B-Pathways und I κ B α , der Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B, in die Analyse mit einbezogen. Die untersuchten Zelllinien zeigten keine signifikante Änderung der relativen Expressionswerte nach Bestrahlung, d.h. die ermittelten Werte lagen innerhalb eines Bereichs, der das Zweifache des Vergleichswertes bei unbestrahlten Zellen nicht überschritt. Mit Ausnahme der AGS-Zellen, die nach Bestrahlung mit UV-C eine deutliche Hochregulierung der GADD45 β Expression zeigten, konnte keine signifikante Induktion der mRNA nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Regulation des *breast cancer susceptibility* Gens BRCA2 nach Strahlung untersucht. Aufgrund der Kolokalisation des BRCA2 Proteins mit Proteinen, die in den Reparaturweg der homologen Rekombination (HR) involviert sind, wird eine Rolle des BRCA2 Gens in der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen vermutet, die aufgrund der erzielten qRT-PCR Ergebnissen aber vermutlich nicht auf Transkriptionsebene reguliert wird.

Ergebnisse für die Analysen der Gene GADD45 β , I κ B α und BRCA2 nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten sind dem Anhang zu entnehmen.

Die grafische Darstellung der Änderung der Genexpression wurde als Logarithmus zur Basis 2 dargestellt.

3.3.4.1. Genexpressionsänderung nach Bestrahlung mit nicht-ionisierender Strahlung

Als wesentliche, durch nicht-ionisierende UV-Strahlung induzierte photochemische Veränderungen der DNA gelten Veränderungen der Basen sowie intra- und intermolekulare Verknüpfungen. Diese Schäden können zu Störungen der DNA-Replikation führen, da sie die DNA-Polymerase in ihrer Funktion blockieren. Bei Bestrahlung im Wellenlängenbereich von UV-C mit 100 -280 nm und UV-B mit 280 – 315 nm dominieren (5-6)Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) und nicht-zyklische Pyrimidin(6-4)-Photoprodukte während im UV-A-Bereich oxidative Schäden überwiegen. Vorherrschende Schäden nach Exposition mit UV-C und UV-B-Strahlung sind DNA-

Strangvernetzungen und Vernetzungen mit den die DNA umgebenden Proteinen. Wie auch bei Bestrahlung mit ionisierender Strahlung treten Einzelstrangbrüche auf, die, nur wenn sie in größerer Zahl vorliegen und auf den gegenüberliegenden Strängen nah lokalisiert sind, zur Bildung von Doppelstrangbrüchen führen können.

UV-C Bestrahlungen wurden immer in Zellpopulationen durchgeführt, die eine Konfluenz von 60-70% erreicht hatten. Während der Bestrahlung wurde das Wachstumsmedium in Experiment- und Kontrollansätzen durch PBS ersetzt. Die gewählten Dosen korrespondieren mit den in Tabelle 3-8 aufgeführten Überlebenswerten, berechnet aus den Dosiseffektkurven der jeweiligen Zelllinien.

Tab. 3-8: Höhe des klonogenen Überlebens nach Exposition mit UV-C

| Zelllinie | Strahlenart | Dosis | Klonogenes Überleben [%] |
|--------------|-------------|----------------------|--------------------------|
| A549 | UV-C | 10 J/m ² | 29,79 |
| | | 20 J/m ² | 5,11 |
| MCF-7 | UV-C | 10 J/m ² | 17,39 |
| | | 20 J/m ² | 3,81 |
| Fibroblasten | UV-C | 7,5 J/m ² | 18,21 |
| | | 15 J/m ² | 2,04 |
| AGS | UV-C | 15 J/m ² | 1,15 |

3.3.4.1.1. Expression von GADD45alpha nach Bestrahlung mit UV-C

Die Änderung des Expressionsprofils des *Growth Arrest and Damage-inducible* Gens GADD45 α wurde in A549-Zellen nach Bestrahlung mit 10 und 20 J/m² UV-C über einen Untersuchungszeitraum von 48 Stunden untersucht. 24 Stunden nach Bestrahlung mit 20 J/m² wurde ein Anstieg der GADD45 α mRNA Expression um einen Faktor von 5,6 (entsprechend einem logarithmischen Wert zur Basis 2 von 2,49) gefunden (Abb. 3-22). Nach mathematischer Kurvenanpassung lässt sich das Maximum der Induktion 9 Stunden nach Bestrahlung mit 10 J/m² (Faktor von 2,45) bzw. 20,5 Stunden nach Bestrahlung mit 20 J/m² (Faktor 5,87) berechnen.

Die strahleninduzierte Modulation der GADD45 α Genexpression in MCF-7 Zellen zeigte bis 24 Stunden nach Bestrahlung ein ähnliches Genexpressionsprofil (Abb. 3-23). Die aus dem Kurvenverlauf errechneten Maxima der Induktion wurden 11,25 Stunden nach Bestrahlung mit 10 J/m² (Hochregulierung um den Faktor 4,33; log₂ = 2,11) bzw. 19,6 Stunden nach Bestrahlung mit 20 J/m² (Hochregulierung um den Faktor 7,73; log₂ = 2,95) relativ zur unbestrahlten Kontrolle erreicht. Die UV-C vermittelte Initiation der GADD45 α mRNA Transkription nach Bestrahlung mit 15 J/m² zeigte 6 Stunden nach Bestrahlung in AGS-Zellen innerhalb des untersuchten Zeitraums von 9 Stunden ein Maximum (Abb. 3-24). Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle konnte eine

Steigerung der Transkriptmenge um den Faktor 4 ($\log_2 = 2$) nachgewiesen werden. Aus dem Kurvenverlauf lässt sich das Maximum 6,9 Stunden nach Bestrahlung mit einem Induktionsfaktor von 4,83 ($\log_2 = 2,27$) relativ zur unbestrahlten Kontrolle errechnen. In der Analyse diploider Fibroblasten ließ sich eine UV-C vermittelte Induktion der GADD45 α Expression im Untersuchungszeitraum bis 46 Stunden nicht nachweisen (Abb. 3-25). Bis zu vier Stunden nach Bestrahlung tendierten die Expressionswerte zur Aufregulierung, die im weiteren Verlauf der Kinetik wieder abnahm und sich 46 Stunden den Basalwerten der unbestrahlten Kontrolle näherten. Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die immortalisierte Zelllinien vergleichbare Genexpressionsprofile für die UV-C induzierte GADD45 α Transkription aufweisen. In diploiden Fibroblasten konnte eine Steigerung der Transkriptmenge um mehr als den Faktor 2 ($\log_2 = 1$) nicht nachgewiesen werden.

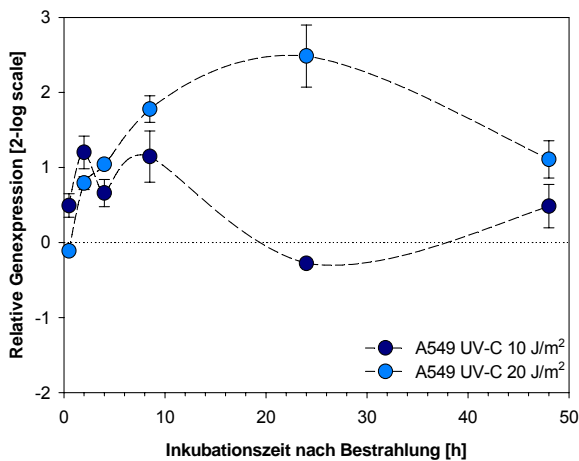


Abb. 3-22: GADD45 α in A549 Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. E= 2,01. Normalisierung gegen B2M (E=1,98), HPRT (E=1,72) und PBGD (E=1,62)

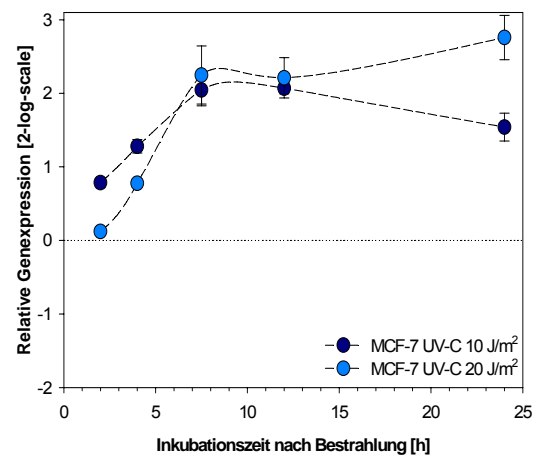


Abb. 3-23: GADD45 α in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. E=1,64; Normalisierung gegen GAPDH E=1,67

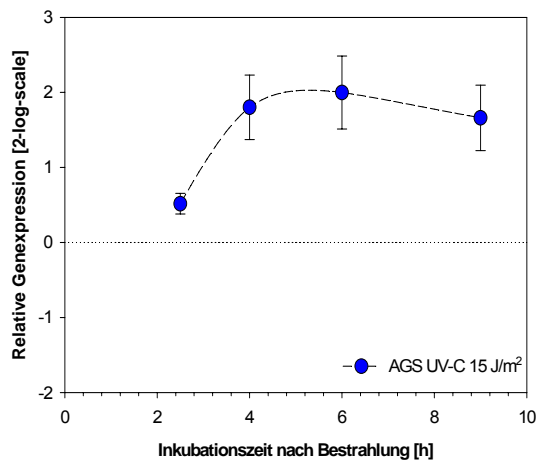


Abb. 3-24: GADD45 α in AGS Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. E=1,87; Normalisierung gegen UBC (E=1,89) und B2M (E=1,90)

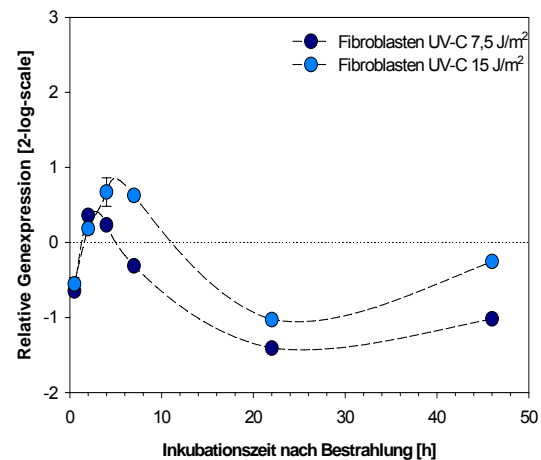


Abb. 3-25: GADD45 α in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UV-C. E=1,99; Normalisierung gegen B2M (E=1,94), SDHA (E=1,88), GAPDH (E=1,66)

3.3.4.1.2. Expression von p21 (CDKN1A) nach Bestrahlung mit UV-C

Die Expression des p53-abhängigen Zellzyklusinhibitors p21 war nach Bestrahlung mit UV-C in der Zelllinie A549 stark erhöht und zeigte ein Maximum 8,5 Stunden nach Bestrahlung mit 10 J/m² (6 fache Induktion; log₂ =2,59) bzw. 24 Stunden nach Bestrahlung mit 20 J/m² (7,1 fache Induktion; log₂ =2,82) (Abb. 3-26). Während die Expressionswerte 48 Stunden nach Bestrahlung mit 10 J/m² wieder auf Kontrollniveau zurückkehrten, war die mRNA Transkriptmenge in den mit 20 J/m² bestrahlten Zellen anhaltend erhöht (3,16 fache Induktion; log₂ =1,66). Nach mathematischer Kurvenanpassung lassen sich Maxima 11,9 Stunden nach Bestrahlung mit 10 J/m² UV-C (Induktionsfaktor 5,83; log₂ =2,54) bzw. 33,75 Stunden nach Bestrahlung mit 20 J/m² UV-C (Induktionsfaktor 9,25; log₂ =3,21) errechnen. Die Expressionsanalyse UV-C bestrahlter MCF-7 Zellen zeigte einen ähnlichen Verlauf (Abb. 3-27). Der Steigerungsfaktor der p21 Genexpression lag 12 Stunden nach Exposition mit 10 J/m² bei einen Höchstwert von 5,39 (log₂ =2,43) bzw. 24 Stunden nach Exposition mit 20 J/m² bei 6,75 (log₂ =2,76). Bestrahlung mit UV-C bewirkte in den Zelllinien AGS (Abb. 3-28) und NHF (Abb. 3-29) eine vergleichsweise moderate Erhöhung der p21-Transkriptmenge mit maximalen Induktionsfaktoren von 1,56 (7 h nach Bestrahlung mit 7,5 J/m²) und 1,95 (22 h nach Bestrahlung mit 15 J/m²) für Fibroblasten bzw. 2,24 (4 h nach Bestrahlung mit 15 J/m²) für AGS Zellen. Diese Erhöhung der p21-Transkriptmenge war in beiden Zelllinien nicht signifikant nachzuweisen.

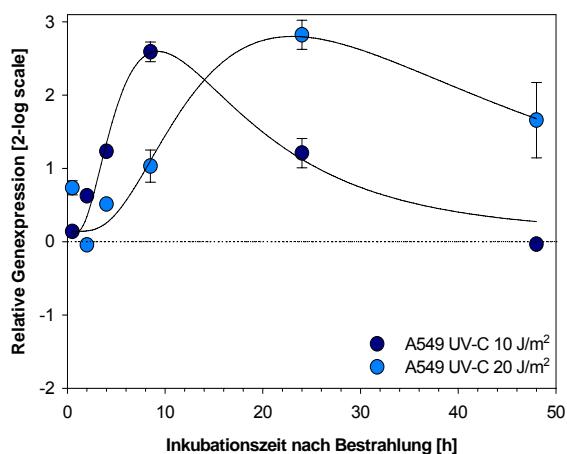


Abb. 3-26: p21 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. E= 1,99; Normalisierung gegen B2M (E=1,98), HPRT (E=1,72) und PBGD (E=1,62)

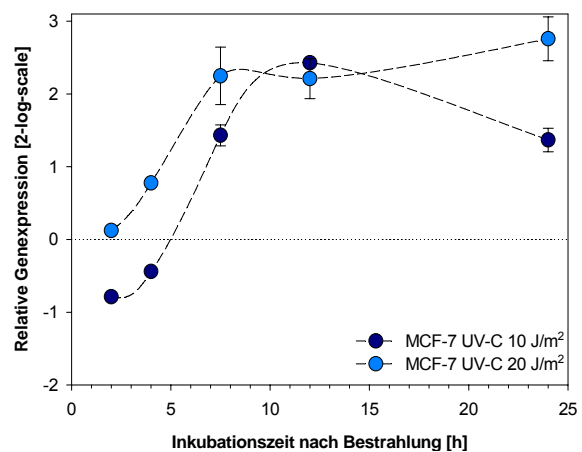


Abb. 3-27: p21 in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. E=1,91; Normalisierung gegen GAPDH E=1,67

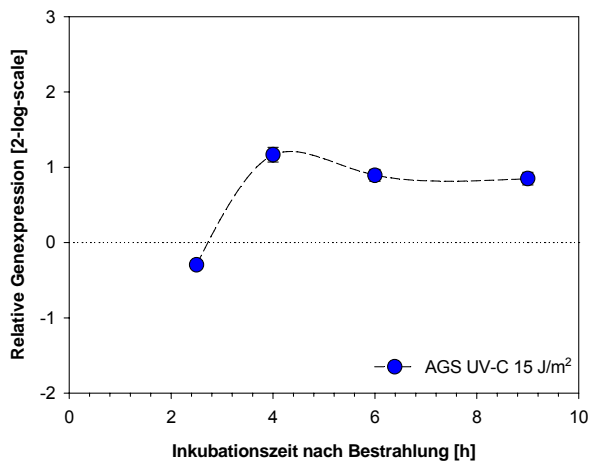


Abb. 3-28: p21 in AGS Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. $E=1,65$. Normalisierung gegen UBC ($E=1,89$) und B2M ($E=1,90$)

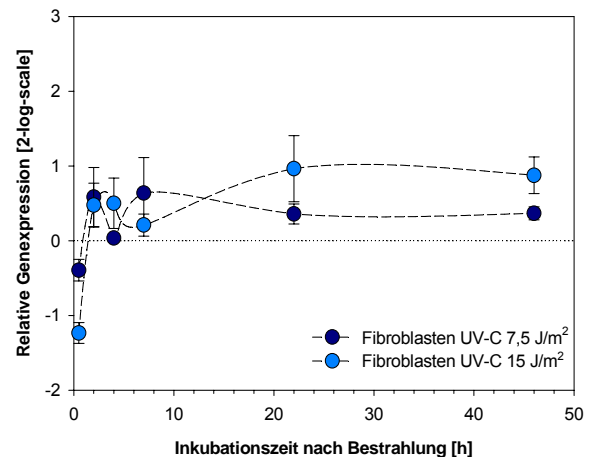


Abb. 3-29: p21 in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UV-C. $E=1,82$. Normalisierung gegen B2M ($E=1,94$) SDHA ($E=1,88$) und GAPDH ($E=1,66$)

3.3.4.1.3. Expression von p53R2 (RRM2b) nach Bestrahlung mit UV-C

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine dosisabhängige mRNA Induktion der p53-abhängigen Form der Ribonukleotid-Reduktase beobachtet werden. In der Analyse der p53R2-Genexpression der Zelllinien A549 (Abb. 3-30) und NHF (Abb. 3-33) im Untersuchungszeitraum bis 48 Stunden wurde das Maximum der Induktion dosisabhängig jeweils 24 Stunden nach Bestrahlung um das 3,78-fache (A549, 20 J/m^2) und 2,46-fache (NHF, 15 J/m^2) relativ zur unbestrahlten Kontrolle gefunden. Mit Ausnahme der AGS-Zellen (Abb. 3-32) zeigten alle Zelllinien für die Analysezeitpunkte bis 10 Stunden nach Bestrahlung eine dosisabhängige Abregulierung der Genexpression. In MCF-7 Zellen wurde eine Herabregulierung der p53R2-Expression (Abb. 3-31) gefunden, die nach Exposition mit hohen UV-C Dosen erst zum Ende des Analysezeitraums von 24 Stunden eine Tendenz zur Aufregulierung zeigte.

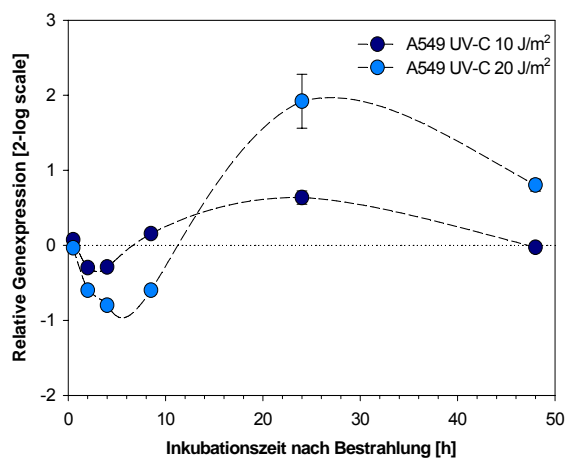


Abb. 3-30: p53R2 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. $E=1,79$; Normalisierung gegen B2M ($E=1,98$), HPRT ($E=1,72$) und PBGD ($E=1,62$)

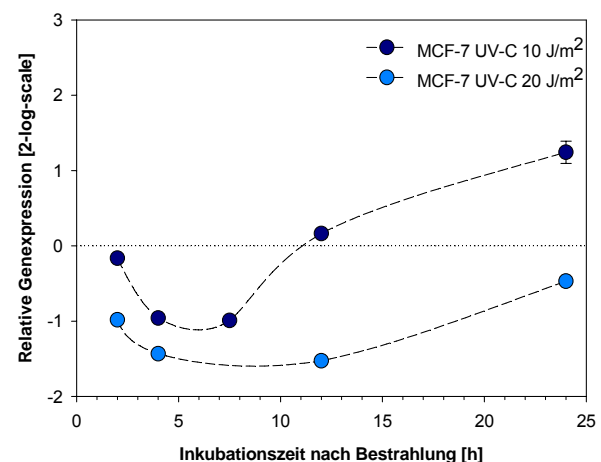


Abb. 3-31: p53R2 in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. $E=1,95$. Normalisierung gegen GAPDH ($E=1,67$)

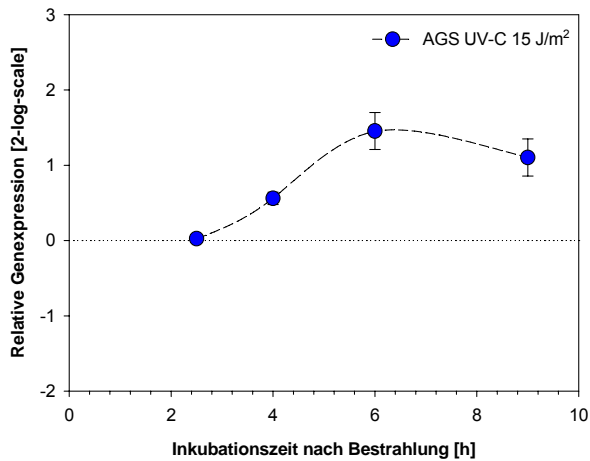


Abb. 3-32: p53R2 in AGS Zellen nach Bestrahlung mit UV-C. $E=1,88$; Normalisierung gegen UBC ($E=1,96$)

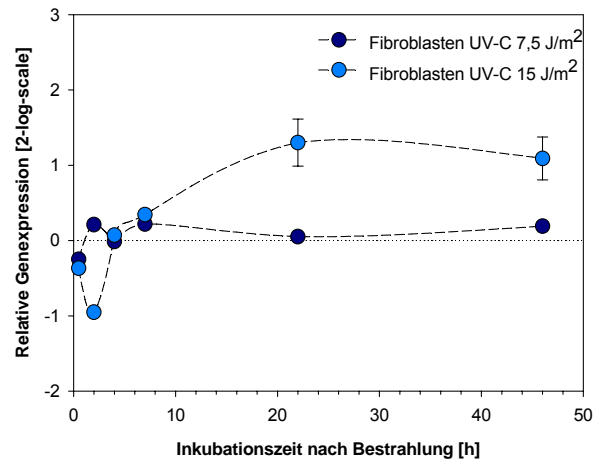


Abb. 3-33: p53R2 in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UV-C. $E=1,89$; Normalisierung gegen B2M ($E=1,94$) SDHA ($E=1,88$) und GAPDH ($E=1,66$)

3.3.4.2. Genexpressionsänderung nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung

Die Genexpression schadensinduzierbarer Gene nach Exposition mit ionisierender Strahlung wurde analog zu den Untersuchungen mit nicht-ionisierender Strahlung untersucht. Bei Bestrahlung mit energiereicher Strahlung sind Art und Ausmaß des resultierenden Schadens von der Qualität der Strahlung und der Dosis abhängig.

Während bei locker-ionisierender Strahlung (Gamma-, Beta- und Röntgenstrahlung) die Ionisationsereignisse oft weit voneinander entfernt und relativ homogen im Zellkern verteilt sind, kommt es bei Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung (Alphastrahlung, Neutronen, Schwerionen) zu einer inhomogenen Verteilung im Zellkern mit dicht nebeneinander lokalisierten Ionisationsereignissen. Die unterschiedliche Ionisationsdichte ist mit einer unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit verknüpft. Bestrahlungen mit Beta-, Gamma- und Röntgenstrahlen (niedriger LET) führen zu Basenschäden bzw. Einzel- und Doppelstrangbrüchen während Alpha- und Neutronenstrahlen bevorzugt Doppelstrangbrüche verursachen (hoher LET).

Neben den Untersuchungen mit elektromagnetischer Strahlung (Röntgenstrahlen) wurden Genexpressionsprofile nach Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung (Alpha-Teilchen und beschleunigten Ionen) mittels quantitativer RT-PCR erstellt. Um eine Vergleichbarkeit der Resultate zu bewirken, wurden auch hier alle Bestrahlungen bei konstanter Zelldichte von 60 – 70% Konfluenz durchgeführt. Die Höhe der jeweiligen Überlebensrate für die untersuchten Zelllinien ist in den Tabellen 3-9 und 3-10 aufgeführt.

Tab. 3-9: Klonogenes Überlebens nach Exposition mit Röntgenstrahlung

| Zelllinie | Strahlenart | Dosis | Klonogenes Überleben [%] |
|--------------|-------------|--------|--------------------------|
| A549 | Röntgen | 0,5 Gy | 86,2 |
| | | 2 Gy | 40,0 |
| | | 4 Gy | 12,1 |
| MCF-7 | Röntgen | 0,5 Gy | 72,92 |
| | | 2 Gy | 21,35 |
| | | 4 Gy | 3,78 |
| Fibroblasten | Röntgen | 0,5 Gy | 72,67 |
| | | 2 Gy | 15,55 |
| | | 4 Gy | 1,65 |
| AGS | Röntgen | 4 Gy | 2,64 |

3.3.4.2.1. Expression von GADD45 α nach Exposition mit Röntgenstrahlen

Nach Strahlenexposition mit Röntgenstrahlen konnte nur eine nur vergleichsweise moderate, dosisabhängige Induktion der GADD45 α Genexpression beobachtet werden. In der Zelllinie A549 wurde die Änderung der GADD45 α Transkriptmenge in zwei unabhängigen Experimenten nach Bestrahlung mit 0,5, 2 und 4 Gy Röntgenstrahlen untersucht (Abb. 3-33). Eine maximale Induktion wurde 30 Minuten nach Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen (Faktor 2,08), 2 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgen (Faktor 2,12) und 4 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy (Faktor 2,69) gefunden.

Auch das Profil der Zelllinie MCF-7 nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy zeigte eine annähernd zweifache Erhöhung der GADD45 α Genexpression mit Maxima nach Inkubationszeiten von 7,5 Stunden (2 Gy) bzw. 24 Stunden (6 Gy) (Abb. 3-34). Während das relative Expressionsniveau nach Röntgenbestrahlung mit 2 Gy wieder auf Werte der unbestrahlten Kontrolle zurückkehrte, blieb die Genexpressionserhöhung nach Bestrahlung mit 6 Gy über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Stunden um das Zweifache erhöht.

Die Genexpressionskinetik nach 4 Gy Röntgenbestrahlung in der Zelllinie AGS zeigte nach 15 Minuten eine hochsignifikante Hochregulierung der GADD45 α mRNA um einen Faktor von 2,73 ($\log_2 = 1,45$), die im weiteren Verlauf Werte der unbestrahlten Kontrolle aufwies (Abb. 3-35).

Bestrahlung mit Röntgenstrahlen mit Dosen von 0,5 bis 4 Gy zeigte in der Zelllinie NHF keine signifikante Änderung der GADD45 α Genexpression (Abb. 3-36).

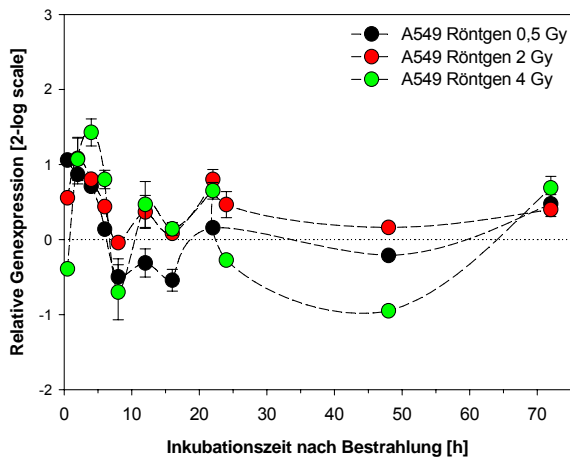


Abb. 3-33: GADD45 α in A549 Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Exp. 1: E=2,06; Normalisierung gegen B2M (E=2,07), ACTB (E=1,91), HPRT (E=1,88). Exp. 2: E=2,04; B2M (E=1,92), ACTB (E=1,93); PBGD (E=1,81), GAPDH (E=1,90)

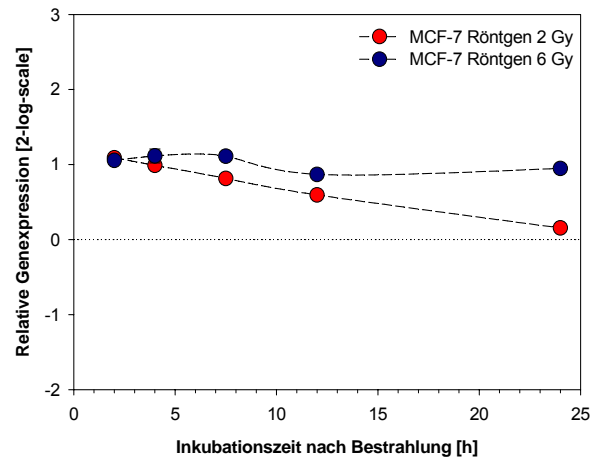


Abb. 3-34: Analyse der GADD45 α -Genexpressionsänderung in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. E= 1,64. Normalisierung gegen GAPDH (E=1,67)

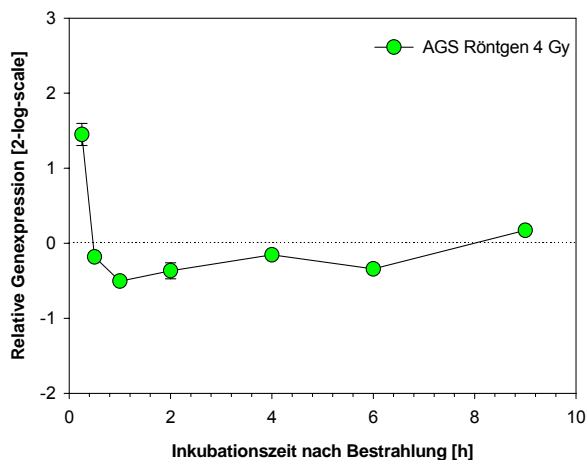


Abb. 3-35: GADD45 α Genexpression in AGS-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. E=1,85; Normalisierung gegen HPRT (E=1,94) und B2M (E=1,91)

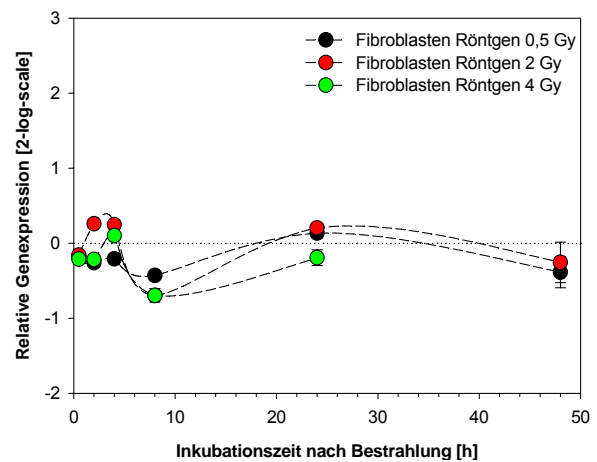


Abb. 3-36: GADD45 α Genexpression in Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. E=1,97; Normalisierung gegen B2M (E=1,87), SDHA (E=2,03) und PBGD (1,88)

3.3.4.2.2. Expression von p21 (CDKN1A) nach Exposition mit Röntgenstrahlen

Bestrahlung mit Röntgenstrahlen führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer einheitlichen Hochregulierung des Zellzyklusinhibitors p21.

In der Zelllinie A549 wurde in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis im Untersuchungszeitraum bis 72 Stunden eine Induktion der relativen Genexpression beobachtet, maximal erhöht im Bereich von 6 bis 24 Stunden nach Bestrahlung (Abb. 3-37). Die Induktion der p21-mRNA Expression konnte dosisabhängig bis zu einem Zeitraum von 48 Stunden nachgewiesen werden. Exposition von MCF-7 Zellen mit 2 und 6 Gy Röntgenstrahlen führte zu einer Hochregulierung der p21 mRNA Transkriptmenge mit 3fachen (4 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy) bis 5fachen (4 Stunden nach Bestrahlung mit 6 Gy) Maxima relativ zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 3-38).

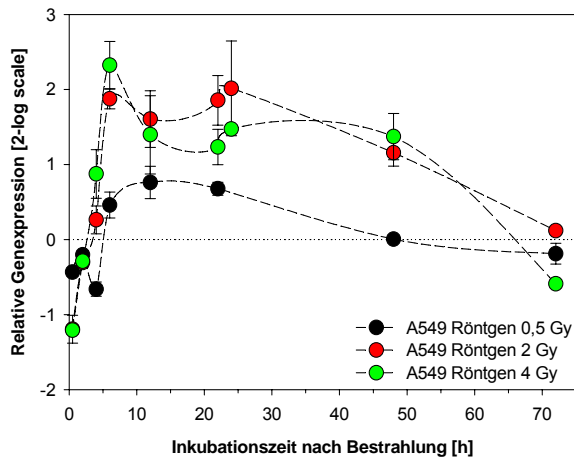


Abb. 3-37: p21 in A549 Zellen. Exp. 1: $E=2,06$; Normalisierung gegen B2M ($E=2,07$), ACTB ($E=1,91$) und HPRT ($E=1,88$). Exp. 2: $E=2,10$; B2M ($E=1,92$), ACTB ($E=1,93$); PBGD ($E=1,81$) und GAPDH ($E=1,90$)

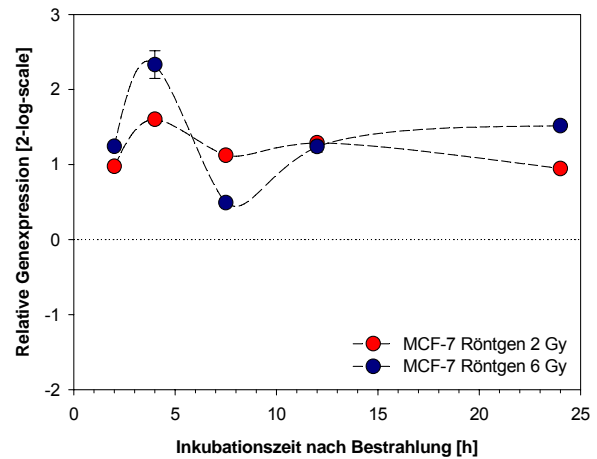


Abb. 3-38: Analyse der p21 Genexpression in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. $E=1,91$. Normalisierung gegen GAPDH ($E=1,67$)

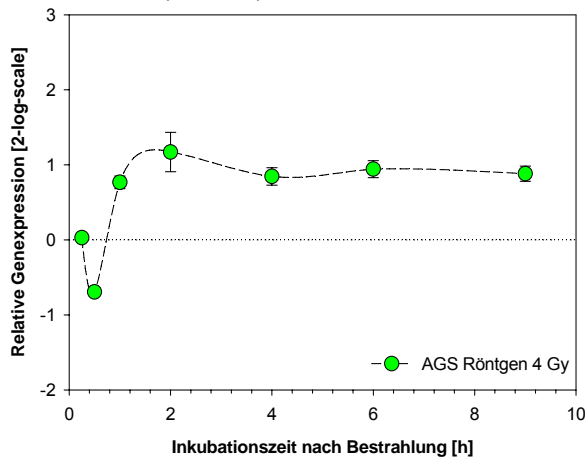


Abb. 3-39: p21 Genexpression in AGS Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. $E=1,67$; Normalisierung gegen HPRT ($E=1,94$) und B2M ($E=1,91$)

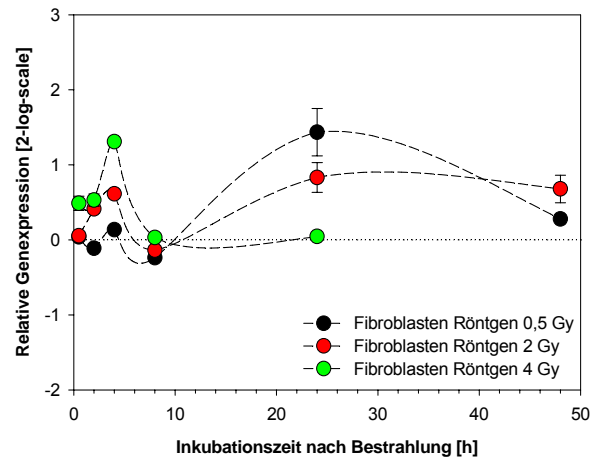


Abb. 3-40: p21 Genexpression in Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. $E=1,95$; Normalisierung gegen B2M ($E=1,87$), SDHA ($E=2,03$) und PBGD ($E=1,88$)

Eine Strahlendosis von 4 Gy Röntgenstrahlen steigerte das Genexpressionslevel in den Zelllinien AGS (Abb. 3-39) und NHF (Abb. 3-40) auf deutlich niedrigerem Niveau mit vergleichbaren Maxima von 2,5 (NHF 4 Stunden.) und 2,25 (AGS 2 Stunden).

3.3.4.2.3. Expression von p53R2 (RRM2b) nach Exposition mit Röntgenstrahlen

Exposition mit locker-ionisierender Strahlung führte zu einer vergleichsweise geringen p53R2 mRNA Induktion. Während die quantitative Analyse in den Zelllinien MCF-7 (Abb. 3-42) und AGS (Abb. 3-43) keine signifikante Veränderung zeigte, konnte 6 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlen in der Zelllinie A549 (Abb. 3-41) eine Steigerung der Expression um das 2,66-fache ($\log_2 = 1,41$) und nach Bestrahlung mit 4 Gy um das 2,7-fache ($\log_2 = 1,43$) gefunden werden. Die Analyse der NHF (Abb. 3-44) zeigte zum Ende des Untersuchungszeitraums von 48 Stunden eine Erhöhung der p53R2-Transkriptmenge um mehr als den Faktor 2, die im Randomisationstest der Rest©-Software allerdings nicht als statistisch signifikant getestet wurde.

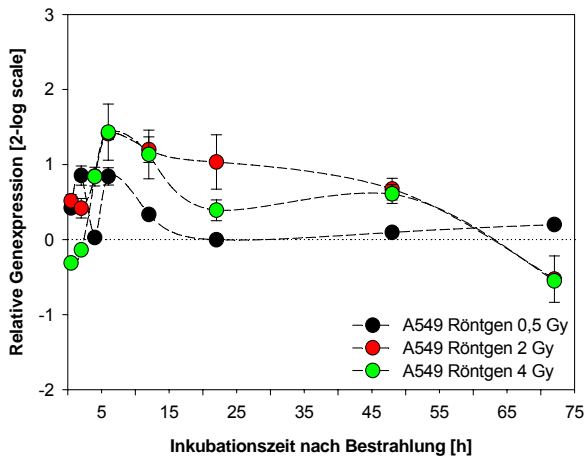


Abb. 3-41: p53R2 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Exp.1: $E=2,16$; Normalisierung gegen B2M ($E=2,07$), ACTB ($E=1,91$), HPRT ($E=1,88$). Exp. 2: $E=1,93$; B2M ($E=1,92$), ACTB ($E=1,93$); PBGD ($E=1,81$) und GAPDH ($E=1,90$)

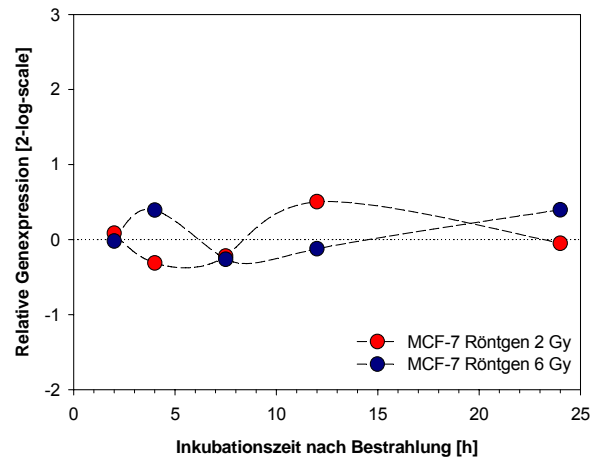


Abb. 3-42: p53R2 in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. $E=1,95$. Normalisierung gegen GAPDH ($E=1,67$)

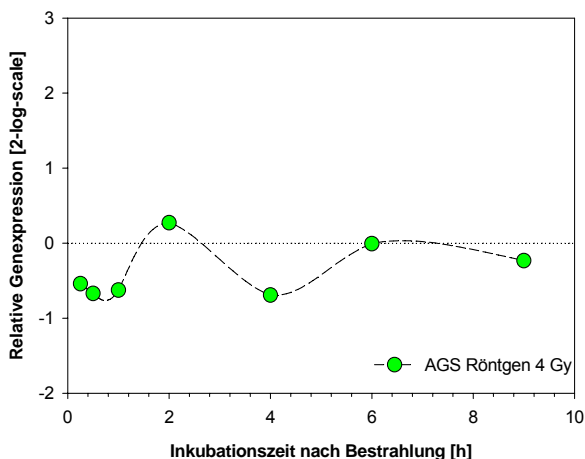


Abb. 3-43: p53R2 in AGS Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. $E=1,79$; Normalisierung gegen HPRT ($E=1,94$) und B2M ($E=1,91$)

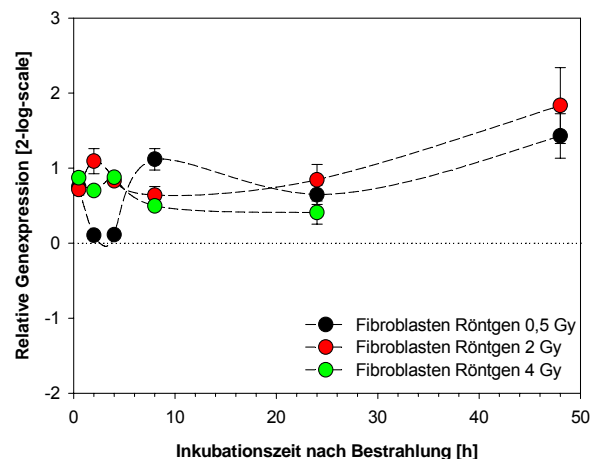


Abb. 3-44: p53R2 in Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. $E=1,86$; Normalisierung gegen B2M ($E=1,87$), SDHA ($E=2,03$) und PBGD ($1,88$)

3.3.4.3. Modulation der Genexpression nach Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung

Die lokale Energiedeposition korreliert mit der Wahl der Ionensorte und mit der Strahlenenergie, wodurch grundlegende Mechanismen der Strahlenschädigung besonders gut analysiert werden können. Untersuchungen wurden mit dicht-ionisierenden Alpha-Teilchen und mit beschleunigten Blei-, Kohlenstoff- und Argon-Ionen durchgeführt. Die Überlebensrate nach Exposition mit unterschiedlichen Partikeldichten wurde aus den für jeden Zelltyp charakteristischen Dosis-Effektkurven bestimmt (Tabelle 3-10).

Tab. 3-10: Klonogenes Überleben nach Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung

| Zelllinie | Strahlenart | LET [keV/μm] | Fluenz [P/cm ²] | Dosis [Gy] | Treffer pro Kern | Überleben [%] |
|-----------|--------------------------|--------------|-----------------------------|------------|------------------|---------------|
| A549 | α-Teilchen 2,1 MeV/amu | 160 | 5x10 ⁶ | 1,24 | 12.5 | 24,86 |
| A549 | Blei (208 Pb) 29 MeV/amu | 130000 | 5 x10 ⁵ | 10,4 | 1.25 | 54,8 |
| | | | 1 x10 ⁶ | 20,8 | 2.5 | 39,1 |
| | | | 1,25 x10 ⁶ | 0,46 | 3.5 | 70,7 |
| | | | 2,5 x10 ⁶ | 0.93 | 7 | 49,9 |
| MCF-7 | Argon (36 Ar) 95 MeV/amu | 232.2 | 5 x10 ⁶ | 1,86 | 14 | 24,9 |
| | | | 1 x10 ⁷ | 3,71 | 28 | 6,22 |
| | | | 2 x10 ⁷ | 7,42 | 56 | 0,39 |
| | | | 4 x10 ⁷ | 14,85 | 112 | 1,5e-3 |

3.3.4.3.1. GADD45α nach dicht-ionisierender Strahlung

Um der Frage nachzugehen, ob die Ionisationsdichte Einfluss auf die relative Genexpression nach Bestrahlung hat, wurden A549 Zellen mit dicht-ionisierenden Alpha-Teilchen (2,1 MeV, LET 160 keV/μm) mit einer Partikeldichte von 5 x10⁶ Alpha-Teilchen pro cm² (entsprechend einer mittleren Trefferzahl von 12,5 pro Zellkern) bestrahlt (Abb. 3-45).

In zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurde die Genexpression für GADD45α innerhalb der ersten vier Stunden und in einem späteren Untersuchungszeitraum bis 24 Stunden nach Bestrahlung mit Alpha-Teilchen untersucht. Im frühen Untersuchungszeitraum zeigte sich eine Abregulierung der Genexpression, die maximal um einen Faktor von 5,3 vier Stunden nach Bestrahlung relativ zur Kontrolle reprimiert war. Dieser folgte eine Hochregulierung mit einer maximalen Induktion 16 Stunden nach Bestrahlung (5,5fach gegenüber der Genexpression der unbestrahlten Kontrollzellen). 24 Stunden nach Bestrahlung war die Expression immer noch 3,9-fach erhöht.

Als weiteres Beispiel für dicht-ionisierende Strahlung wurde die Expression von GADD45α nach Bestrahlung mit Blei-Ionen (29 MeV/amu; LET 13000 keV/μm) in A549 Zellen untersucht (Abb. 3-46). Bei Exposition mit Partikeldichten von 5 x10⁵ und 1 x10⁶ pro cm² (entsprechend einer berechneten Trefferzahl von 1,25 bis 2,5 pro Zellkern) wurde bis zu einem Zeitraum von acht Stunden nach Bestrahlung keine signifikante Hoch- oder Herunterregulierung der GADD45α Genexpression von beobachtet.

In einem weiteren Experiment wurde die GADD45α Genexpression nach Exposition mit Argon-Ionen (36-Argon, 95 MeV/amu, LET 232,4 keV/μm) im Fluenzbereich von 1,25 x10⁶ bis 4 x10⁷ Partikel pro cm² (entsprechend 3,5 bis 112 Treffern pro Zellkern) in MCF-7 Zellen untersucht (Abb. 3-47). Während das Expressionsniveau für GADD45α für alle Partikeldichten zwei Stunden

nach Bestrahlung unter dem Niveau der unbestrahlten Kontrollpopulation lag, zeigte die Genexpressionsanalyse 12 Stunden nach Bestrahlung eine dosisabhängige Erhöhung der relativen Expression mit einer maximal 3,37fachen ($\log_2 = 1,75$) Hochregulation für die Exposition mit einer Fluenz von 4×10^7 Teilchen / cm^2 .

3.3.4.3.2. p21 (CDKN1A) nach Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung

Bestrahlung mit beschleunigten Ionen führte sowohl in der Zelllinie A549 als auch in MCF-7 Zellen zu einer dosis- und zeitabhängigen Hochregulierung der p21-Transkriptmenge. Nach Bestrahlung mit 5×10^6 Alpha-Teilchen pro cm^2 in A549 Zellen (Abb. 3-48) wurde die Expression des Zellzyklusinhibitors fünf Stunden nach Bestrahlung um das 2,42-fache ($\log_2 = 1,27$) herauf reguliert. Im weiteren Verlauf sank die Transkriptmenge auf das Niveau der unbestrahlten Kontrolle und zeigte sich nach 24 Stunden im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle 2,1fach ($\log_2 = 0,47$) herunter reguliert.

Bestrahlung mit beschleunigten Blei-Ionen in A549 Zellen (Abb. 3-49) führte nach zwei bzw. vier Stunden zu einer dosisabhängigen Hochregulierung der p21-Expression um das 5,73fache (Fluenz 1×10^6 Teilchen pro cm^2) bzw. 4,12fache (Fluenz 5×10^5 Teilchen pro cm^2). Während die relative Genexpression des Zellzyklusinhibitors nach Applikation der höheren Partikeldichte wieder auf das Expressionsniveau der Kontrollpopulation zurückkehrte, blieben die Werte nach Exposition mit der niedrigeren Partikeldichte acht Stunden nach Bestrahlung erhöht.

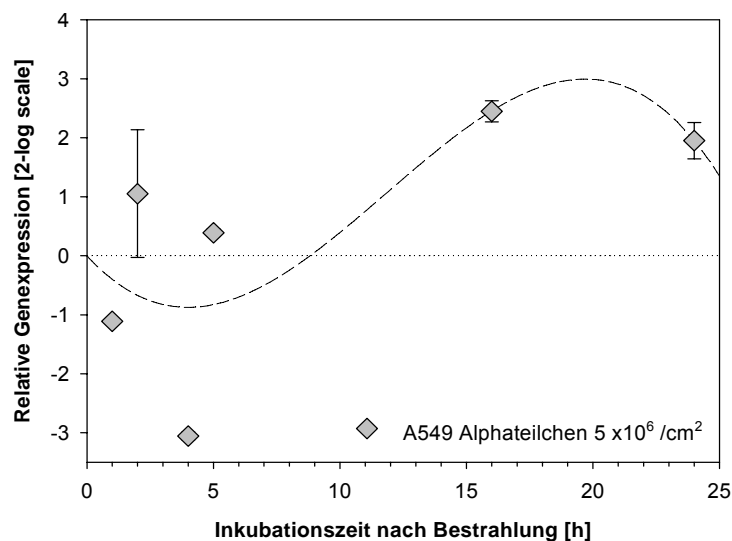


Abb. 3-45: Änderung der Genexpression von GADD45 α in A549 Zellen nach Bestrahlung mit dicht-ionisierenden Alpha-Teilchen (5×10^6 pro cm^2). Berechnung aus zwei unabhängigen Versuchen (Versuch1: E=2,00; Normalisierung gegen PBGD (E=1,90) und B2M (E=1,95); Versuch 2: E=2,16; Normalisierung gegen GAPDH (E=1,81))

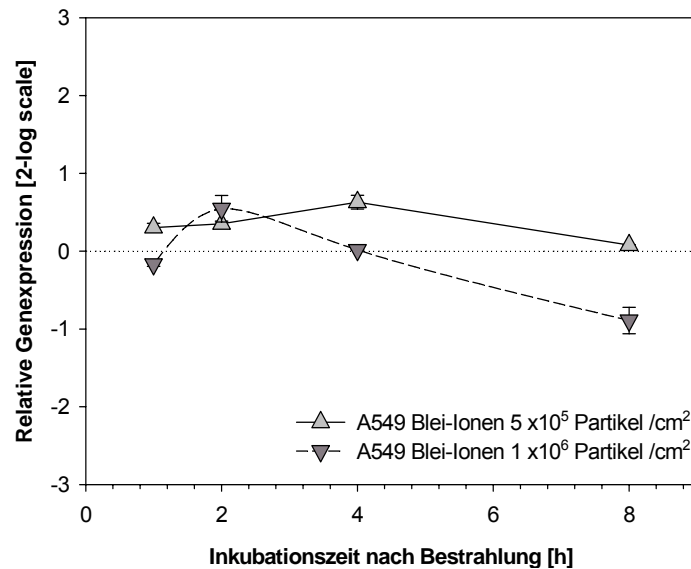


Abb. 3-46: Änderung der Genexpression von GADD45 α in A549 Zellen nach Bestrahlung mit Blei-Ionen. E=1,86; Normalisierung gegen B2M (E=1,96)

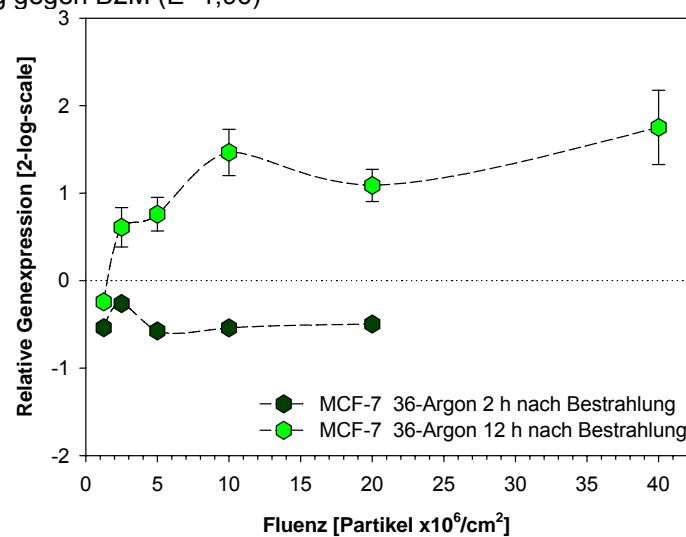


Abb. 3-47: GADD45 α Genexpressionsänderung in MCF-7 Zellen 2 und 12 Stunden nach Bestrahlung mit Argon-Ionen im Fluenzbereich von 1,25 x 10⁶ bis 4 x 10⁷ Partikel pro cm². E=1,78 Normalisierung gegen HPRT (1,81)

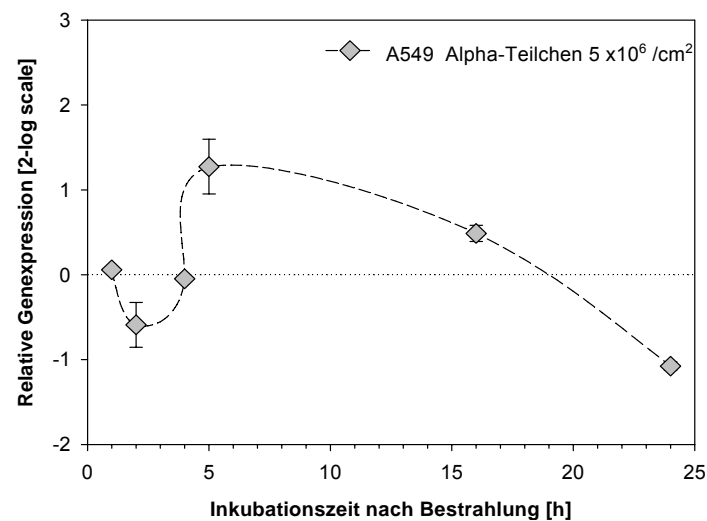


Abb. 3-48: Änderung der Genexpression von p21 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit 5 x 10⁶ Alpha-Teilchen/cm². Versuch 1: E=1,82; Normalisierung gegen PBGD (E=1,90) und B2M (E=1,95); Versuch 2: E=2,18; Normalisierung gegen GAPDH (E=1,81)

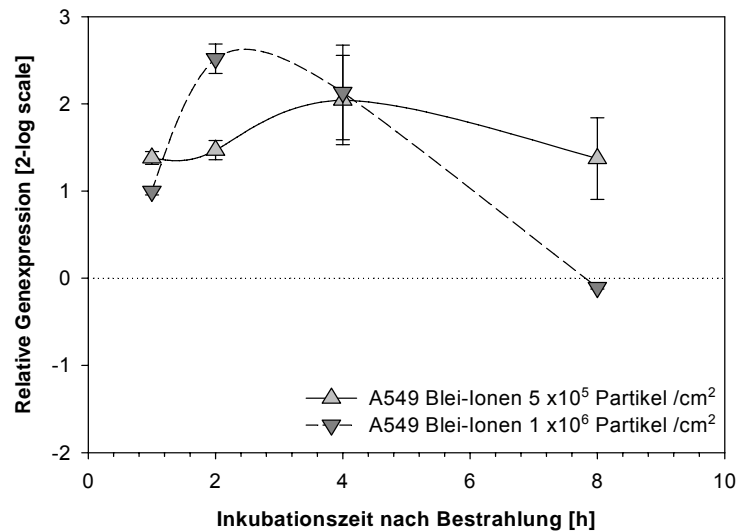


Abb. 3-49: Änderung der Genexpression von p21 in A549 Zellen nach Exposition mit Blei-Ionen (5×10^5 und 1×10^6 Teilchen /cm²). $E=1,81$; Normalisierung gegen B2M ($E=1,96$)

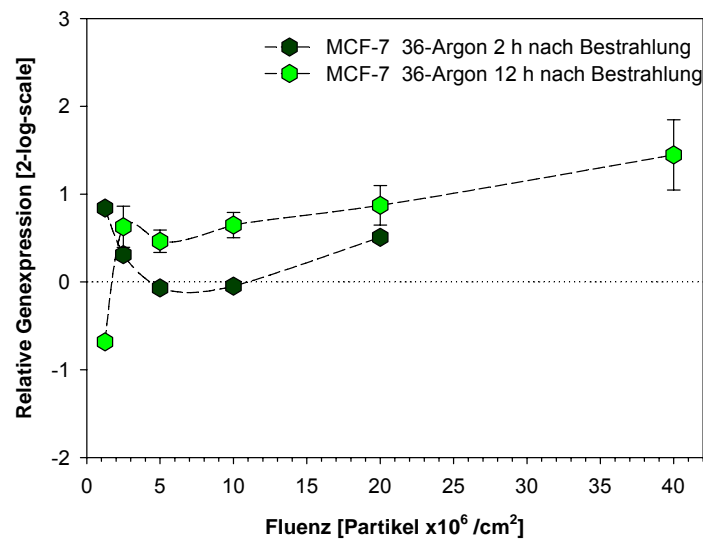


Abb. 3-50: Änderung der p21-Genexpression in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit Argon-Ionen im Fluenzbereich von $1,25 \times 10^6$ bis 4×10^7 Partikel pro cm². $E=1,78$ Normalisierung gegen HPRT ($1,81$)

Zwei Stunden nach Bestrahlung mit Argon-Ionen wurde in MCF-7 Zellen (Abb. 3-50) keine Veränderung der relativen Expression gefunden, die um mehr als das 2-fache von der unbestrahlten Kontrolle differierte. 12 Stunden nach Bestrahlung zeigte die Analyse bei Bestrahlung mit der höchsten Partikeldichte einen mäßigen, dosisabhängigen Anstieg der relativen Expression auf das 2,73-fache ($\log_2 = 1,45$).

3.3.4.3.3. p53R2 nach Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung

Das p53R2-Genexpressionsprofil zeigte 16 Stunden nach Bestrahlung mit Alpha-Teilchen in A549 Zellen ein Maximum der Expression mit 2,1facher Hochregulierung relativ zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 3-51). Alle anderen Untersuchungszeitpunkte zeigten lediglich Werte im Schwankungsbereich der Kontrolle.

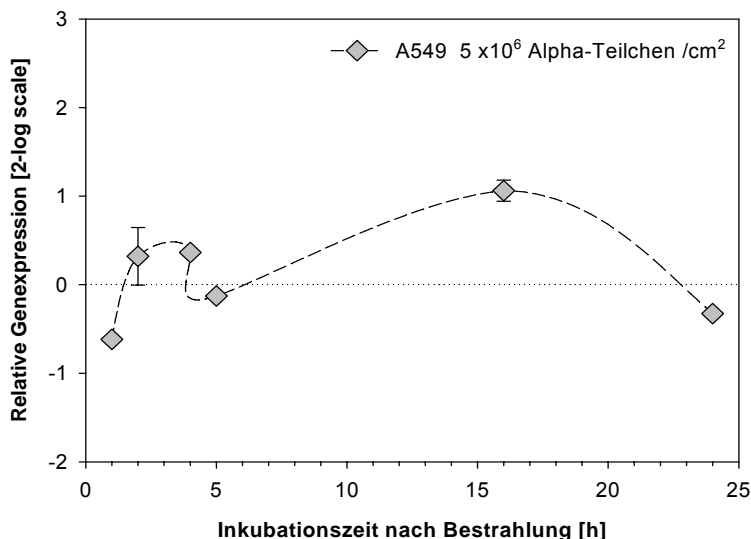


Abb. 3-51: Änderung der Genexpression von p53R2 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit 5×10^6 Alpha-Teilchen pro cm^2 . Berechnung aus zwei unabhängigen Versuchen: Versuch 1: $E=1,96$; Normalisierung gegen PBGD ($E=1,90$) und B2M ($E=1,95$); Versuch 2: $E=2,05$; Normalisierung gegen GAPDH ($E=1,81$)

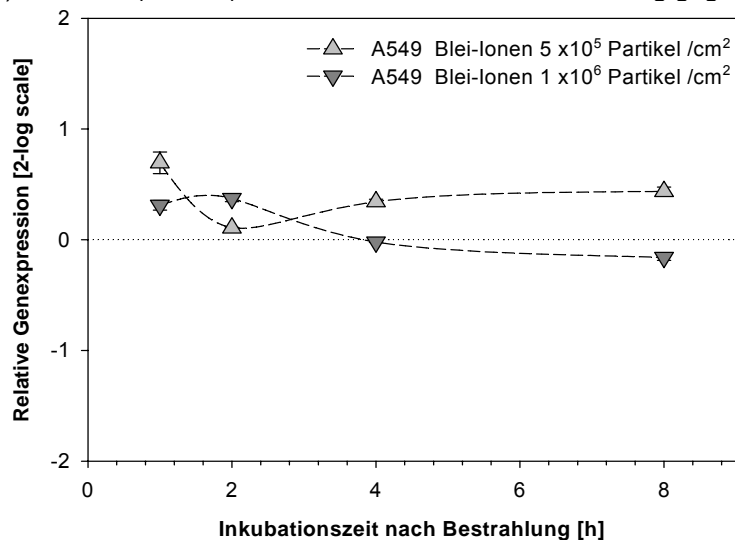


Abb. 3-52: Änderung der Genexpression von p53R2 in A549 Zellen nach Bestrahlung mit Blei-Ionen (Fluenz 5×10^5 und 1×10^6 Teilchen / cm^2). $E=1,74$; Normalisierung gegen B2M ($E=1,96$)

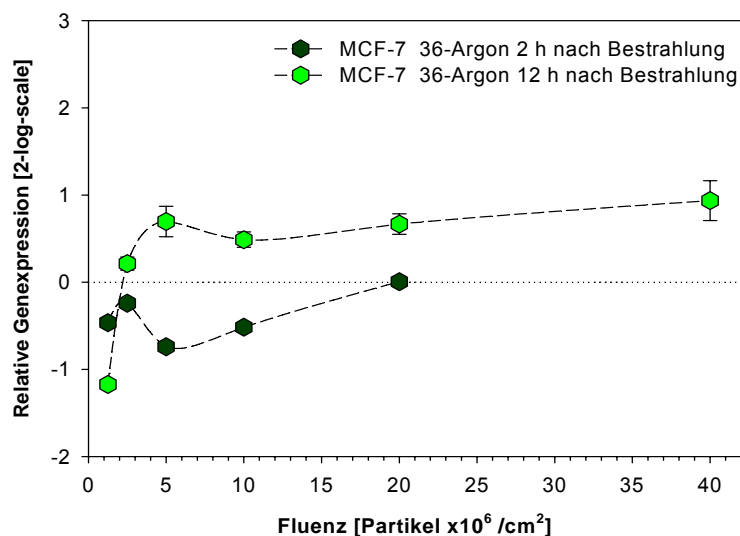


Abb. 3-53: p53R2 Expressionsänderung in MCF-7 Zellen 2 und 12 Stunden nach Bestrahlung mit Argon-Ionen im Bereich von $1,25 \times 10^6$ bis 4×10^7 Partikeln pro cm^2 . $E=1,76$ Normalisierung gegen HPRT (1,81)

Nach Exposition mit Blei-Ionen in A549 Zellen (Abb. 3-52) zeigte die Expressionsanalyse im gewählten Fluenzbereich von 5×10^5 bis 1×10^6 Teilchen pro cm^2 eine mäßige Erhöhung der Transkriptmenge mit Schwankungen im Bereich der unbestrahlten Kontrolle. Auch nach Bestrahlung mit beschleunigten Argon-Ionen in MCF-7 Zellen (Abb. 3-53) konnte 12 Stunden nach Bestrahlung eine nur mäßige, dosisabhängige Modulation der p53R2 Genexpression beobachtet werden.

3.3.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalysen nach Bestrahlung mit ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung

Die Änderung der Genexpressionsrate der untersuchten schadensrelevanten Gene wies in den etablierten Karzinomzelllinien eine größere Modulationsbreite auf als in der aus Fibroblasten eines gesunden Spenders etablierten Linie. Innerhalb der etablierten Zelllinien zeigten insbesondere A549 Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten eine hohe Induzierbarkeit in Abhängigkeit von Strahlenart und applizierter Dosis.

3.4. Rekombinante Zelllinien für ein Weltraumexperiment

3.4.1. Konstitutive Expression des pEGFP-Gens als Marker für Vitalität in lebenden Zellen

Die EGFP codierende Sequenz steht im Vektor pEGFP-N1 (Abb. 3-54) unter der Kontrolle eines konstitutiv arbeitenden Cytomegalievirus-Promotor (CMV) und exprimiert in vitalen Säugerzellen bei Blaulicht-Anregung (488 nm) eine stabile Grünlicht-Fluoreszenz (507-509 nm), die im Fluoreszenzmikroskop, MTP-Plattenreader oder in der FACS-Analyse mit einem Emissionsmaximum von 507-509 nm ohne Zugabe von Substraten oder Co-Faktoren (Chalfie *et al.*, 1994) quantifiziert werden kann.

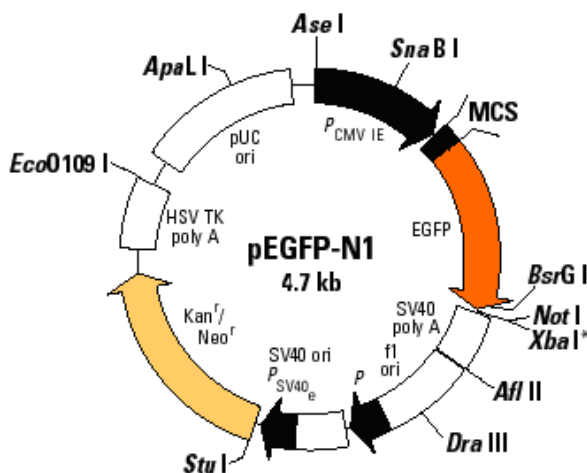


Abb. 3-54: Expressionsvektor pEGFP-N1 (*BD Biosciences Clontech*): Das EGFP Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiv arbeitenden CMV-Promotors (PCMV IE). Das Neomycin-Resistenzgen erlaubt die Selektion von stabil transfizierten Zellen mittels Geneticinsulfat (G418). ori: Replikationsursprung; P: Promotor; MCS: *Multiple Cloning Site* – Klonierungsstelle mit singulären Schnittstellen; poly A: Polyadenylierungs-Signal; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzkassette.

Stabil transfizierte Zelllinien (Abb. 3-55) wurden als ein *in-vitro*-Modell zur Bestimmung der Zytotoxizität nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten verwendet. Die Messung

der Fluoreszenzentwicklung über die Zeit erlaubt in konstitutiv EGFP-exprimierenden Zellen eine schnelle Quantifizierung des Wachstums und damit der Vitalität. Die Methode bietet insbesondere dann Vorteile, wenn durch experimentelle Bedingungen der Umfang der untersuchten Zellzahl eingeschränkt werden muss.

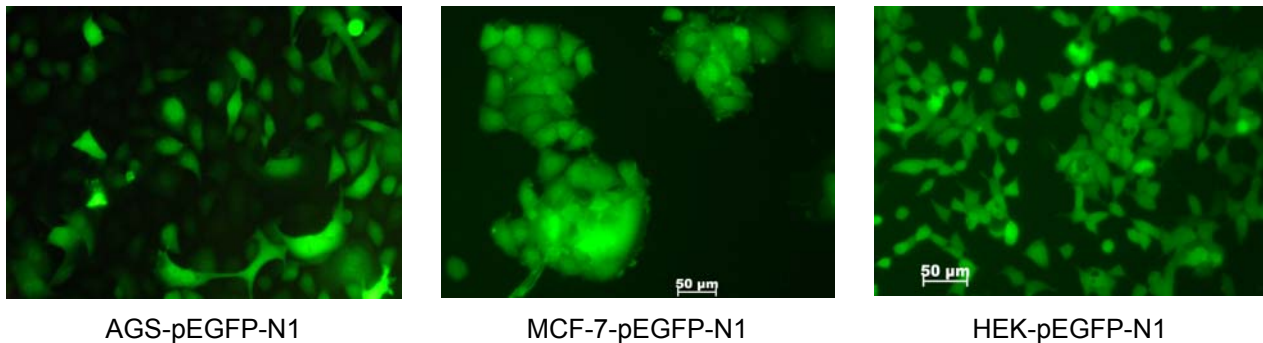


Abb. 3-55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach stabiler Transfektion des Vektors pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech) in verschiedenen Zelllinien. Die konstitutive Expression des EGFP-Gens führt zu einer nahezu gleichmäßigen Fluoreszenz über den gesamten Zellinhalt.

Konstitutiv EGFP-exprimierende A549-Zellen (Abb. 3-56) wurden in einer 96 well-Mikrotiterplatte (MTP) Röntgenstrahlen unterschiedlicher Dosis exponiert. Während in unbestrahlten Zellen im MTP-Fluorimeter (Filter 460+508 nm) eine deutliche Zunahme der EGFP-Fluoreszenz über die Zeit gemessen werden konnte, blieb die Fluoreszenzentwicklung bestrahlter Zellen unterhalb der der Kontrollzellen in Abhängigkeit von der gewählten Dosis. Zur Bestimmung der Wachstumshemmung nach Bestrahlung wurde die Entwicklung der relativen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Dosis ermittelt (Abb. 3-57).

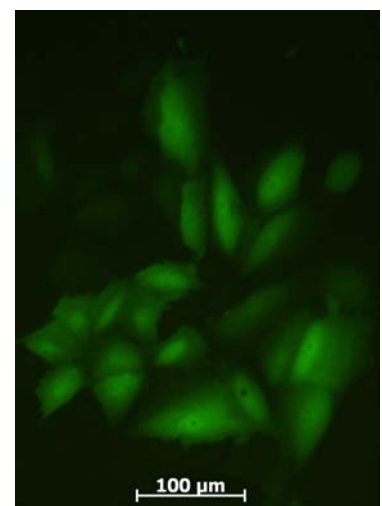
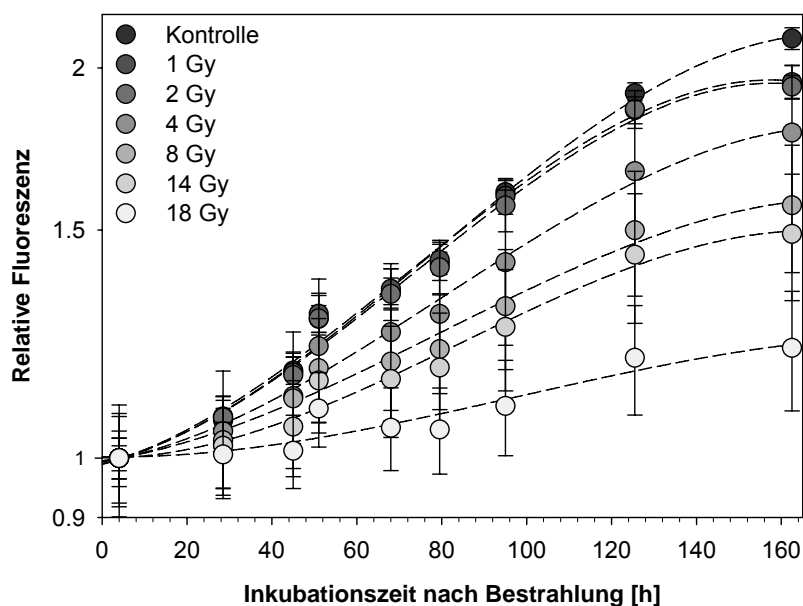


Abb. 3-56: Relative Fluoreszenz konstitutiv EGFP-exprimierender A549 Zellen (A549-pEGFP-N1) nach Exposition mit Röntgenstrahlen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte über einen Zeitraum von 163 Stunden im MTP-Fluorimeter. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils n=8 wells pro Dosis.

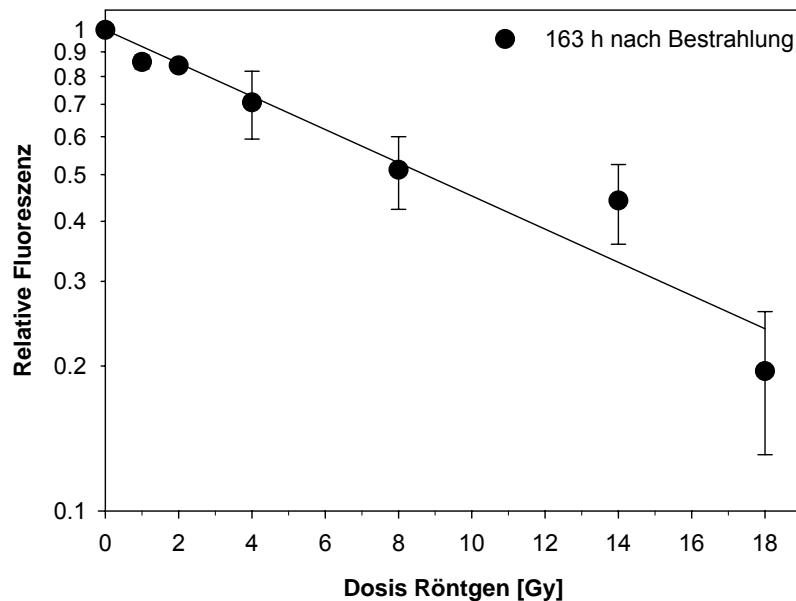


Abb. 3-57: Dosis-Wirkungsbeziehung zur Bestimmung der Wachstumshemmung 163 Stunden nach Exposition mit Röntgenstrahlen. Nach Subtraktion des 0-Stunden Fluoreszenzwertes wurde die Wachstumshemmung als relative Fluoreszenz bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse umfasst die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n=16$.

3.4.2. Induzierbare Expression von p53R2 als Markergen für den Einsatz auf der Internationalen Raumstation

Für die Entwicklung eines intrazellulären Testsystems sollte ein induzierbares Gen verwendet werden, dessen Genprodukt eine Rolle bei den vielfältigen Reparaturmechanismen der Zelle spielt. Obwohl die Genexpressionsanalysen der bereits gut untersuchten Gene p21 und GADD45 α eine gute Induzierbarkeit zeigten, fiel die Wahl für einen Sensor des zu entwickelnden Testsystems auf die induzierbare Form der Ribonukleotid Reduktase (p53R2). Das über den Tumorsuppressor p53 induzierbare Gen kodiert für eine Variante der kleinen Katalyseeinheit des Enzyms und zeigte nach Strahlenexposition unterschiedlicher Qualität sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene eine reproduzierbare Induzierbarkeit.

3.4.2.1. Plasmidkonstruktion des p53R2 (RRM2b) Vektors als Marker für Genotoxizität

Für die Expression der rekombinanten DNA-Moleküle wurden kommerzielle Expressionsvektoren verwendet, die nach den in Material und Methoden beschriebenen Modifikationen in prokaryontischen Zellen vermehrt und nach Isolation und Reinigung in eukaryontische Zellen eingeschleust wurden. Als Grundgerüst für die klonierten Konstrukte dienten die Plasmide pNF κ B-d2EGFP, pEGFP-1 und pd2EGFP-1 (Clontech). Für Subklonierungen wurde der Phagemid-Vektor pBluescript (pBSIIS) von Stratagene benutzt. Entsprechende Vektorkarten sind dem Anhang beigefügt. Sequenzanalysen zur Verifizierung der Konstrukte wurden als Auftragsarbeit im Servicelabor des „Zentrums für Molekulare Medizin“ (ZMMK) der Universität Köln durchgeführt. Für die Konstruktion eines auf Basis des p53R2-Gens induzierbaren Expressionsvektors wurde die im ersten Intron des p53R2 Gens identifizierte Bindestelle des Transkriptionsfaktors p53 (Abb.

3-58) als regulatorisches Element in die promotorlosen Vektoren pEGFP-1 bzw. pd2EGFP-1 kloniert. Die Sequenz der Oligonukleotide wurde so gewählt, dass neben der Sequenz der p53-Bindestelle in 2-facher Wiederholung flankierend Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BglII und SalI angefügt waren.

Im ersten Schritt wurden die analog der p53-Bindestelle hergestellten Oligonukleotide in einer Annealingreaktion aneinander gefügt und anschließend zur Vervielfältigung in den Phagemid-Vektor pBluescript (pBSIIS) kloniert. Nach Isolierung der 2-fach-Bindestelle mit den flankierend schneidenden Restriktionsenzymen BglII und SalI wurde das isolierte Fragment in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors pEGFP-1 bzw. pd2EGFP-1 eingefügt. Anschließend wurde der 155 bp große Thymidinkinase-Minimal-Promotor aus dem Vektor pNF κ B-d2EGFP isoliert und stromabwärts der synthetischen 2-fach Bindestelle hinzugefügt. Dazu wurde der Promotor aus dem Vektor pNF κ B-d2EGFP mit den flankierend schneidenden Restriktionsenzymen BglII und SmaI herausgeschnitten und nach Herstellung kompatibler Enden über die Schnittstelle SmaI in die MCS der Vektoren pEGFP bzw. pd2EGFP integriert. Nach Transformation in Bakterienzellen und Verifizierung der Sequenz wurde die gereinigte DNA in Säugerzellen mittels kationischer Liposomen transfiziert. Abbildung 3-59 gibt einen schematischen Überblick über die Schritte der Klonierung.



Abb. 3-58: **A:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des p53R2 Gens (Genlocus 8q23.1) über 9 Exons mit einer p53-Bindungsstelle im 1. Intron des Gens. Die Sequenz der Bindestelle (BS) erfüllt die Anforderungen an eine p53-Konsensussequenz (p53 CBS mit R = A oder G, W = A oder T, Y = C oder T). Aus Tanaka *et al.*, 2000. **B:** Sequenzinformation der analog der p53-Bindestelle hergestellten Oligonukleotide (gelb) mit Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BglII (blau) und SalI (rot). Die Nukleotide am 5'-Ende der Oligonukleotide wurden zur Erhöhung der Effizienz des Restriktionsverdau angefügt.

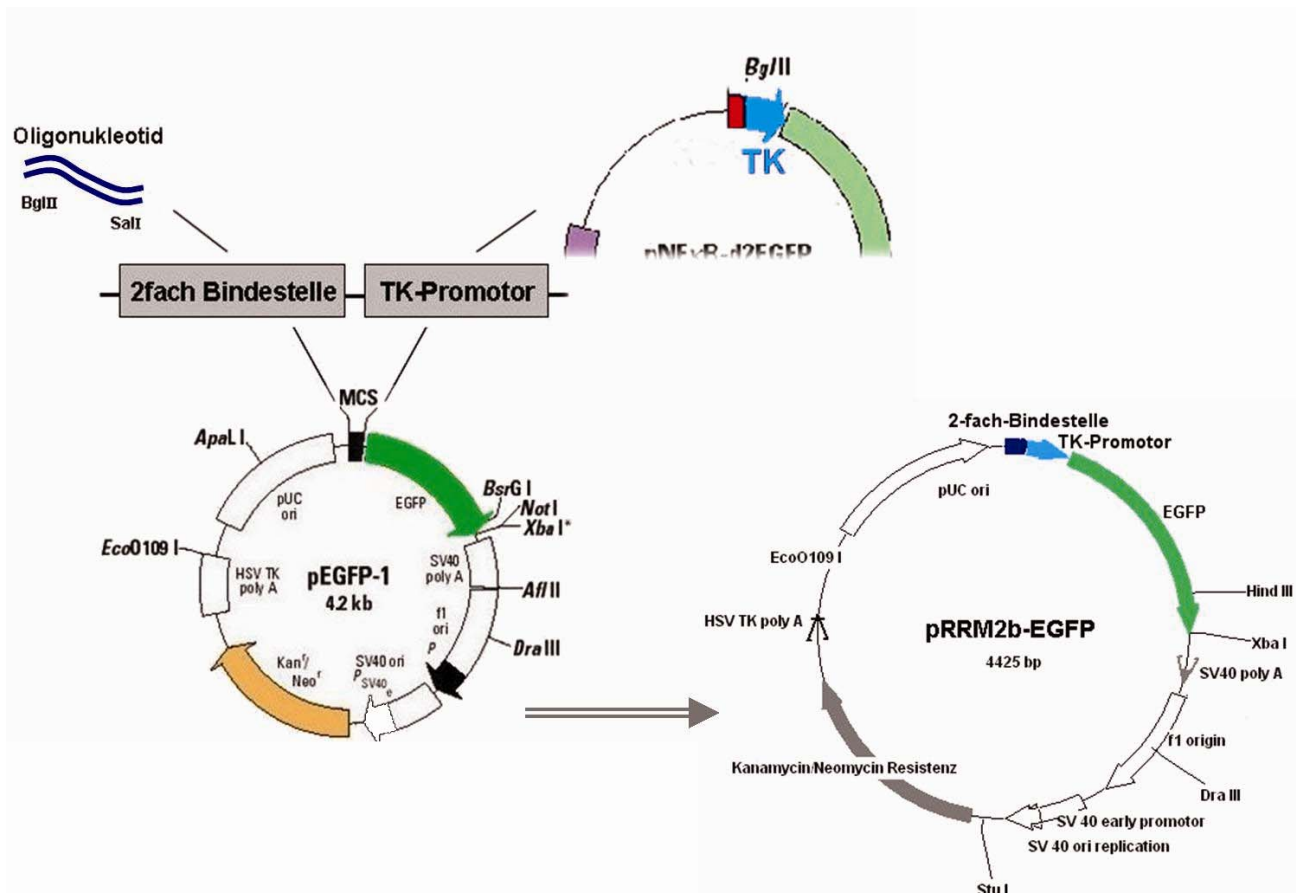


Abb. 3-59: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektors pRRM2b-EGFP: Die synthetisch hergestellte p53-Bindestelle aus dem ersten Intron des p53R2 Gen wurde in 2-fach Wiederholung (2fach Bindestelle) als regulatorisches Element zusammen mit dem Thymidin-Kinase-Minimalpromotor (TK-Promotor) aus dem Vektor pNFκB-d2EGFP in die MCS des promotorlosen Vektor pEGFP-1 kloniert.

3.4.2.2. Stabile Transfektion in A549 Zellen

Die stabile Transfektion beinhaltet einen Einbau fremder DNA in das Genom der transfizierten Zelle und die Expression wirtsfremder Proteine, nämlich EGFP und die Aminoglycosid-Phosphotransferase (APT), die der Zelle eine Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum Neomycin verleiht. Die bei einer Transfektion verwendeten Plasmide werden in das Genom der Zelle integriert. Je nach Lokalisation und Anzahl der eingefügten Vektoren können zytotoxische Effekte auftreten. So können Veränderungen in DNA-Reparaturgenen beispielsweise zu einer veränderten Strahlensensibilität der Zelle führen (Busch *et al.* 1989; Jeggo *et al.* 1994). Daher war es erforderlich, die entwickelten und als positiv getesteten Zelllinien auf ihre strahlenbiologischen Eigenschaften im Vergleich mit den Ausgangslinien zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Präsentiert sind im Folgenden die Daten der rekombinanten Zelllinien, die sich nach Erfassung der zell- und strahlenbiologischen Charakteristika nicht von der Ausgangszelllinie unterscheiden.

3.4.2.3. Identifizierung EGFP-positiver Klone mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Quantifizierung der Reporterexpression in jeder Zelle der transfizierten Population. Nach stabiler Transfektion der unter 3.4.2.1. beschriebenen Expressionsvektoren mit der 2fach p53-Bindestelle des p53R2 Gens wurden die unter Selektionsdruck erhaltenen Einzelzellklone vermehrt und anschließend hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten untersucht.

Von den annähernd 60 getesteten Klonen zeigten acht Klone nach Bestrahlung mit UV-C oder Röntgenstrahlen eine eindeutige Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit. Abbildung 3-60 zeigt exemplarisch Histogramme verschiedener Transfektanten 27 Stunden nach Induktion mit 20 J/m^2 UV-C. Aus der Analyse wurden Klone ausgeschlossen, die entweder keine Fluoreszenz zeigten (B) oder aus einer Mischpopulation aus induzierbaren und nicht-induzierbaren Zellen bestanden (C).

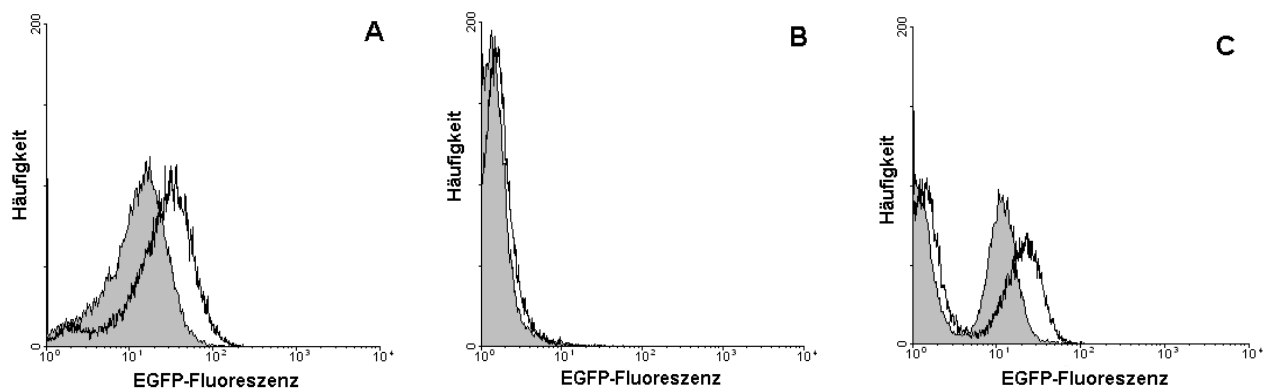


Abb. 3-60: Histogramme bestrahlter (Overlay) und unbestrahlter (grau) Transfektanten 27 Stunden nach Bestrahlung mit 20 J/m^2 UV-C. **A:** Beispiel für einen positiv getesteten Klon, der auf Bestrahlung mit einer Zunahme der Fluoreszenz des Reporterproteins antwortet; **B:** Negativ getesteter Klon **C:** Mischpopulation aus einer induzierbaren und nicht-induzierbaren Zellpopulation.

Ein induzierbarer Klon, wie er in Abb. 3-61 dargestellt ist, zeigte in der FACS-Analyse nach Bestrahlung eine Erhöhung der Fluoreszenz auf der logarithmischen Skala. Nach willkürlichem Definieren oberer und unterer Grenzwerte (Marker) konnten die Populationen anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften näher klassifiziert werden (Tabelle 3-11). Zum Vergleich wurde die konstitutive EGFP-Expression der Zelllinie A549-pEGFP-N1 und die Eigenfluoreszenz nicht-transfizierter A549 Zellen dargestellt (vergleiche 3.5.1). Die gezeigten Ergebnisse wurden mit Zellen des Zellklons (A549-RRM2b-EGFP, Klon 4.6) erzielt.

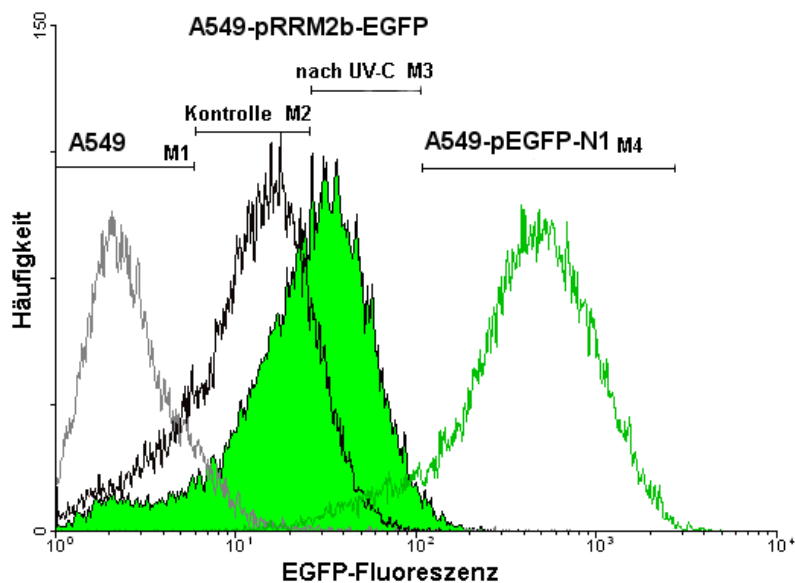


Abb. 3-61: FACS-Analyse der mit dem Vektor pRRM2b-EGFP stabil transfizierten A549 Zellen. 27 Stunden nach Bestrahlung zeigten die mit 20 J/m^2 UV-C bestrahlten Zellen (Marker 3) im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen (Marker 2) einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz. Histogramme nativer A549 Zellen (Marker 1, grau) und konstitutiv EGFP exprimierender Zellen der Zelllinie A549-pEGFP-N1 (Marker 4, grün) wurden zum Vergleich als Overlay dargestellt.

Tabelle 3-11: Angegeben ist die prozentuale Verteilung einer vitalen Zellpopulation von 20.000 analysierten Zellen in der FACS-Analyse innerhalb der definierten Markergrenzen.

| | | Marker 1 [%] | Marker 2 [%] | Marker 3 [%] | Marker 4 [%] |
|-------------------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A549 nicht transfiziert | | 80.8 | 17.6 | 1.45 | 0.14 |
| A549-pRRM2b-EGFP | Kontrolle | 19.0 | 65.9 | 14.9 | 0.15 |
| | UV-C 20 J/m^2 | 8.2 | 38.7 | 51.7 | 1.38 |
| A549-pEGFP-N1 | | 0.06 | 0.9 | 8.4 | 90.4 |

3.4.2.4. Visualisierung der EGFP-Fluoreszenz nach Bestrahlung

48 Stunden nach Bestrahlung mit UV-C wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder der rekombinanten Zellen mit einem für EGFP geeigneten Filterset aufgenommen. Abb. 3-62 zeigt die EGFP-Expression in den mit UV-C bestrahlten und unbestrahlten vitalen A549-RRM2b-EGFP Zellen. Die Aufnahmen zeigen einen dosisabhängigen Anstieg der EGFP-Fluoreszenz im Kern und Zytoplasma lebender Zellen nach Bestrahlung mit UV-C.

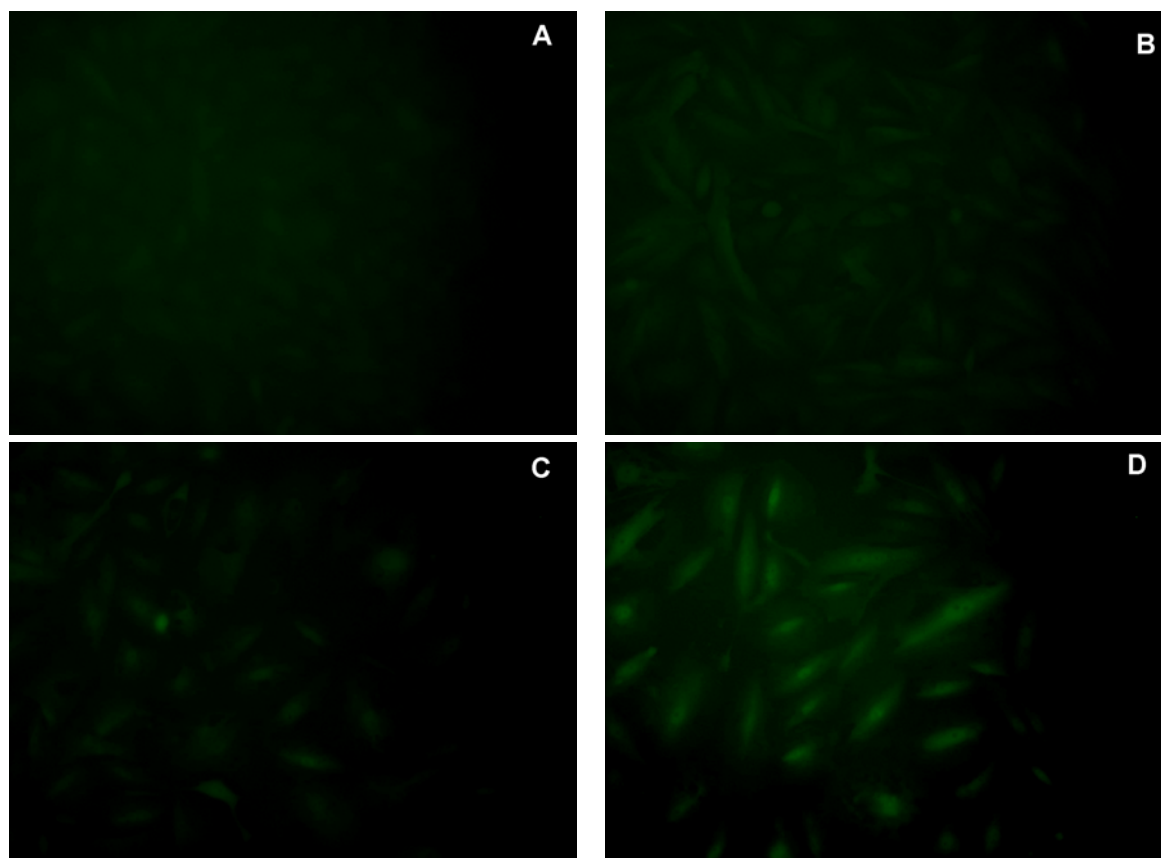


Abb. 3-62: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der EGFP-Expression der rekombinanten Zelllinie A549-RRM2b-EGFP. Die Fluoreszenzbilder wurden 48 Stunden nach Bestrahlung mit dem *Axiocvert 125* Mikroskop (Zeiss) unter jeweils gleichen Bedingungen aufgenommen: Objektiv 20x, Belichtungszeit 1000 ms. **A:** Zellen unbestrahlt **B:** 5 J/m² UV-C **C:** 10 J/m² UV-C und **D:** 20 J/m² UV-C

3.4.2.5. Untersuchung der Hintergrundfluoreszenz: Basisaktivität oder mögliche Antwort auf Stressinduktion?

Alle als induzierbar getesteten Klone zeigten eine eindeutige Hintergrundfluoreszenz die oberhalb der Eigenfluoreszenz nicht-transfizierter Klone lag. Bei Fehlen dieser Hintergrundfluoreszenz blieb die Induktion der Reporter-gen-Aktivität nach Bestrahlung stets aus. Um auszuschließen, dass genotoxische oder zytotoxische Faktoren unter Selektionsdruck die Ausbildung dieser Hintergrundfluoreszenz bedingen, wurden die Zellen mit oder ohne Zugabe des Aminoglykosid Antibiotikums G418 über die jeweils angegebenen Zeiten inkubiert und einer FACS Analyse zugeführt (Abb. 3-63). Weder der Zeitraum zwischen Aussaat und Analyse der Zellen, noch das Wachstum in Selektionsmedium zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Hintergrundfluoreszenz. Es ist vermuten, dass diese Hintergrundfluoreszenz das Resultat einer vorhandenen Basisaktivität des p53R2 Gens darstellt.

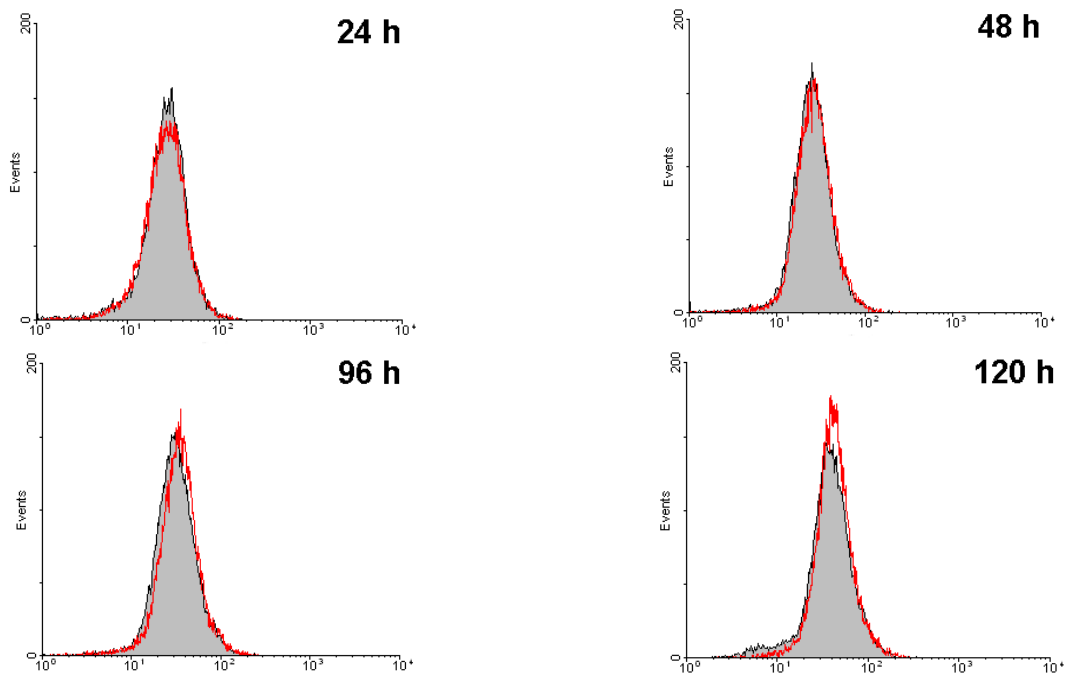


Abb.3-63: FACS Analyse zur Untersuchung der Hintergrundfluoreszenz. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium (Histogramm grau) oder in Selektionsmedium mit Geneticin (G418) (Overlay rot) kultiviert und die Fluoreszenz nach unterschiedlichen Inkubationszeiten analysiert.

3.4.2.6. Bestimmung der Insertionshäufigkeit des klonierten Vektors in der rekombinanten Zelllinie A549-RRM2b

Um Aussagen über die Insertionshäufigkeit der Fremd-DNA treffen zu können, wurde die Kopienzahl des Vektors pRRM2b-EGFP im Genom der rekombinanten Zelllinie A549-RRM2b (Klon 4.6) mittels quantitativer Real Time PCR untersucht. Die verwendeten Primer amplifizieren ein 109 bp großes Fragment aus dem EGFP-Gen des transfizierten Vektors pRRM2b-EGFP. Zur Quantifizierung der Kopienzahl wurde Plasmid-DNA des Vektors pRRM2b-EGFP zunächst über die Restriktionsschnittstelle NotI linearisiert, die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und die Kopienzahl der linearisierten Vektor-DNA nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge [Moleküle / } \mu\text{l]} = K_{\text{AVO}}[\text{Moleküle/ mol}] \times \text{Konzentration [g/}\mu\text{l}] / \text{MW [g/mol]}$$

K_{AVO} : Avogadro-Konstante (6×10^{23} Moleküle / mol); MW: Molekulargewicht je Basenpaar (Länge des Vektors + Insert) $\times 660$ g /mol / bp)

Genomische DNA wurde aus Zellen der Linie A549-RRM2b mit definierter Zellzahl isoliert, mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten und die Konzentration der DNA Fragmente spektrophotometrisch bestimmt. Neben genomischer DNA unterschiedlicher Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe linearisierter Vektor-DNA von $2,09 \times 10^7$ (100 pg) bis 2,09 Moleküle (10 ag) in die qRT-PCR Analyse eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden Wasser und genomische DNA nativer A549 Zellen in die Analyse miteinbezogen. Beide Negativkontrollen zeigten keine Amplifikat.

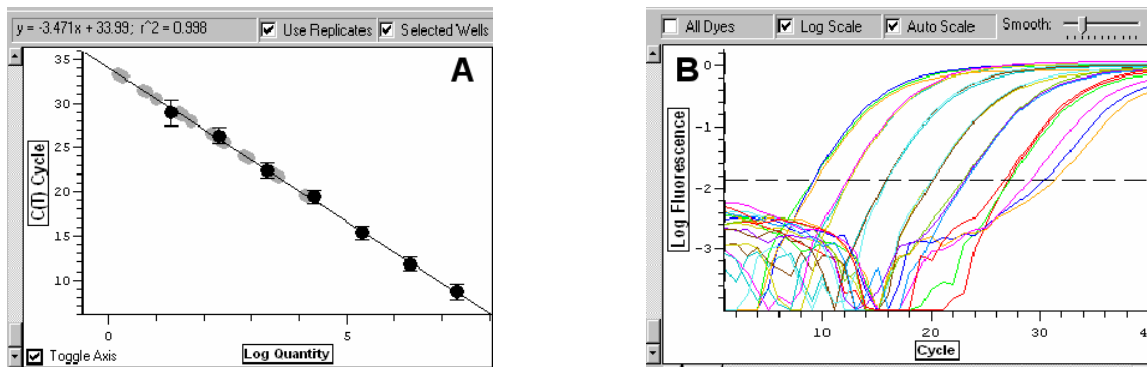


Abb. 3-64: **A:** Regressionsgerade der Verdünnungsreihe linearisierter Vektor-DNA (schwarze Punkte) und Darstellung der CT-Werte genomischer DNA (graue Punkte). Für die Erstellung der Regressionsgeraden wurde der Logarithmus der Templatekonzentration gegen die Zyklenzahl aufgetragen. **B:** Logarithmische Darstellung der Standardverdünnungsreihe des Vektors pRRM2b-EGFP im Bereich von $2,09 \times 10^7$ bis 2,09 Molekülen.

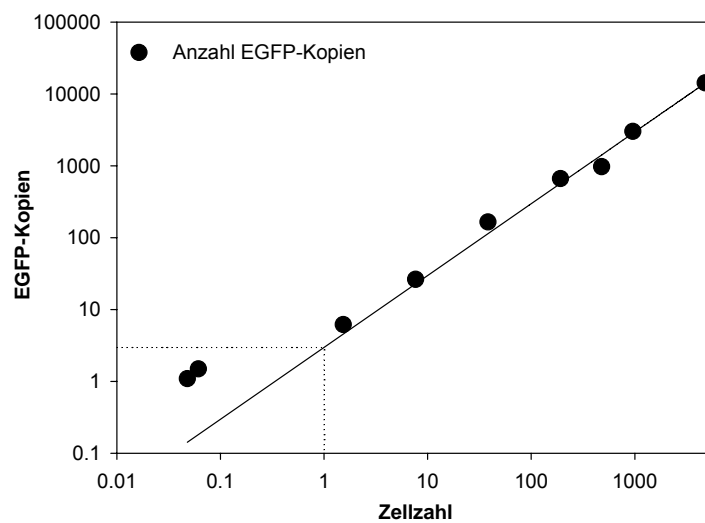


Abb. 3-65: Für die Berechnung der mittleren Kopienzahl pro Zelle wurde eine Regressionsanalyse für alle Daten durchgeführt, deren x-Werte >1 waren. (Gleichung: $Y = ax + b$, wobei $b = -16.11$; $a = 2.97$; $r^2 = 0.9986$). Die mittlere Kopienanzahl, berechnet aus der Steigung der Regressionsgeraden beträgt 3.

Zur absoluten Quantifizierung genomischer DNA mit unbekannter Kopienzahl wurde über die Software des Opticon2 Thermocyclers eine Standardkurve der logarithmierten CT-Werte der Plasmid-Verdünnungsreihe mit bekannter Startkopienzahl erstellt (Abb. 3-64). Durch Interpolation der CT-Werte genomischer DNA konnte so die Startkopienzahl der genomischen DNA ermittelt werden (Abb.3-65). Aus der Konzentration der genomischen DNA ($8,4 \mu\text{g}/40 \mu\text{l}$) wurde unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellzahl ($4,023 \times 10^5$ Zellen) der DNA-Gehalt einer einzelnen Zelle berechnet ($2,088 \times 10^{-11}\text{g}/\text{Zelle}$). Ausgehend von der ermittelten Kopienzahl pro ng genomischer DNA wurde die mittlere EGFP-Kopienzahl pro Zelle unter Berücksichtigung des DNA-Gehalts berechnet (Abb. 3-65). Die Kopienzahl pro Zelle, berechnet über die Steigung der Regressionsgeraden, beträgt im Mittel 3 Kopien (2.967 ± 0.042).

3.4.2.7. Nachweis der Spezifität des induzierbaren Vektorsystems

Nach eingehender Untersuchung der Sensitivität des *in-vivo*-Testverfahrens sollte die Spezifität durch Behandlung der induzierbaren Zellen mit dem p53-Inhibitor Pifithrin (PFT) gezeigt werden.

Nach einer Vorbehandlung mit Pifithrin (20 μM , gelöst in DMSO) über 20 Stunden wurden die Zellen mit 20 J/m^2 UV-C bestrahlt und anschließend bis zur Auswertung in der FACS-Analyse mit PFT-haltigem Wachstumsmedium inkubiert. Dem Wachstumsmedium der Kontrollpopulation wurde die gleiche Menge DMSO (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) zugesetzt. Während die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrollzellen im Verhältnis zur unbestrahlten Zellpopulation über den untersuchten Zeitraum von 75 Stunden einen deutlichen und nachhaltigen Anstieg der Fluoreszenz zeigten, wiesen die mit PFT-behandelten Zellen einen geringeren Anstieg des Reporterproteins auf. Nach Erreichen eines Maximums 40 Stunden nach Bestrahlung näherten sich die Fluoreszenzwerte Pifithrin-behandelter Zellen den Basalwerten an (Abb. 3-66).

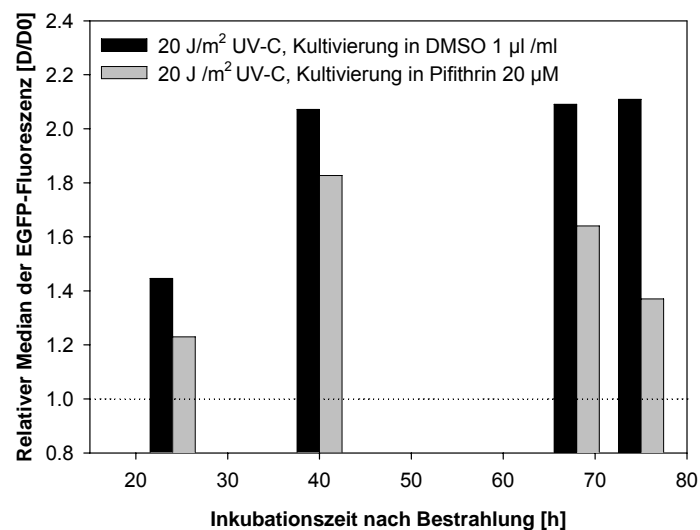


Abb. 3-66: Nach UV-C vermittelter Induktion des RRM2b-Genreportersystems wiesen die mit dem p53 Inhibitor Pifithrin (20 μM gelöst mit DMSO) behandelten A549-pRRM2b-EGFP-Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation (Lösungsmittelkontrolle DMSO, 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) einen deutlich geringeren Anstieg der relativen Fluoreszenz (Medianwerte) in der FACS-Analyse auf.

3.4.2.8. Analyse der Induzierbarkeit des Reporter-Vektor-Systems

3.4.2.8.1. Induktion durch Behandlung mit DNA-Strangbruch induzierenden Agentien

Als Induktor der p53R2 Genexpression wurden neben ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung das zytostatisch wirksame Antibiotikum Doxorubicin (*Streptomyces peucetius* und *caesius*) gewählt. Doxorubicin (Adriamycin®), ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthracyclin-Antibiotika, führt zu DNA- und RNA-Strangbrüchen mit Bildung freier Radikale und Brückenbildung zwischen zwei DNA-Basen. Am empfindlichsten reagieren Zellen der S-Phase des Zellzyklus auf die Substanz. Der Wirkungsmechanismus wird von zwei Hauptmechanismen getragen: Doxorubicin interkaliert zwischen zwei benachbarte Nukleotide in der DNA, blockiert dadurch die Transkription und hemmt darüber hinaus die Topoisomerase II als Schlüsselenzym der DNA-Synthese. Die optimale Konzentration zur Induktion des Vektorsystems wurde mit Hilfe des MTT-Tests ermittelt (Daten nicht gezeigt) und anschließend auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Mittels Western Blot wurde die Induzierbarkeit des p53R2 Proteins nach Behandlung mit Adriamycin® überprüft. Die Proteine wurden nach Pulsbehandlung mit Adriamycin® unterschiedlicher

Konzentration zu den angegebenen Zeiten isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem gegen p53R2 gerichteten polyklonalen Antikörpern inkubiert (Abb. 3-67). Während eine Dauerbehandlung mit niedrigen Dosen die p53R2-Proteinexpression nicht signifikant beeinflusste, führten Pulsbehandlungen mit Konzentrationen von 0,5 bis 1 μM Adriamycin® über 2 Stunden zu einer Steigerung der p53R2-Proteinmenge. Für weitere Induktionsversuche wurde Adriamycin® in einer Konzentration von 0,5 μM bis 1 μM über 2 Stunden verwendet.

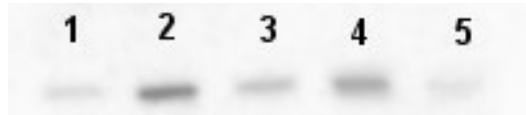


Abb. 3-67: Western Blot Analyse der p53R2 Expression nach Behandlung mit Adriamycin®. A549 Zellen wurden entweder nicht (Spur 1) oder mit 0,5 μM über 2 Stunden (Spur 2); 1 μM über 1 Stunde (Spur 3); 1 μM über 2 Stunden (Spur 4) und 0,5 μM über 22 Stunden (Spur 5) behandelt.

Zum Nachweis der Induzierbarkeit des rekombinanten Vektorsystems über DNA-Strangbruch auslösende chemische Agentien wurden die mit dem Vektor RRM2b-EGFP stabil transfizierten Zellen über zwei Stunden mit dem Chemotherapeutikum Adriamycin® behandelt. Nach Austausch des Mediums gegen normales Wachstumsmedium wurde die Fluoreszenzentwicklung über eine FACS-Analyse relativ zur EGFP-Expression der unbehandelten Zellpopulation zu den angegebenen Zeiten vorgenommen (Abb. 3-68).

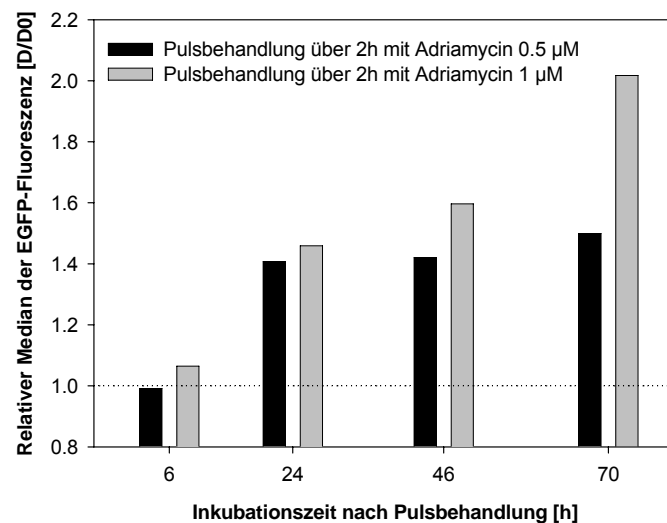


Abb. 3-68: Induktion des RRM2b-Vektorsystems mit dem DNA-Strangbruch induzierenden Agens Doxorubicin (Adriamycin®). Dargestellt ist der Median der EGFP-Fluoreszenz relativ zur unbehandelten Kontrolle nach Pulsbehandlung mit Adriamycin®.

3.4.2.8.2. Induzierbarkeit durch Strahlung unterschiedlicher Qualität

Neben der bereits gezeigten UV-C vermittelten Strahlenantwort wurden die rekombinanten Zellen verschiedenen Bestrahlungsprotokollen unterworfen. Um den Anstieg der EGFP-Fluoreszenz über die Zeit nach Exposition mit ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurden die Zellen **Röntgenstrahlung** im Dosisbereich von 0,5 bis 16 Gy ausgesetzt und die Entwicklung der EGFP-Fluoreszenz bis 96 Stunden nach Bestrahlung über eine FACS-Analyse untersucht. Es konnte

eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenz bestrahlter Zellen beobachtet werden. Die Histogramme der EGFP-Fluoreszenz bestrahlter A549-RRM2b Zellen sind in Abbildung 3-69 dargestellt.

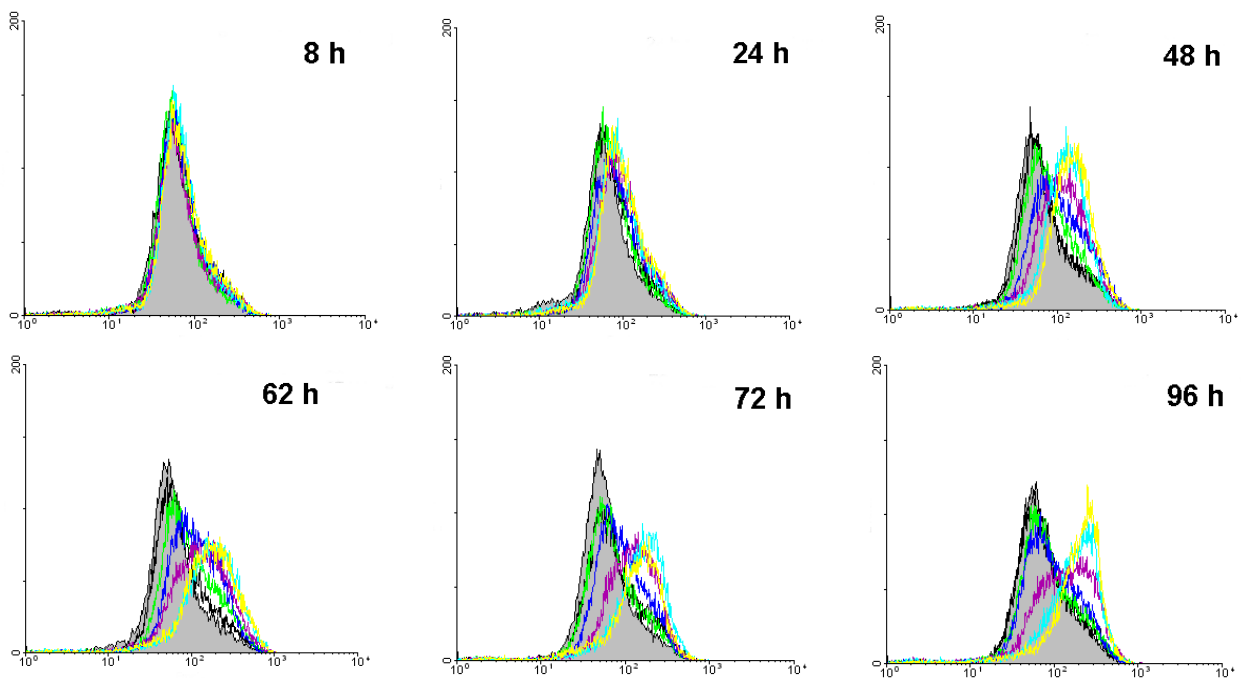


Abb. 3-69: Histogramme bestrahlter (farbiger Overlay) und unbestrahlter A549-RRM2b-Zellen (grau). Dargestellt ist die Anzahl der Ereignisse (Ordinate) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (Abszisse). Legende Overlay: schwarz =0,5 Gy; grün =1 Gy; blau =2 Gy; lila =4 Gy; türkis =8 Gy; gelb =16 Gy Röntgenstrahlen.

Die im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzsignale sind innerhalb einer Häufigkeitsverteilung um einen Mittelwert gestreut. Zur Auswertung der Fluoreszenzintensität können sowohl das geometrische Mittel, das arithmetische Mittel als auch der Median dieser Verteilung herangezogen werden. Die Verteilungsform wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test analysiert und als nicht normalverteilt gefunden, wonach die Histogramme mathematisch optimal durch den Median ihrer Fluoreszenzsignale beschrieben werden können. Im Vergleich mit dem arithmetischen Mittel einer Normalverteilung zeigt der Median bei der statistischen Auswertung nicht normalverteilter Messwerte eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Ausreißern. Abbildung 3-70 zeigt den Median der EGFP-Fluoreszenz für die bestrahlte Zellpopulation in Relation zur unbestrahlten Kontrollpopulation. Für Strahlendosen ab 2 Gy konnte bis 62 Stunden ein dosisabhängiger, kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenz nach Bestrahlung beobachtet werden. Nach Bestrahlung mit Dosen von 0,5 und 1 Gy ist ein Anstieg bis 36 Stunden nach Bestrahlung zu verzeichnen.

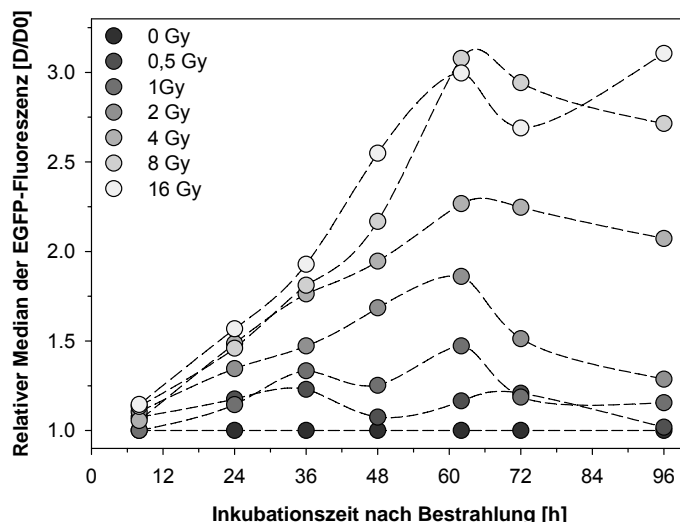


Abb. 3-70: Zeitkinetik der EGFP-Fluoreszenzentwicklung nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Dargestellt ist der Median der EGFP-Expression bestrahlter A549-RRM2b-EGFP Zellen in Relation zur EGFP-Expression der unbestrahlten Kontrollzellen (D/D_0).

Die Signifikanz des Unterschieds zwischen der EGFP-Fluoreszenzentwicklung der Kontrollpopulation und der bestrahlten Zellen wurde über den in die CellQuest™ Software implementierten Kolmogorov-Smirnov-Test analysiert. Der gefundene Unterschied wird als Zahlenwert über den D-Wert der K-S Statistik ausgedrückt. Das Ergebnis der statistischen Untersuchung ist exemplarisch in Abbildung 3-71 dargestellt. In Abhängigkeit von der Höhe der applizierten Dosis erfolgt ein Anstieg des D-Wertes als Ausdruck der statistisch untersuchten maximalen Differenz zwischen den Histogrammen der Kontroll- und Behandlungspopulation im Dosisbereich ≥ 2 Gy bis zu 62 Stunden nach Strahlenexposition. In allen Untersuchungen waren die Ergebnisse hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

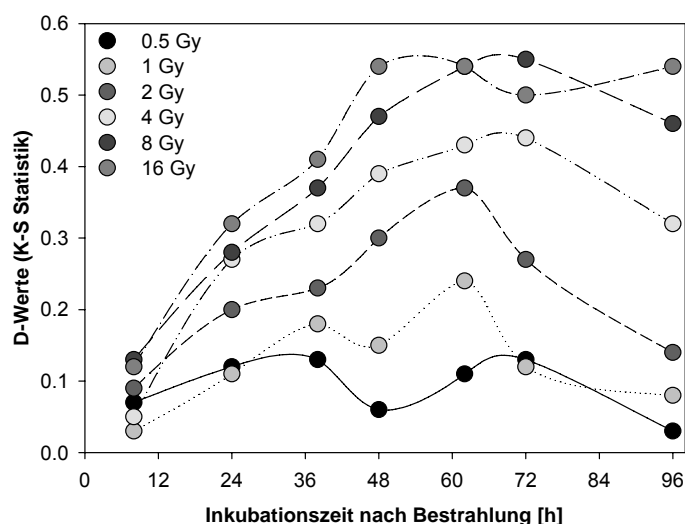


Abb. 3-70: Exemplarische Darstellung der D-Statistik als Wert für die maximale absolute Differenz zwischen den zwei normalisierten kumulativen Frequenzverteilungen (Histogramme der Kontrollpopulation gegen die bestrahlte Population nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in der Zelllinie A549-RRM2b-EGFP Klon 4.6).

Um die Eignung des entwickelten Reporter-Vektor-Systems unter Simulation von Komponenten der Weltraumstrahlung zu testen, wurden die rekombinanten Zellen einer Bestrahlung mit **schwe-**

ren Ionen ausgesetzt. Zur Analyse der EGFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer wurden die Zellen nach der angegebenen Inkubationszeit nach Bestrahlung fixiert und anschließend analysiert. Nach Exposition mit Kohlenstoff-Ionen (75 MeV/amu; LET 29,98 keV/μm) konnte ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 3-71) in Relation zur unbestrahlten Kontrollpopulation beobachtet werden. Bei Bestrahlung mit Argon-Ionen (95 MeV/amu, LET 232.2 keV/μm) konnte eine wesentlich größere Schadensantwort des induzierbaren Zellsystems nachgewiesen werden (Abb. 3-72).

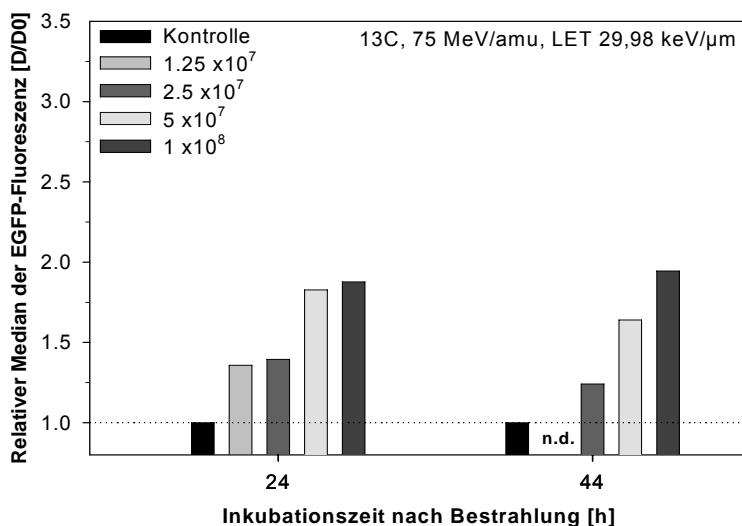


Abb. 3-71: Relativer Median der EGFP-Fluoreszenz in A549-pRRM2b-EGFP Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen im Fluenzbereich von $1,25 \times 10^7$ Teilchen/ cm² ($\approx 31,25$ Kerntreffer) bis 1×10^8 Partikel/ cm² (≈ 125 Kerntreffer). (n.d.= aus technischen Gründen nicht durchgeführt)

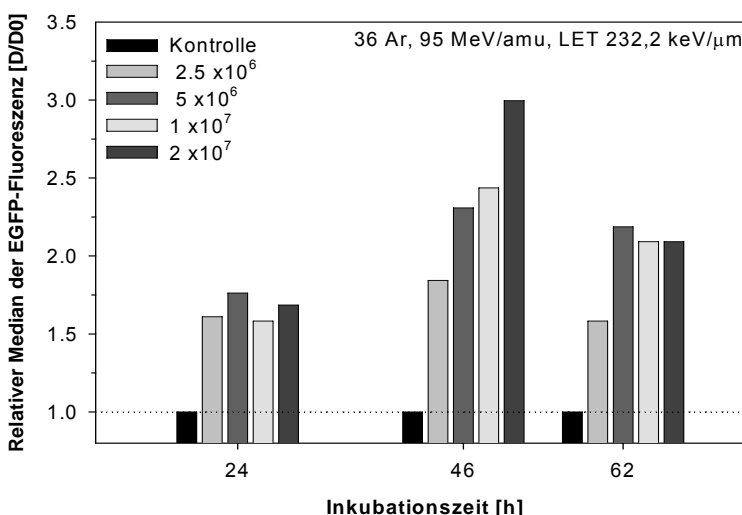


Abb. 3-72: Relativer Median der EGFP-Fluoreszenz bestrahlter A549-pRRM2b-EGFP Zellen nach Exposition mit Argon-Ionen im Fluenzbereich von $2,5 \times 10^6$ Teilchen/ cm² (≈ 7 Kerntreffer) bis 2×10^7 Partikel/ cm² (≈ 56 Kerntreffer).