

4. Diskussion

4.1. Entwicklung von Testsystemen für den Einsatz auf der ISS

Die Durchführung von Experimenten im Weltraum ist nicht nur sehr aufwändig, sondern auch einzigartig, da auf Wiederholungen der Experimente in der Regel verzichtet werden muss. Eine sorgfältige Planung in Bezug auf Vorbereitung, Durchführung und Nachbereitung ist Voraussetzung. Schon beim Design der Experimente sind Grenzen gesetzt: Molekularbiologische Standarduntersuchungen, wie sie in terrestrischen Labors durchgeführt werden, sind im Weltraumlabor nicht möglich, was eine Modifikation bestehender Versuchsansätze notwendig macht.

Seit dem Absturz der Raumfähre *Columbia* (2003) wurde die Häufigkeit der Expeditionen zur ISS drastisch reduziert. Versorgungsflüge mit ATV (*Automated Transfer Vehicle*), einem selbständigen Überführungsfahrzeug der europäischen Raumfahrtagentur ESA, sollen ab 2007 zur Lösung logistischer Probleme im Bereich der Probenrückführung biologischer Experimente beitragen. Bis dahin aber werden weitestgehend automatisierte Experimente favorisiert, die ohne Interaktion des Astronauten ablaufen. Eine solche Automatisierung kann durch den Einsatz einfacher, auf Reporterexpression basierender Zellexperimente erreicht werden. Die im Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR Köln entwickelten Weltraumexperimente *CERASP* und *Cellpath* sollen unter Verwendung gentechnisch veränderter, fluoreszierender Zellen in eigens dafür konstruierter Hardware auf der Internationalen Raumstation durchgeführt und mit computerunterstützter Bildverarbeitung in Echtzeit analysiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Genreporterassays zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität für das Experiment *Cellpath*. Das zu entwickelnde Reporter-Vektor-System sollte auf DNA-schädigende Noxen, die Bestandteile der Weltraumstrahlung simulieren, zur Induktion des vektoreigenen Reportergens führen und damit eine modifizierte Genexpression direkt in der Säugerzelle visualisieren.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Suche nach einem Kandidatengen, dessen Expression nach Exposition mit Strahlung unterschiedlicher Qualität deutlich herauf reguliert wird. Gleichzeitig sollte eine Zelllinie gefunden werden, deren Transkriptom eine Induktion dieses Kandidatengens nach Bestrahlung zeigt und die darüber hinaus für die speziellen Kultivierungsbedingungen im Weltraumlabor geeignet ist.

4.1.1. Das *Green Fluorescent Protein* als Reporter gen

Ein Genreporterassay ist eine indirekte Nachweismethode, ähnlich wie auch die auf Antikörpern basierenden ELISA-Tests. Ein solcher Umweg muss immer dann in Kauf genommen werden, wenn die Auswirkungen der interessierenden physiologischen oder zellulären Veränderung zu schwach sind, um direkt gemessen zu werden oder - wie im Falle von Weltraumexperimenten -

die Untersuchungen eigenständig, ohne entsprechende Interaktion eines Astronauten im Analysesystems ablaufen sollen. Unter den Reporterproteinen ist das verwendete *grün fluoreszierende Protein* (GFP) der Tiefseequalle *Aequorea victoria* das einzige bekannte fluoreszierende Protein, dessen Chromophor als Abschnitt der Peptidkette auch Teil des Proteins ist und daher ohne zusätzliche Substratzugabe detektiert werden kann (Übersicht in Tsien, 1998). Ein großer Vorteil für die Nutzung von GFP als Reporter gen liegt in seiner hohen Stabilität, die in seinem dreidimensionalen Aufbau begründet ist (Abb. 4-1). Die Abschirmung des Chromophors ist so vollkommen, dass klassische Fluoreszenzquencher wie molekularer Sauerstoff und Halogenide nahezu keinen Einfluss auf die Fluoreszenz haben. Nachteilig hingegen ist die post-translationale Bildung des Chromophors, die erst zwei bis drei Stunden nach der Synthese des Proteins entsteht.

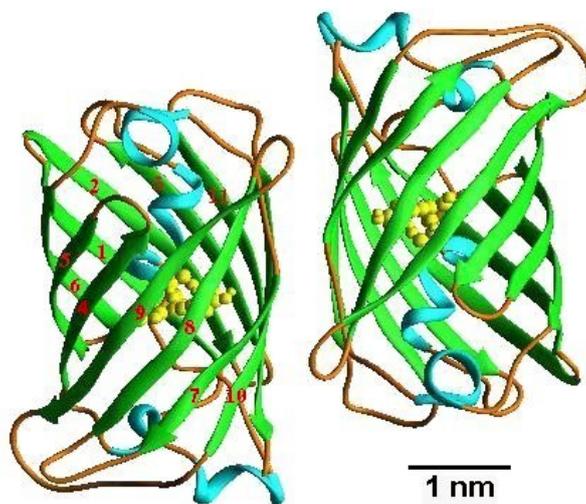


Abb. 4-1: β -can Struktur des GFP aus *Aequorea victoria*. Die grünen Pfeile symbolisieren so genannte β -Faltblätter, deren Anordnung eine zylinderförmige Struktur bilden. Im Inneren des Zylinders befindet sich das Chromophor (gelb), eingebettet in α -Helices (blau) und Verbindungsstränge (braun).

Zudem eignet sich das an Säugerzellen adaptierte EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) als Reportermolekül für *in vivo* und *in vitro* Studien von Zellprozessen ohne vorherige Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und kann deshalb direkt fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Zellen dargestellt werden.

In der Entwicklung von biologischen Testsystemen zur Untersuchung zellulärer Vorgänge nach Bestrahlung unter Weltraumbedingungen hat sich EGFP als Reporter gen bewährt (Palm, 2002; Hellweg, 2003) und wird im Experiment *CERASP* als eines der ersten Experimente nach Inbetriebnahme des *Biolab* auf der Internationalen Raumstation zur Anwendung kommen (Hellweg *et al.*, 2006; Baumstark-Khan *et al.*, 2005a; 2005b).

Eine quantitative Untersuchung der fluoreszierenden Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der genauen Analyse der Fluoreszenzintensität, die mit bloßem Auge nicht möglich ist. Selbst geringe Schwankungen in einer Population von 20.000 Zellen konnten so erfasst werden und in einer statistischen Analyse ausgewertet werden.

Die Messung der Fluoreszenz wird im Weltraumexperiment von einer digitalen Bildverarbeitung in Echtzeit übernommen werden. Zur Abschätzung der Lebensfähigkeit der Zellen unter Weltraumbedingungen wurde ein Vitalitätstest (3.4.1) in A549-Zellen entwickelt. Die Fluoreszenzentwicklung stabil transfizierter, konstitutiv EGFP-exprimierender Zellen wird zur Erstellung einer Dosis-Effektbeziehung nach Strahlenexposition herangezogen werden (Abb. 3-57).

4.1.2. Charakterisierung der Zelllinien

Innerhalb einer Reihe Reparatur-profizienter, menschlicher Zelllinien wurde eine Linie gesucht, die eine deutliche Hochregulierung eines in die Strahlenantwort involvierten Kandidatengens nach Exposition mit Strahlung unterschiedlicher Qualität zeigt. Die gesuchte Zelllinie sollte zudem den Anforderungen bezüglich der speziellen Kultivierungsbedingungen im Weltraumlabor genügen. Die im gefrorenen Zustand auf die Raumstation gebrachten Zellen werden in einem automatisierten, Pumpen-gesteuerten Flüssigkeitstransportsystem in eigens für diese Applikation konstruierten Experimentcontainer in Kultur gebracht werden. Vorexperimente im Rahmen des Weltraumexperiments *CERASP* haben deutlich gezeigt, dass zu große Adhäsionskräfte zwischen den Zellen einer automatisierten Zellaussaat entgegenstehen. Alle untersuchten Zelllinien ließen sich problemlos nach Trypsinbehandlung vereinzeln – mit Ausnahme der MCF-7 Zellen. Anstelle einer Kontaktinhibition bildeten diese Zellen bei nahezu konfluentem Wachstum Zellaggregate mit sehr hoher Zell-zu-Zell-Adhäsion aus. Auf der anderen Seite zeigten die MCF-7 Zellen eine verringerte Adhäsionsfähigkeit auf dem Boden der Kulturgefäße, wodurch es im Umgang mit dieser Linie immer wieder zum partiellen Ablösen größerer Bereiche des Zellrasens kam.

Das **Wachstumsverhalten** zeigte keine gravierenden Unterschiede zwischen den Zelllinien. Innerhalb einer Passagedauer von sieben Tagen lagen die Verdopplungszeiten mit 18,3 Stunden (AGS) bis 26,6 Stunden (MCF-7) in einem vergleichbaren Bereich.

Hinsichtlich des **strahlenbiologischen Verhaltens** wurden individuelle Empfindlichkeiten der Zelllinien in Bezug auf Strahlung unterschiedlicher Qualität gefunden. Die Überlebenskurven nach Bestrahlung mit locker ionisierenden Röntgenstrahlen zeigten in ihrem Verlauf im Bereich niedriger Dosen eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter, während die Kurven nach Bestrahlung mit dicht ionisierender Strahlung (hohes LET) einen rein exponentiellen Verlauf ohne Ausbildung einer Schulter aufwiesen. Die Bildung einer Schulter nach Exposition mit locker-ionisierender Strahlung ist im Wesentlichen auf Reparaturprozesse zurückzuführen, die bei dicht-ionisierender Strahlung aufgrund der Komplexität der Schäden nicht oder nur eingeschränkt stattfinden.

Mit Ausnahme der AGS Zellen zeigten die permanenten Zelllinien eine im Vergleich zu Fibroblasten geringere Strahlensensitivität in Bezug auf locker- (Röntgen) und nicht-ionisierende Strahlung (UV-C Strahlung). Das zelluläre Überleben nach Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung wurde nur in der Zelllinie A549 untersucht und mit den im Weltraumexperiment *CERASP* verwendeten HEK-Zellen verglichen. Beide Linien zeigten nach Bestrahlung mit dicht-

ionisierender Strahlung vergleichbare Überlebensfraktionen bei einem rein exponentiellen Kurvenverlauf. Im Laufe der Arbeiten zeigte sich, dass die Lungenepithelzelllinie A549 alle Anforderungen an eine geeignete Zelllinie für ein Weltraumexperiment erfüllt. Weiterführende strahlenbiologische Experimente zur Untersuchung der Reparaturfähigkeit und der Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung wurden aus diesem Grund nur in dieser Zelllinie durchgeführt.

Als Grundlage für die Untersuchung der Reparaturfähigkeit wurde die Anzahl primärer Einzel- und Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung untersucht. Die Ergebnisse der **FADU-Analyse** zeigten eine exponentiell mit der Dosis abnehmende Menge intakter DNA. Obwohl die Anzahl der pro Gy induzierten Doppelstrangbrüche in der DNA diploider Säugerzellen nur wenig variiert, ergab der Verlauf der Regressionsgeraden zwei Kurvenscharen unterschiedlicher Steigung. Dies wird auf den unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zelllinien zurückgeführt. Dabei wiesen die Zelllinien mit einem Ploidiegrad von nahezu triploid (A549 = hypotriploid; MCF-7 = hypertriploid) und einer mittleren Kernfläche von $247,1 \mu\text{m}^2$ (A549) bzw. $278,3 \mu\text{m}^2$ (MCF-7) einen höheren Anteil intakter DNA auf als die vergleichsweise kleineren, nahezu diploiden Zellen (AGS = hyperdiploid; Kernfläche $145,2 \mu\text{m}^2$; NHF = diploid; Kernfläche $77,3 \mu\text{m}^2$). Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Ploidiegrad und der Größe der Zellen kann das initiale Schadensmaß als vergleichbar angesehen werden.

Zur Charakterisierung des Reparaturverhaltens nach Strahlenexposition wurde der zeitliche Verlauf der Reparatur von Doppelstrangbrüchen anhand einer immunfluoreszenzmikroskopischen Markierung der phosphorylierten Form des Histons H2AX (γ -H2AX) untersucht. Die Abnahme der Anzahl der Foci über die Zeit wird allgemein durch Reparaturprozesse erklärt. In unbestrahlten Kontrollzellen zeigte statistisch gesehen jede 25. Zelle ein S-Phase bedingtes γ -H2AX-Signal. 10 Minuten nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen wurde ein initialer Schaden von $37 (\pm 12,5)$ Doppelstrangbrüchen pro Zellkern detektiert. Die Reparaturkinetik zeigte eine schnelle Abnahme der induzierten Doppelstrangbrüche bis zwei Stunden nach Bestrahlung, der eine langsamere Phase der Reparatur folgte. Nach Rothkamm und Löbrich (2003) liegt das initiale Schadensmaß induzierter Doppelstrangbrüche in humanen Lungenfibroblasten (MRC-5) bei 36-39 Doppelstrangbrüchen pro Gray absorbierter Dosis. Sowohl die initiale Schadenshöhe als auch der Verlauf der Reparaturkinetik korrelieren gut mit publizierten Ergebnissen in anderen Reparatur-profizienten Zelllinien (Mahrhofer *et al.*, 2006; Van Veelen *et al.*, 2005).

Zur strahlenbiologischen Charakterisierung der A549 Zellen gehörte auch die Untersuchung der **Zellzyklusprogression nach Bestrahlung**. Aus den Analysen asynchron wachsender Zellen ist ersichtlich, dass sich Qualität und Kinetik der durch unterschiedliche Strahlenschäden induzierten Schadensantworten unterscheiden. Eine Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung führte nur zu einer temporär begrenzten Schadensreaktion mit einer Zunahme der G2-Population 10 Stunden nach Bestrahlung. Die weitere Analyse zeigte ein normales Zellzyklusprofil bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 48 Stunden. Bei Exposition mit höheren Dosen von 4 und 6 Gy Röntgenstrahlen konnte eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase und eine Zunahme

apoptotischer Ereignisse, ersichtlich an einer kontinuierlichen Zunahme von Zelltrümmern, nachgewiesen werden. Der Anstieg von Zelltrümmern spricht stark dafür, dass die Zellen durch Aktivierung des apoptotischen Programms eliminiert wurden. Die Mehrzahl der mit 6 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen war 43 Stunden nach Bestrahlung durch Apoptose vollständig eliminiert. Nach Dornreiter (2006) weisen schwer geschädigte Zellen auf einen „permanenten“ G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ hin, der jedoch bei B-Zell Lymphoma sowie Epithelzellen nicht vor der Aktivierung des zellulären Eliminierungsprogramms schützt, während die Arretierung in der G2-Phase bei subletalen Strahlendosen nur temporär erfolgt und zugunsten der Zellzyklusproliferation wieder aufgehoben wird.

Eine deutliche Zunahme der G2-Population konnte auch in der Analyse des Zellzyklus nach Exposition mit beschleunigten Argon-Ionen (Partikelrate 5×10^6 und 1×10^7 Teilchen/cm²) in A549-Zellen gefunden werden. Mit steigender Partikeldichte stieg der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase über die Zeit an. Gleichzeitig nahm die Anzahl der Zellen in der G0/G1- und S-Phase ab. Die Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung bzw. Argon-Ionen zeigte, dass in Abhängigkeit der Schwere des DNA-Schadens einerseits Mechanismen zur Induktion von Kontrollpunkten und andererseits Mechanismen zur Aktivierung der Apoptose eingeleitet werden. Tumorzellen verfügen darüber hinaus über Mechanismen, mit deren Hilfe sie sich der Apoptose entziehen. Dieses als Polyploidisierung beschriebene Phänomen, das mit einer Entkopplung von S-Phase und Mitose einhergeht, ist in der FACS-Analyse an einem DNA-Gehalt größer als 4n erkennbar und wurde 36 Stunden nach Schwerionen-Bestrahlung gefunden. Die strahleninduzierte Polyploidisierung korreliert mit der genetischen Instabilität vieler Tumorzellen und verschafft schwer geschädigten Zellen einen Überlebensvorteil.

Neben dem strahlenbiologischen Verhalten war die durch die Methode der quantitativen Real-Time RT-PCR identifizierte **Genexpressionsänderung nach Bestrahlung** das primäre Entscheidungskriterium für die Wahl einer geeigneten Zelllinie zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität. Auch unter diesem Gesichtspunkt erwies sich die epitheliale Lungenzelllinie A549 als geeigneter Kandidat. Die Ergebnisse der qRT-PCR Experimente zeigten auch, dass Fibroblasten eine zu geringe Modulation der Genexpression nach Bestrahlung aufweisen. Darüber hinaus eignen sich Fibroblasten nur bedingt für die Etablierung einer rekombinanten Zelllinie, da sie zum einen mit wesentlich geringerer Effizienz Fremd-DNA aufnehmen und zum anderen Alterungsprozessen unterliegen, die mit einer Reduzierung der Wachstumsrate und einer Veränderung des Phänotyps einhergehen.

4.1.3. Screening potentieller Markergene zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität

Strahlung ist ein äußerst komplexer Stimulus, der in der Lage ist, eine Vielzahl molekularer Zielstrukturen direkt oder indirekt über Reparaturprozesse zu beeinflussen. Zellen verfügen über eine Vielzahl von Mechanismen, um die Aktivität von Genen und Genprodukten zu regulieren.

Diese müssen nicht unbedingt auf der hier untersuchten mRNA-Ebene liegen. Neben der transkriptionellen Aktivierung, die wohl die wichtigste Form der Regulation darstellt (Übersicht in Lewin, 2000), existieren eine Vielzahl zusätzlicher Regulationsmöglichkeiten in eukaryontischen Zellen. Die Aktivierung oder Deaktivierung von Proteinen durch Phosphorylierung spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation in Säugerzellen. So wird beispielsweise das Tumorsuppressorgen p53 hauptsächlich durch Phosphorylierung aktiviert, die ebenfalls gezeigte transkriptionelle Aktivierung spielt dagegen eine untergeordnete Rolle (Colman *et al.*, 2000). Im Zuge von Signaltransduktionsketten werden eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinkinasen aktiviert.

Für die spezielle Fragestellung, d.h. für die Entwicklung eines indikativen Testsystems zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität, war die Untersuchung der Strahlenantwort auf transkriptioneller Ebene Voraussetzung. Im ersten Teil der Arbeit sollten durch Einsatz der Macro-Array Technik strahleninduzierbare Gene identifiziert werden und die Ergebnisse mit unabhängigen Methoden wie der Northern Analyse und der quantitativen Real-Time RT-PCR verifiziert werden.

4.1.1.1 Screening Methoden zur Genexpressionsanalyse

Der Vorteil der Methode des **cDNA Arrays** liegt in der gleichzeitigen Untersuchung einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Hybridisierungsansatz. Wie bei allen Methoden, die sich mit vergleichenden Expressionsanalysen beschäftigen, werden die Daten biologischer Assays häufig durch nicht-biologische Faktoren, wie z.B. unterschiedlichen Hybridisierungs-Effizienzen zwischen zwei Arrays, beeinflusst. Um dennoch einen zuverlässigen Vergleich zwischen verschiedenen Arrays durchführen zu können, müssen diese Faktoren durch Normalisierung minimiert werden. Für die Wahl des Korrekturfaktors stehen generell drei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: der Signalmittelwert aller Hybridisierungssignale, der Signalwert eines Referenzgens oder der Signalwert mehrerer Referenzgene. Eine Normalisierung gegen Referenzgene (Haushaltsgene) setzt voraus, dass deren Expression unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht beeinflusst wird. In der Macro-Array-Analyse nach Bestrahlung mit Argon-Ionen in MCF-7 Zellen zeigte nur das Haushaltsgen *GAPDH* in allen untersuchten Proben eine konstante Expression und wurde daher zur Normalisierung der Daten herangezogen. Die Hybridisierungsintensitäten von *Ubiquitin* und *Beta Actin* zeigten in den Arrays bestrahlter Proben eine deutliche Variabilität und wurden daher bei der Normalisierung nicht berücksichtigt.

In Anbetracht der kontrovers geführten Diskussionen über die Aussagekraft Array-generierter Daten, beispielsweise bezüglich der notwendigen Anzahl an Wiederholungen (Lee *et al.*, 2000) oder den unterschiedlichen Normalisierungsmethoden (Kepler *et al.*, 2002; Kroll und Wöfl *et al.*, 2002) war eine Verifizierung der Ergebnisse mit unabhängigen Methoden unbedingt notwendig. Verlässliche statistisch abgesicherte Analysen werden mit technischen bzw. biologischen

Wiederholungen der Experimente erzielt. Da dies aufgrund der experimentellen Limitierung, die eine Bestrahlung an Fremdanlagen mit sich bringt, nicht vorgenommen werden konnte, sind die erzielten Array-Daten als das zu sehen, was sie sind: Ein initiales Screening, das die Möglichkeit eröffnet, eine große Anzahl potentieller Kandidatengene innerhalb eines veränderten Transkriptoms nach Bestrahlung zu identifizieren. Die Nachweisempfindlichkeit der Array-Technologie ist gegenüber den klassischen Expressionsnachweismethoden geringer, was daher zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Zahl der regulierten Gene und deren Regulationshöhe führen kann.

Die in der Array-Analyse für das Reparaturgen p53R2 erzielten Ergebnisse wurden mittels **Northern Analyse** verifiziert. Während die Analyse der Array-Daten zwei Stunden nach Bestrahlung eine Reprimierung der Genexpression zeigten, wiesen die Hybridisierungsintensitäten in der Northern Analyse eine eindeutige Zunahme der Signalintensität im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf. Die Analyse zwölf Stunden nach Bestrahlung zeigte in beiden Nachweismethoden eine übereinstimmende Induktion der p53R2-Genexpression.

Die Methode der **quantitativen Real Time RT-PCR** basiert auf dem gleichen Konzept, das der Array-Methode zugrunde liegt - der Detektion der Transkripthöhe eines Gens nach Umschreiben in eine cDNA. Dieser enzymatische Schritt kann mit unterschiedlicher Effizienz in den zu vergleichenden Proben erfolgen. Ursächlich sind hierbei Qualitätsunterschiede der verschiedenen RNA-Präparationen, Messungengenauigkeiten in der Quantifizierung der RNA-Proben und ein Kontaminationen der RNA-Proben mit inhibierender, genomischer DNA. Alle diese Faktoren wirken sich negativ auf die Amplifikationseffizienz der Reaktion aus. Bei der in dieser Arbeit angewendeten *effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung* wird die Genexpression eines Zielgens auf ein oder mehrere nicht regulierte Referenzgene bezogen (Pfaffl, 2001). Die Vorteile dieser Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da die oben genannten Fehlerquellen gleichermaßen Zielgenen als auch Referenzgen(e) betreffen. Ist das Referenzgen nicht reguliert, so weist die Analyse gleiche CT-Werte in behandelten und unbehandelten Proben auf. Demnach fällt das Referenzgen aus der Berechnung des relativen Genexpressionsunterschieds heraus und das Ergebnis ist nur vom Expressionsunterschied zwischen behandelten und unbehandelten Proben des Zielgens abhängig (siehe 2.3.12.2.9). In Abhängigkeit von der Strahlenqualität, der absorbierten Dosis und mit zunehmender Inkubationsdauer nach Bestrahlung nahm die Varianz der untersuchten Referenzgene zu (Arenz *et al.*, 2007). Zur Durchführung einer relativen Quantifizierung, die auf einer stabilen Expression der Referenzgene unter experimentellen Bedingungen beruht, war eine Normalisierung gegen mehrere interne Kontrollgene notwendig. Die Anzahl der benötigten Referenzgene zur Berechnung eines Normalisierungsfaktors wurde für jedes Bestrahlungsexperiment mit Hilfe entsprechender Programme (*BestKeeper*© bzw. *GeNorm*) vorgenommen. Diese Einschränkung trifft gleichermaßen auf alle Methoden zu, die auf einer vergleichenden Analytik auf Transkriptom- und Proteomebene beruhen. Eine sorgfältige Analyse der Stabilität mehrerer Referenzgene ist

vor diesem Hintergrund absolute Pflicht. Trotz dieser Einschränkung ist die quantitative Real-Time RT-PCR eine reproduzierbare, äußerst sensitive und spezifische Methode zum Nachweis eines geänderten Transkriptoms.

4.1.1.2 Transkriptionelle Aktivierung von p53-abhängigen Genen nach Bestrahlung mit beschleunigten Ionen mittels Macroarray-Analyse

Der Ablauf der Strahlenantwort wird allgemein so verstanden, dass mit dem Wahrnehmen eines genomischen Schadens durch einen Sensor verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die zur Expression unterschiedlicher Signalwege führen. Das im Jahr 1979 identifizierte humane p53 Gen (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979) ist als Regulator der zellulären Strahlenantwort bekannt und steuert nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der Induktion von Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Um ein möglichst umfassendes Bild strahleninduzierter Genexpression zu erhalten, wurde das Expressionsprofil p53-regulierter Gene in MCF-7 Zellen zwei und zwölf Stunden nach Exposition mit Argon-Ionen mittels Array-Technologie untersucht.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 20 Gene gefunden, die nach Bestrahlung differentiell exprimiert wurden, d.h. die einen $\geq 2,5$ -fachen Expressionsunterschied im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle aufwiesen. Berücksichtigt wurden nur Gene, deren Hybridisierungssignale in beiden Replikaten eine eindeutige Auswertung zuließen. Die Gene mit veränderten mRNA-Spiegel können funktionell in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die Einteilung verdeutlicht, dass ein großer Teil der p53-abhängigen Gene, die nach Strahlung differentiell reguliert werden, an der **Kontrolle der Zellzyklusregulation** beteiligt sind. Von den sechs identifizierten Genen, deren Genprodukte an der Progression des Zellzyklus beteiligt sind, wurden drei Gene in ihrer Expression herauf reguliert (p63, GADD45 und p21) und drei Gene herunter reguliert (REPRIMO, LATS2 und MAD1).

Nach Yang *et al.* (2002) ist **p63** (*Homo sapiens tumour protein 63*) das evolutionär ältere Vorläufer-Gen von p53 und gehört zur Superfamilie dieser hoch konservierten Transkriptionsfaktoren. Mittlerweile sind mindestens sechs Spleißvariationen unterschiedlicher Länge bekannt, die zu der uneinheitlichen Nomenklatur p63, p40, p51 und p73L führten. In der Analyse zum frühen Untersuchungszeitpunkt von zwei Stunden nach Bestrahlung mit Argon-Ionen (Fluenz 2×10^7 P/cm²) zeigte p63 eine Hochregulierung um den Faktor 34 relativ zur Kontrolle, die zum späteren Untersuchungszeitpunkt von zwölf Stunden nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Eine deutliche Induktion nach Bestrahlung zeigten die Zellzyklus-regulierenden Gene **GADD45** (*Growth arrest and DNA-damage-inducible gene*) und **p21** (*Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor*), deren strahleninduzierte Genexpressionsänderung in weiterführenden Real-Time RT-PCR Analysen (3.3.4.3.) verifiziert wurde.

Zu den nach Strahlung in ihrer Expression herunter regulierten Genen gehören REPRIMO, LATS2, MAD1. Die Expression von **REPRIMO** (*Homo sapiens candidate mediator of the p53-*

dependent G2 arrest) bewirkt in gesunden Zellen einen G2-Arrest (Okhi *et al.*, 2000), wurde in MCF-7 Zellen aber deutlich herunter reguliert gefunden. Auch der Tumorsuppressor **LATS2** (*Homo sapiens HsLATS2 mRNA for large tumour suppressor 2*), der in gesunden Zellen den Übergang von G1/S durch Inhibierung der cyclinE/CDK2 Kinaseaktivität negativ reguliert, zeigte sich in MCF-7 Zellen relativ zur Kontrolle herunter reguliert. Eine Herunterregulierung der LATS1 und LATS2 mRNA Expression infolge Hypermethylierung des jeweiligen Promotors wurde von Takahashi *et al.* (2005) in Brustkrebszellen beschrieben. **MAD1** (*Homo sapiens MAD1 mitotic arrest deficient-like 1*) ist Teil des MYC/MAX/Mad-Netzwerkes der bHLHZip-Transkriptionsfaktoren, die eine wesentliche Rolle in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielen. In seiner Rolle als Proliferationshemmer arretiert MAD1 die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus über eine Hemmung des Cyclin E/Cdk2-Komplexes und fungiert als Inhibitor der Fas-TRAIL-abhängigen Apoptose (Rottmann und Luscher, 2006).

Neben der Einleitung eines Zellzyklus-Arrests transaktiviert p53 Zielgene, deren Produkte zur **Induktion des programmierten Zelltods** führen. Man geht davon aus, dass der von p53 vermittelte Zelltod das Ergebnis eines kumulativen Zusammenspiels mehrerer verschiedener pro-apoptotischer Signale ist. Zu den von p53-induzierten Genen mit pro-apoptotischer Funktion gehören unter anderem die Faktoren der Rezeptor-vermittelten Apoptose, wie die Todesrezeptoren CD95/Fas/Apo-1 und KILLER/DR5 und die Komponenten der mitochondrial-vermittelten Apoptose, wie die pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax, PUMA und NOXA. Der Mediator des Apoptosesignals und Mitglied der TNF-Superfamilie **CD95/Fas/Apo-1** (*Human Fas antigen (Apo-1)*) wurde zwei Stunden nach Bestrahlung in MCF-7 Zellen 6,2-fach induziert. Die Analyse 12 Stunden nach Bestrahlung zeigte Signalintensitäten, die 1,9-fach (Fluenz 2×10^7 Partikel/cm²) bzw. 3,3-fach (Fluenz 4×10^7 Partikel/cm²) über den Signalstärken der unbestrahlten Kontrolle lagen.

Auch der infolge eines DNA-Schadens über p53 induzierbare Todesrezeptor **KILLER/DR5** (*Homo sapiens tumour necrosis factor receptor superfamily, member 10b*) (Wu *et al.*, 1997) wurde zwölf Stunden nach Bestrahlung nach Exposition mit 4×10^7 Argon-Teilchen pro cm² 3,3-fach induziert gefunden. Das Maximum der Induktion des pro-apoptotischen Faktors **Bax** wurde dosisabhängig erst zum Analysezeitpunkt von 12 Stunden nach Bestrahlung gefunden (Faktor 11,2 bei einer Flussdichte von 2×10^7 Teilchen/cm² und Faktor 15,3 bei einer Fluenz von 4×10^7 Teilchen/cm²). Im scheinbaren Widerspruch dazu erscheint die Repression anderer pro-apoptotischer Gene wie **PUMA/BBC3**, **LRDD/PIDD** und **WIG1**. PUMA/BBC3 (*Homo sapiens Bcl-2 binding component 3*) ein Zelltod-förderndes Protein der Bcl-2 Familie, ist in die apoptotische Wirkung von gängigen Chemotherapeutika und der Strahlentherapie involviert und zählt genau wie LRDD/PIDD (*Homo sapiens leucine-rich and death domain containing*) zu den Auslösern des programmierten Zelltods in der Zelle. Die Funktion des Genprodukts von WIG1 (*Homo sapiens p53 target zinc finger protein*) ist in der p53-abhängigen Regulierung von Wachstum und Apoptose zu suchen.

Darüber hinaus aktiviert p53 als Effektor die Expression von Genen, die an der **DNA-Reparatur** beteiligt sind wie **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*) (Shivakumar *et al.*, 1995), **p48** (Hwang *et al.*, 1999), **p53R2** (*p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2*) (Tanaka *et al.*, 2000) und **MSH2** (MutS homolog 2) (Warnick *et al.*, 2001). Diesen Genen galt in Hinblick auf die Fragestellung ein besonderes Interesse. Die Höhe der Induktion dieser Reparaturgene steht in Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeiten, welche die relative Genexpressionsänderung nach Strahlung untersucht haben (Rieger und Chu, 2004).

In der Funktionsklasse der **Signaltransduktion** wurde neben **p85** (*Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase*), einer regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase auch **RGS14** (*Homo sapiens regulator of G-protein signalling 14*), ein Regulator der Kinetik G-Protein-abhängiger Signale, relativ zur Kontrolle herunter reguliert. Beide Gene spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Vorgängen wie Zellwachstum, Differenzierung und der Regulation intrazellulärer Signalweiterleitung.

Der Transkriptionsfaktor **STAT3** (*Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 3*) wurde hingegen in der Untersuchung zwölf Stunden nach Bestrahlung dosisabhängig herauf reguliert. Das Mitglied des JAK-STAT-Signalweges steuert fundamentale zellphysiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. STAT3 wird durch Zytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert und reguliert nach Phosphorylierung, Dimerisierung und Kerntranslokation die Transkription spezifischer Zielgene. In vielen Tumorerkrankungen konnte eine Beteiligung des JAK-STAT-Signalweges an krebsrelevanten Prozessen nachgewiesen werden (Clevenger, 2004).

In hohem Maße dosis- und zeitabhängig induziert wurden die Gene **IGF-2** (*Human insulin-like growth factor II*) und **BAI1** (*Homo sapiens brain-specific angiogenesis inhibitor 1*), deren Genprodukte in der Funktionsklasse **Wachstum und Metabolismus** angesiedelt werden können. Der Wachstumsfaktor **IGF-2** wurde nach Bestrahlung mit hoher Signifikanz in allen Untersuchungszeitpunkten induziert gefunden. IGFs sind als mitogene und anti-apoptotisch wirkende Peptide beschrieben, die die Proliferation in normalen und transformierten Brustepithelzellen beeinflussen (Sachdev und Yee, 2001; Strange *et al.*, 2004). Eine Überexpression in MCF-7 Zellen wurde bereits 2001 von Gruber *et al.* in einer Microarray-Analyse beschrieben. Der Inhibitor der Neoangiogenese **BAI1** wird gewebespezifisch im Gehirn exprimiert (Nishimori *et al.*, 1997). Dieses über p53 transkriptionell regulierte Gen spielt bei dessen Ausfall eine signifikante Rolle bei der Neovaskularisierung von Tumorgewebe. Die Macroarray-Analyse zeigte eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der Hybridisierungsintensität dieses Gen.

Nach dem initialen Screening der Genexpressionsänderung nach Bestrahlung mit Argon-Ionen wurde die Genregulation der Zellzyklus-regulierenden Gene GADD45 α , p21 und des Reparaturgens p53R2 in weiterführenden Untersuchungen mittels quantitativer Real Time RT-PCR näher untersucht.

4.1.1.3 Modulation der Genregulation ausgewählter Gene nach Bestrahlung in zellulären Modellsystemen und humanen Fibroblasten

Zur Identifizierung eines geeigneten Kandidatengens für die Entwicklung eines indikativen Testsystems sollten Gene erfasst werden, deren Expression infolge Strahlenexposition modifiziert werden. Mit dem Verfahren der quantitativen Real Time RT-PCR konnten drei Gene (p21, GADD45 α , p53R2) identifiziert werden, die nach Bestrahlung mit einem mehr als zweifachen Anstieg der Transkriptmenge zeit- und dosisabhängig reagierten. Die ebenfalls in die Strahlenantwort involvierten Gene GADD45 β , BRCA2 und I κ B α zeigten keine Induktion auf mRNA-Ebene. Die ermittelten Werte lagen innerhalb eines Bereichs, der das Zweifache des Vergleichswertes bei Zellen ohne Bestrahlung nicht überschritt. Die graphische Darstellung der qRT-PCR Experimente für diese Gene ist dem Anhang zu entnehmen.

4.1.1.3.1 Zellzyklusinhibitor p21(CDKN1A/ CIP1/ WAF1)

Neben dem kontrollierten Zusammenspiel von Cyclinen und cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) (Abb. 4-2) wird die Aktivität der Zellzyklus-regulierenden Kinasen durch aktivierende oder inhibierende Phosphorylierung sowie durch Interaktion mit CDK-Inhibitoren wie p16, p21 oder p27 reguliert (Obaya und Sedivy, 2002).

Das Gen p21 (CDKN1A, *cyclin dependent kinase inhibitor-1A*), lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.2) kodiert für ein 21 kDa großes, multifunktionales Protein. Synonym werden auch die Bezeichnungen WAF1 (*wildtype p53 activated fragment*) oder CIP1 (*cyclin dependent kinase interacting protein*) verwendet. Nach Zeng *et al.* (1997) ist für seine Aktivierung ein quartärer Komplex bestehend aus p21, AP2 (*activating protein 2*) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) notwendig. Das Genprodukt von p21 verhindert die Bildung von Komplexen aus Cyclin und cyclin-abhängiger Kinase, hindert somit den Übergang von der G1- zur S-Phase und gibt der geschädigten Zelle Zeit zur Reparatur.

Tritt ein Zellschaden innerhalb der frühen G1-Phase des Zellzyklus auf, so wird dessen Fortgang auf zweierlei Arten unterbrochen: In einer p53-unabhängigen, raschen Schadensantwort kommt es zur Freisetzung von p21 aus den Cyclin D-Cdk4 Komplexen. In einem parallel dazu verlaufenden, langsameren Schritt erfolgt eine p53-abhängige Transaktivierung von p21, die mit einer Stabilisierung und Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung verschiedenerer schadensspezifischer Kinasen (ATM und ATR sowie die durch ATR/ATM aktivierten „checkpoint“ Kinasen Chk1 und Chk2) einhergeht. Die aus den Cyclin D-Cdk4-Komplexen sehr schnell freigesetzten und im parallel dazu langsameren p53-abhängigen Schritt erzeugten p21 Moleküle inhibieren durch direkte Interaktion die Aktivität von Cyclin E-Cdk2, wodurch die Phosphorylierung von Rb und folglich die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F unterbunden wird. Chan *et al.* (2000) konnte ferner eine Beteiligung am G2/M Übergang nachweisen.

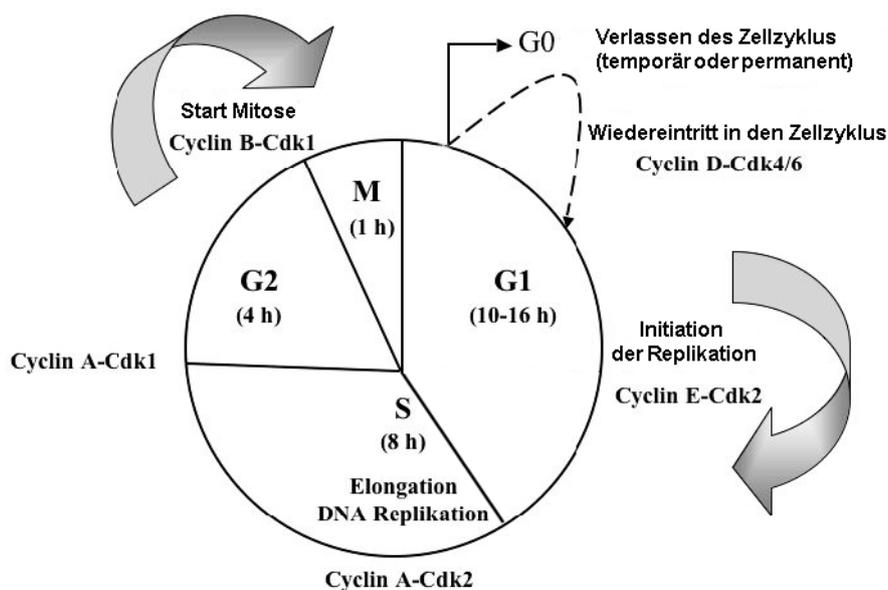


Abb. 4-2: Die Zellzyklusregulation erfolgt durch Cyclin-abhängige Proteinkinasen (Cdks), die sich aus einer katalytischen Serin/Threonin-Kinase Untereinheit und Cyclin als regulatorischer Untereinheit zusammensetzen. Zu genau festgelegten Zeiten innerhalb des Zellzyklus kommt es zu einer Assoziation von Cyclinen mit den entsprechenden Kinaseuntereinheiten. Der Verlauf des Zellzyklus wird durch eine kontrollierte Phosphorylierung von Zielproteinen reguliert (nach Dornreiter, 2006).

Der Zellzyklusinhibitor p21 wurde nach Exposition mit allen untersuchten Strahlenarten als das am stärksten induzierbare Gen gefunden. Die Ergebnisse der quantitativen Real Time RT-PCR zeigten in der Analyse nach Bestrahlung mit UV-C in den Zelllinien A549 und MCF-7 24 Stunden nach Bestrahlung eine dosisabhängige Induktion mit vergleichbaren Maxima (6,8-fach in MCF-7 und 7,1-fach in A549). Die Zelllinien AGS und NHF wiesen eine nur geringe Modulation der Expressionshöhe auf, die innerhalb der untersuchten Zeitkinetik um die gewählte Ausschlussgrenze der 2-fachen Expressionserhöhung schwankte. Auch nach Exposition mit locker ionisierender Strahlung bis 4 Gy lagen die Genexpressionslevel in AGS und NHF in diesem Bereich. In den Zelllinien A549 und MCF-7 wurde die Induzierbarkeit von p21 mit Bestrahlungsdosen von maximal 4 Gy (A549) und 6 Gy (MCF-7) untersucht. Bei Exposition mit diesen Strahlendosen wurden geringere Expressionshöhen im Vergleich zur UV-C vermittelten Induktion detektiert, die ihr Maximum innerhalb der untersuchten Zeitkinetik wesentlich früher erreichten (jeweils 5-fache Induktion in MCF-7 nach vier Stunden bzw. in A549 nach sechs Stunden).

In der Zelllinie A549 wurden weiterführende Untersuchungen mit dicht ionisierender Partikelstrahlung durchgeführt. Eine Bestrahlung mit Alpha-Teilchen (2,1 MeV, LET 160 keV/μm) mit einer Partikeldichte von $5 \times 10^6 / \text{cm}^2$ führte nur zu einer mäßigen Erhöhung der p21 Transkriptmenge mit einem relativen Maximum von 2,5 nach fünf Stunden. Eine wesentlich höhere strahleninduzierte Modulation der Genexpression konnte zwei bzw. vier Stunden nach Exposition mit Blei-Ionen (29 MeV/amu; LET 13000 keV/μm) detektiert werden (4,1-fach im Fluenzbereich von $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ und 5,7 im Fluenzbereich von $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$).

Analog zu den Macro-Array-Daten zeigten MCF-Zellen nach Bestrahlung mit Argon-Ionen eine 2,7-fache Heraufregulierung der p21-Genexpression 12 Stunden nach Bestrahlung mit der höchsten Partikeldichte (4×10^7 P/cm²).

4.1.1.3.2 GADD45 (Growth arrest and DNA damage-inducible gene)

Die GADD45 Genfamilie besteht aus drei Genen, die mit 55 bis 58% eine relativ hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäurezusammensetzung zeigen und evolutionär hoch konserviert sind: GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ . Diese Gene üben eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, der NER, der Stabilisierung der Chromatinstruktur und der Regulation von Wachstum und Apoptose aus (Carrier *et al.*, 1999; Hollander *et al.*, 1999). Alle Gene dieser Familie werden durch zellulären Stress induziert und üben eine ähnliche aber nicht gleiche Funktion innerhalb verschiedener Regulierungspfade aus, wobei nur GADD45 α ein p53-abhängiges Gen ist. Es konnte gezeigt werden, dass alle Mitglieder der GADD45 Genfamilie mit dem Zellzyklusinhibitor p21 interagieren (Vairapandi *et al.*, 1996; Azam *et al.*, 2001) und in die Aktivierung von S- und G2/M- Zellzyklus-Checkpoints involviert sind.

4.1.1.3.2.1 GADD45 α (GADD45, DDIT)

Obwohl GADD45 α offiziell nicht als Tumorsuppressor klassifiziert wurde, ist das mit 165 Aminosäuren kodierte Protein in zahlreiche biologische und biochemische Vorgänge involviert, die die Zelle vor einer Tumorentstehung schützen. Die schadensinduzierte Expression von GADD45 α kann sowohl in p53-abhängiger als auch p53-unabhängiger Weise reguliert werden. Das auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (1p34-p12) lokalisierte Gen moduliert den MAPK-Signalweg über eine positive Rückkopplungsschleife sowohl mit MEKK4 (MTK1), MAPKKK als auch p38 (Takekawa und Saito, 1998; Bulavin *et al.*, 2003). GADD45 α spielt beim G2-Phasen-Kontrollpunkt eine wichtige Rolle, indem es in direkter Wechselwirkung mit Cdk1 (Zhan *et al.*, 1999) und darüber hinaus mit Cyclin B1 steht (Vairapandi *et al.*, 2002). Durch diese Interaktion bewirkt GADD45 α eine Dissoziation des Cyclin B1-Cdk1 Komplex und inaktiviert auf diese Weise die für den G2/M Übergang essentielle Kinase (Zhan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Ferner wurde eine Bindung des vorwiegend im Kern lokalisierten Proteins an PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Smith *et al.*, 1994) an die Zellzyklus-abhängige Kinase Cdc2 (Yang *et al.*, 2000) und an den Zellzyklusinhibitor p21 (Kearsey *et al.*, 1995) nachgewiesen, wodurch GADD45 α eine Rolle als Zellzyklusprotein und Bindeglied zwischen der p53-vermittelten Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur zugesprochen wurde. Kearsey *et al.* (1995) konnten nach Synchronisation des Zellzyklus nachweisen, dass die GADD45 α Expression in Zellzyklus-abhängiger Weise mit einem Maximum in der G1-Phase und einem Minimum in der S-Phase reguliert ist. Weiterhin konnten Tran *et al.* (2002) zeigen, dass GADD45 α ein direktes Zielgen für den Transkriptionsfaktor FOXO3A ist, der die Reparatur geschädigter DNA im G2/M Kontrollpunkt auslöst. Jin *et al.* (2000)

identifizierten GADD45 α als ein über BRCA1-reguliertes Gen. Bindungsexperimenten zufolge assoziiert GADD45 α mit einer Vielzahl nukleärer und zytoplasmatischer Faktoren, die in die Kontrolle des Zellzyklus (Cdc2, p21, cyclin D1, CRIF1), in den Prozess des „*chromatin assembly*“ (*core Histone*, insbesondere H3) und in die DNA Replikation und Reparatur (PCNA, ING1, FOXO3a) involviert sind. Ferner konnte eine Beteiligung in der MAPK Signalkaskade (p38 MAPK, MEKK4/MTK1 MAPKKK) und bei der Regulierung der Migration/Integration (APC Komplex Proteine PP2a, GSK3beta und deren Substrat beta-catenin) nachgewiesen werden.

In der Expressionsanalyse für GADD45 α wurde in MCF-7 und A549 Zellen nach Exposition mit ionisierender Strahlung eine dosisabhängige Induktion der Transkriptmenge gefunden, wobei auch hier die Expressionsanalyse nach Bestrahlung mit UV-C eine deutlich stärkere Induktion zeigte. Bestrahlung mit einer UV-C Fluenz von 20 J/m² führte zu einem relativen Anstieg der GADD45 α -mRNA Menge mit einem Maximum 24 Stunden nach Bestrahlung (A549 5,6-fache Induktion; MCF-7 6,76-fache Induktion). Während die Genexpressionsanalyse in NHF keine signifikante Hochregulierung oberhalb der Ausschlussgrenze (2-fache Induktion) zeigte, konnte in der Analyse der AGS Zellen eine 4-fache Induktion sechs Stunden nach Bestrahlung mit 15 J/m² detektiert werden. Die Zeitkinetik wurde in dieser Zelllinie nur über einen Zeitraum von neun Stunden nach Bestrahlung untersucht, wodurch eine spätere Induktion möglicherweise nicht erfasst wurde. Die Veränderung der GADD45 α Expression nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen lag in den Zelllinien A549 und MCF-7 mit Induktionsfaktoren von 2,7 (A549, Bestrahlung mit 4 Gy Röntgen) und 2,2 (MCF-7 nach Bestrahlung mit 6 Gy Röntgen) auf deutlich niedrigerem Niveau. In Übereinstimmung mit der Untersuchung in NHF-Zellen konnte auch in AGS Zellen keine Erhöhung der GADD45 α Transkriptmenge oberhalb der Ausschlussgrenze gefunden werden.

Exposition mit Alpha-Teilchen führte in A549 Zellen zu einer späten Induktion, die 16 Stunden nach Bestrahlung mit einem Maximum von 5,5 gefunden wurde. Im Gegensatz dazu konnte nach Bestrahlung mit Blei-Ionen im Untersuchungszeitraum bis acht Stunden nach Bestrahlung keine GADD45 α Transkripterhöhung beobachtet werden, wobei eine Hochregulierung zu einem späteren Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann.

Die in der Macroarray-Analyse gefundene Induktion der GADD45 α Expression in MCF-7 Zellen nach Bestrahlung mit Argon-Ionen (Faktor 33,7; zwei Stunden nach Bestrahlung) konnte durch die qRT-PCR Analyse nicht bestätigt werden. Hier wurde eine mäßige Erhöhung der Transkriptmenge um einen Faktor von 2,1 (Fluenz 2 x 10⁷/cm²) bzw. 3,4 (Fluenz 4 x 10⁷ /cm²) 12 Stunden nach Bestrahlung detektiert.

4.1.1.3.2.2 GADD45beta (MyD118)

Genau wie GADD45 α interagieren sowohl GADD45 β als auch GADD45 γ nach einem DNA-Schaden direkt und ausschließlich mit dem CyclinB1-Cdk1 Komplex (Vairapandi *et al.*, 2002), dem Schlüsselregulator für den Übergang von der G2-Phase zur M-Phase (Elledge, 1996;

O'Connor, 1997). Somit konnte gezeigt werden, dass alle drei GADD45-Gene in der Kontrolle des S- und G2/M-Zellzyklus-Checkpoints nach Auslösung eines DNA-Schadens kooperieren. Wie alle Gene aus dieser Familie zählt GADD45 β zu den Aktivatoren der p38 MAP-Kinasen-Kaskade (Takekawa und Saito, 1998). Dieser These widersprechende Befunde weisen GADD45 β als ein durch das proinflammatorische Zytokin TNF α induzierbares Gen und damit als physiologisches Zielgen des NF- κ B-Pathways aus (De Smaele *et al.*, 2001). Nach Liganden-vermittelter Aktivierung des Zelltod-vermittelnden Rezeptors TNFR1 hängt das Schicksal der Zelle vom Crosstalk zwischen dem Überlebens- und Todes-*Pathway* ab: Der *Survival-Pathway* wird durch den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert, während der *Death-Pathway* mit der c-Jun-N-terminale (JNK) Kaskade assoziiert ist. Papa *et al.* konnten 2004 zeigen, dass GADD45 β nach Aktivierung über NF- κ B über eine Bindung an MKK7/JNKK2 die Apoptose-vermittelnde Aktivität des JNK Signalwegs unterdrückt und somit ein Bindeglied zwischen dem *Survival-Pathway* und dem *Death-Pathway* darstellt. In diesem Zusammenhang konnten Wang *et al.* (2005) zeigen, dass die Proteine ERK, NF κ B und GADD45 β in einem Muster gegenseitiger Abhängigkeit aktiviert werden und aufgrund interner Koordination in Tumorzellen die Überlebensrate nach Bestrahlung erhöhen.

Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten führte in den untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Verringerung der GADD45 β Transkriptmenge. Abweichend hiervon zeigte die Analyse nach Bestrahlung mit UV-C in AGS Zellen eine hoch signifikante Induktion der Expression. Innerhalb der untersuchten Zeitkinetik von neun Stunden konnte sechs Stunden nach Bestrahlung mit 15 J/m² eine Hochregulierung mit einem Maximum von 17,7 relativ zur unbestrahlten Kontrolle detektiert werden. Interessanterweise zeigten nur UV-C bestrahlte AGS-Zellen eine derart starke Induktion, während eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen die Transkriptmenge nicht signifikant erhöhte. Einer Recherche innerhalb der EST Datenbank (*expressed sequence tag*) des NCBI (www.ncbi.nlm.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi) zufolge, die eine umfangreiche Sammlung von Transkriptomanalysen beinhaltet, wird GADD45 β in gastralen Tumoren überexprimiert. Für die Entwicklung eines Testsystems zur Detektion UV-C vermittelter Genexpression auf Basis der GADD45 β -Expression wären demnach Zellen dieser Magenkarzinomlinie die primäre Wahl.

Gegenüber den hier untersuchten Zelllinien zeigten die HEK-Zellen in vergleichbaren Untersuchungen mit Alphateilchen im Bereich niedriger Dosen eine stärkere Ansprechbarkeit (Hellweg *et al.*, 2007b).

4.1.1.3.3 Das DNA-Reparaturgen p53R2 (hRRM2b)

Eine Grundvoraussetzung für DNA-Synthese und -Reparatur in allen lebenden Zellen ist die Bereitstellung von Desoxyribonukleotiden. Diese werden aus Ribonukleotid-Diphosphaten (NDP) durch Reduktion der Ribose and anschließender Phosphorylierung des entstandenen Desoxyri-

bonukleotid-Diphosphates (dNDP) zum Desoxyribonukleotid-Triphosphat (dNTP) hergestellt. Der enzymatische Schritt der Reduktion wird durch die Ribonukleotid Reduktase katalysiert. Dieses zytoplasmatische Enzym (Reichard und Ehrenberg, 1983) ist ein Tetramer, bestehend aus zwei konstitutiv exprimierten großen Regulatoreinheiten hRRM1 und zwei kleinen Katalyseeinheiten hRRM2. Die kleinen Untereinheiten beinhalten ein Eisenzentrum und einem Tyrosylradikal, wobei letzteres als freies Radikal die Geschwindigkeit der enzymatischen Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden katalysiert. Die große Regulatoreinheit hRRM1 wird aufgrund der langen Halbwertszeit des Enzyms stabil exprimiert. Die kleine Untereinheit hRRM2 hingegen wird in der späten G1-Phase (vor Eintritt der Zelle in die DNA-Replikation) bis zur späten S-Phase oder frühen G2-Phase exprimiert.

Das infolge eines DNA-Schadens über p53 induzierbare Gen p53R2 (hRRM2b) (Tanaka *et al.*, 2000) weist mit 80% eine große Homologie zur kleinen Untereinheit der Ribonukleotid Reduktase (hRRM2) auf und ist in Struktur und Funktion mit dieser identisch. Das humane p53R2 Protein, bestehend aus 351 Aminosäuren (39 kDa) ist im Kern lokalisiert und wird infolge genotoxisch wirkender Agenzien über eine p53-Bindestelle im ersten Intron reguliert. p53R2 formiert *in vitro* ein aktives Holoenzym mit der großen Untereinheit hRRM1 (Guittet *et al.*, 2001). Nach Yamaguchi *et al.* (2001) existieren zwei unterschiedliche Regulierungswege für die Bereitstellung von dNTPs für die DNA-Synthese: Der erste Pfad gewährleistet die Versorgung der Zelle mit dNTPs für die DNA-Replikation. Die Bereitstellung erfolgt in Zellzyklus-abhängiger Weise und wird durch die Aktivität der Untereinheit hRRM2 reguliert. Der zweite Pfad wird über die Expression der p53-induzierten Form der Ribonukleotid Reduktase (p53R2 = hRRM2b) gesteuert und bewerkstelligt die Versorgung der Zelle mit dNTPs für die DNA-Reparatur in der G0/G1-Phase des Zellzyklus.

Nach dem Modell von Xue *et al.* (2003) liegen hRRM2 und p53R2 an p53 gebunden im Zytoplasma vor und wandern infolge eines DNA-Schadens zusammen mit der großen Untereinheit hRRM1 in den Kern, wo sie sich zu einem funktionalen, tetramerschen Holoenzym zusammensetzen und DNA-Bausteine für die Reparatur bereitstellen (Abb. 4-3).

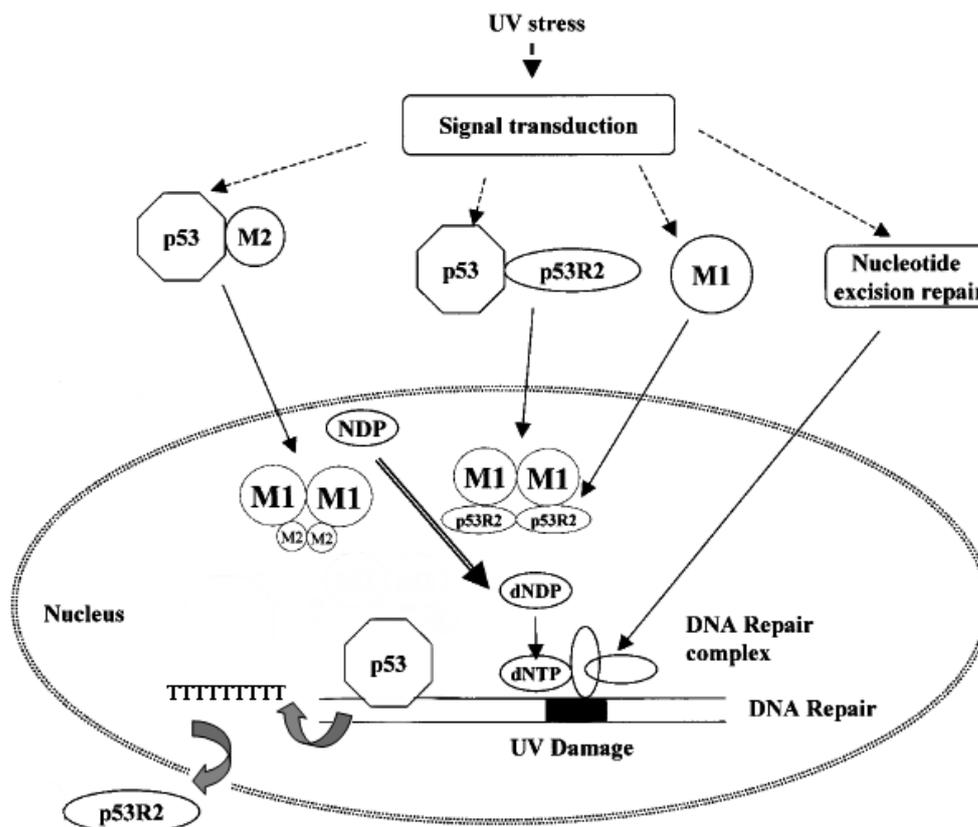


Abb. 4-3: Modell der p53-abhängigen Regulation der Ribonukleotid Reduktase (RR) Aktivität infolge eines UV-C vermittelten DNA Schadens: Im Zytoplasma der ungeschädigten Zelle binden sowohl hRRM2 als auch p53R2 an p53. Die große Untereinheit hRRM1 liegt ungebunden im Zytoplasma vor. Infolge eines DNA-Schadens wird die Affinität der Bindung zwischen p53 und den Untereinheiten der Ribonukleotid Reduktase reduziert und die RR-Untereinheiten wandern in den Kern, wo sie sich zu einem aktiven, tetrameren Holoenzym zusammensetzen. Dieses bewirkt die Umwandlung von NDPs zu dNDPs, die nach Phosphorylierung zu dNTPs als Bausteine für die Reparatur geschädigter DNA zur Verfügung stehen. Der Tumorsuppressor p53 initiiert seinerseits die Transkription von p53R2 (modifiziert nach Xue *et al.*, 2003)

Die mittels quantitativer Real Time RT-PCR erhobene Genexpressionsanalyse zeigte nach UV-C Bestrahlung eine vergleichsweise stärkere Induktion der Transkriptmenge als nach Exposition mit ionisierender Strahlung. Maximalwerte konnten 24 Stunden nach Bestrahlung in MCF-7 Zellen (Faktor 2,4, Fluenz 10 J/m²), in A549 (Faktor 3,8, Fluenz 20 J/m²) und NHF (Faktor 2,5, Fluenz 15 J/m²) detektiert werden. AGS Zellen wiesen sechs Stunden nach Exposition mit 15 J/m² eine Erhöhung der Transkriptmenge um einen Faktor von 2,7 auf. Während MCF-7 und AGS Zellen keine signifikante Änderung der Transkription nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zeigten, wurde die mRNA-Menge in A549 Zellen sechs Stunden nach Bestrahlung mit zwei bzw. vier Gy um einen Faktor von jeweils 2,7 erhöht. Die Untersuchung in NHF zeigte 48 Stunden nach Bestrahlung eine Hochregulierung der relativen Genexpression um einen Faktor von 2,7 (Exposition mit 0,5 Gy); 3,6 (Exposition mit 2 Gy) bzw. 3,9 (Exposition mit 4 Gy). Die Analyse der p53R2-Expression nach Bestrahlung mit Alpha-Teilchen ergab eine mäßige Induktion um einen Faktor von 2,1 sechzehn Stunden nach Bestrahlung. Eine Exposition mit Blei-Ionen vermochte

die p53R2 Expression im Untersuchungszeitraum von acht Stunden nach Bestrahlung nicht zu induzieren.

RNA-Proben der mit Argon-Ionen bestrahlten MCF-7 Zellen wurden sowohl mittels Macroarray-Analyse als auch Northern Analyse untersucht und mittels qRT-PCR verifiziert. Übereinstimmend zeigten alle Untersuchungen eine dosis- und zeitabhängige Zunahme des Transkripts mit einem Maximum 12 Stunden nach Bestrahlung (Fluenz 4×10^7 Teilchen /cm²).

4.1.1.3.4 Das Reparaturgen BRCA2

Das humane BRCA2 Gen (*breast cancer susceptibility 2*), lokalisiert auf dem langen Arm des Chromosom 13 (13q12-13) wird in zahlreichen Geweben als ein 11 kb großes Transkript exprimiert, kodiert für ein 384 kDa großes Protein und zeigt keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Genen. BRCA2 wird in zellzyklusabhängiger Weise mit einem Maximum in der G1- und in der S-Phase exprimiert. Eine Mutation im BRCA2 Gen geht mit einem erhöhten Krebsrisiko für die weibliche und männliche Brust, der Prostata, des Magens und des Kehlkopfs einher. Die Rolle der Gene BRCA1 und BRCA2 bei der DNA-Reparatur und homologen Rekombination wird aufgrund ihrer Kolokalisation und biochemischen Interaktion mit Proteinen vermutet, die Schlüsselrollen innerhalb der Reparaturvorgänge einnehmen. Exon 11 des BRCA2-Gens weist eine hoch konservierte Domäne mit acht so genannten BRC-Wiederholungen (*brc-repeats*) auf, über die eine Interaktion mit Rad51 möglich ist, wodurch eine Beteiligung am Reparaturweg der Homologen Rekombination nachgewiesen werden konnte (Wong *et al.*, 1997). BRCA1, BRCA2 und Rad51 kolokalisieren während der S- und G2-Phase zu subnukleären Foci, wobei auch Interaktionen zwischen dem Tumorsuppressor p53 und Rad51, BRCA1 und BRCA2 gezeigt werden konnten (Stürzbecher *et al.*, 1996; Marmorstein *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Während der Meiose sind sie axial im synaptonemalen Komplex lokalisiert (Homologe Rekombination, Geschwisterchromatidaustausch). Es wird angenommen, dass BRCA2 als Mediator der Rekombination fungiert, indem es die Verfügbarkeit und Aktivität von Rad51 reguliert (Venkitaraman, 2002) und am Aufbau des Rad51-Nukleoproteinfilaments beteiligt ist (West, 2003).

Nach Bestrahlung mit UV-C reagierten alle Zelllinien mit einer einheitlichen Herunterregulierung der BRCA2 Expression im späteren Verlauf der Zeitkinetik. Eine Reprimierung der BRCA2-mRNA Konzentration wurde in Abhängigkeit von der Dosis bereits in humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien von Fan *et al.* (1998) nach Exposition mit UV-C und Adriamycin beschrieben und von Andres *et al.* (1998) in Brustkrebszellen bestätigt. Die Autoren postulieren, dass eine Reprimierung des BRCA2 Gens Teil einer zellulären Überlebensstrategie nach Ausbildung spezieller DNA-Schadenstypen ist. Ferner konnten Wang *et al.* (2001) zeigen, dass die BRCA2 Proteinmenge in einer Zellzyklus- und von p53 unabhängigen Weise innerhalb vier Stunden nach Bestrahlung mit UV-C reduziert wird.

Während die Zelllinien A549 und AGS nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen Transkriptmengen im Schwankungsbereich der unbestrahlten Kontrolle aufwiesen, konnte eine dosisabhängige Reprimierung hingegen nur in MCF-7 Zellen und Fibroblasten nachgewiesen werden. Exposition mit Alpha-Teilchen führte in A549 Zellen zu einer Abnahme der Transkriptmenge mit einem Minimum bei 16 Stunden nach Bestrahlung (Faktor -5), die auch in Abhängigkeit von der Dosis nach Exposition mit Blei-Ionen gefunden werden konnte (Faktor -1,75).

Die Expressionsanalyse in MCF-7 Zellen zeigte zwei Stunden nach Exposition mit Argon-Ionen eine Heraufregulierung der BRCA2 Transkriptmenge, die zum späteren Zeitpunkt der Untersuchung (12 Stunden) herunter reguliert gefunden wurde.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation des BRCA2 Gens nicht auf transkriptioneller Ebene vorgenommen wird. Inwieweit die gefundene transkriptionelle Reprimierung des Gens nach Bestrahlung von physiologischer Relevanz ist, kann nicht beurteilt werden.

4.1.1.3.5 NF- κ B und I κ B α

Die NF- κ B/Rel Familie gehört zu einer Familie strukturell verwandter Transkriptionsfaktoren die, gebunden an inhibitorische Proteine aus der I κ B-Familie, sequestriert im Zytoplasma liegen (Baeuerle und Baltimore, 1996). In der Familie der Säugertiere sind bislang fünf Rel-Proteine identifiziert worden (Ghosh *et al.*, 1998): NF- κ B1 (p50 und dessen Vorläufer p105), NF- κ B2 (p52 und dessen Vorläufer p100), cRel, RelA (p65) und RelB. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt unter Einfluss von unterschiedlichen Stimuli wie z.B. den pro-entzündlichen Zytokinen TNF- α und Interleukin 1 (IL-1), Stress in Form von oxidativen, genotoxischen, physiologischen und chemischen Faktoren, bakteriellen oder viralen Infektionen. Diese Stressoren lösen Signalketten aus, an deren Ende die Inhibitorproteine der I κ B-Familie phosphoryliert und infolgedessen nach Ubiquitinierung durch das Proteasomsystem abgebaut werden. Dadurch wird das Kernlokalisierungssignal in NF- κ B freigelegt, worauf der Faktor in den Zellkern transloziert. Dort wirkt er durch Bindung an Promotersequenzen als Transkriptionsfaktor und initiiert die Transkription nachgeschalteter Gene (Whiteside und Israël, 1997; Perkins 2004).

Zu den physiologischen Funktionen gehört die schnelle Aktivierung von Genen des Immunsystems. Aufgrund der direkten Rolle bei der Regulierung der zellulären Antwort auf entzündliche Zytokine oder Endotoxine wird der Aktivierung von NF- κ B eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung chronischer Erkrankungen wie z.B. Rheuma eingeräumt. Weiterhin konnte eine direkte Beteiligung an der Entstehung des septischen Schocks (Baldwin, 1996), neurodegenerativen und gastrointestinaler Erkrankungen (Schmid und Adler, 2000) und verschiedener Krebsformen nachgewiesen werden.

Die Aktivität von NF κ B wird in erster Linie durch seine Lokalisation in der Zelle (Zytoplasma oder Zellkern) kontrolliert (Karin und Ben-Neriah, 2000). Man unterscheidet drei Arten der Aktivierung,

die zur Translokation in den Zellkern führen: den klassischen (*canonical pathway*), alternativen und atypischen Aktivierungsweg. Die Aktivierungswege unterscheiden sich sowohl durch die Art der induzierenden Stimuli, als auch durch die an der Signalkaskade beteiligten Proteine. Beim **klassischen Aktivierungsweg** (Abb. 4-4) wird ein inaktives NF- κ B Dimer (p65/p50) im Zytoplasma angereichert, indem es an das Inhibitorprotein I κ B α gebunden ist. Der Inhibitor I κ B α verdeckt das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) des Transkriptionsfaktors, wodurch dieser Komplex nicht in den Zellkern translozieren kann. Erst die signalbedingte Degradation von I κ B α durch ein IKK Signalosom, bestehend aus den Kinasen IKK α und IKK β und der Regulatoreinheit NEMO (*NF- κ B essential modulator*), löst die Translokation von NF- κ B in den Zellkern aus. Dieser Aktivierungsweg führt zu einer raschen und starken Entwicklung des NF- κ B Signals.

Der zweite, **alternative Aktivierungsweg** ist vorwiegend in B-Zellen aktiv und wird über verschiedene Mitglieder der TNFR Superfamilie induziert. Im Verlauf dieser Aktivierungskaskade wird die Untereinheit IKK α des IKK-Trimers über die NF- κ B induzierende Kinase NIK phosphoryliert. Die Phosphorylierung von IKK α führt zur Phosphorylierung und anschließenden Ubiquitinierung von p100, des Vorläufers von p52, der zusammen mit RelB im Zytoplasma vorliegt. Nachfolgend wird p100 zu p52 prozessiert, das *RelB/p52* Heterodimer kann in den Zellkern translozieren und die Expression nachgeschalteter Zielgene initiieren. Alle Signalkaskaden, die über atypische Stimuli wie DNA Schäden oder oxidativen Stress ausgelöst werden, werden im dritten, so genannten **atypischen Aktivierungsweg** vereinigt. Dieser führt zur Ausbildung eines langsamen und schwachen NF- κ B Signals mit einem Aktivitätsmaximum zwei bis vier Stunden nach Induktion. Neueren Studien zufolge können die Reaktionen auf diese atypischen Stimuli nicht in einer Klasse zusammengefasst werden, da sie vollkommen unterschiedliche Signalkaskaden auslösen.

Während die UV-C induzierte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs in einer von IKK-unabhängigen Weise erfolgt, folgen die meisten anderen Auslöser des genotoxischen Stresses dem klassischen Aktivierungsschema von NF- κ B (Abb. 4-4). Eine Aktivierung des Signalwegs über UV-C scheint auf einem über die Plasmamembran vermittelten Effekt zu beruhen, der ohne ein nukleäres Signal vonstatten geht (Devary *et al.*, 1993). Nach Bender *et al.* (1998) beruht diese Art der Aktivierung auf einer frühen, DNA-schadensunabhängigen und einer späten, DNA-schadensabhängigen Antwort. Sowohl die UV-C vermittelte, als auch die Doppelstrangbruch auslösende NF- κ B Aktivierung sind noch nicht ganz verstanden.

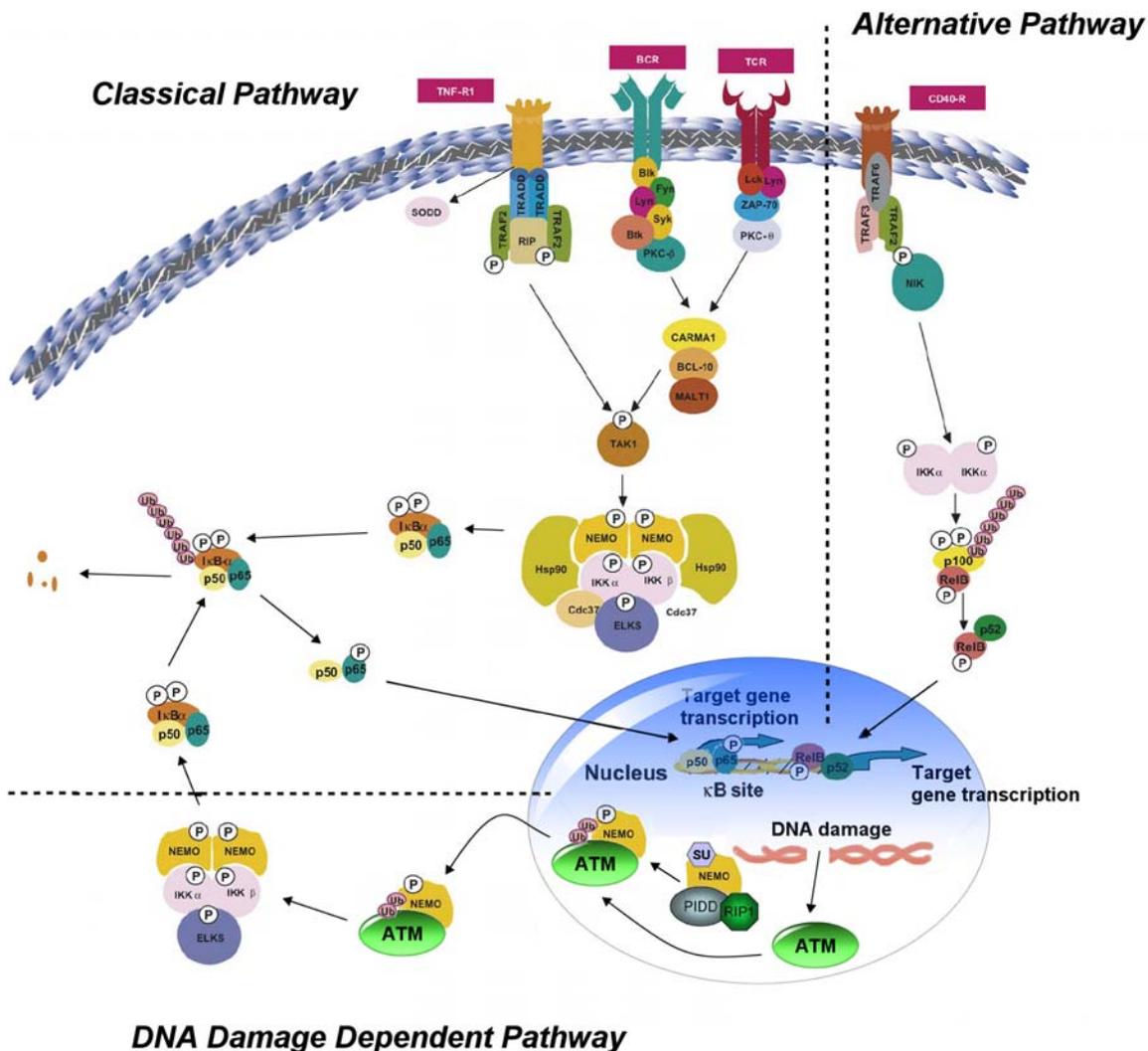


Abb. 4-4: Der klassische Aktivierungsweg, initiiert durch Zytokine wie IL-1 und TNF oder LPS, erfordert die Anwesenheit von IKKβ und NEMO und führt zur Phosphorylierung des Inhibitors IκBα, der nach seiner Degradierung ein aktives p65/p50 Heterodimer freigibt. Im alternativen Aktivierungsweg, der durch Mitglieder der TNFR Superfamilie angeschaltet wird, sind IKKα und NIK involviert, deren Aktivität zu einer Phosphorylierung und Prozessierung von p100 und zur Ausbildung eines funktionalen RelB/p52 Heterodimers führen. Der IKK-abhängigen Signalweg wird nach Ausbildung eines DNA-Schadens über Phosphorylierung und Aktivierung von ATM gestartet. ATM bindet an einen Komplex bestehend aus RIP1, PIDD und NEMO (nach dessen PIDD-abhängiger Sumoylierung). Der nun entstandene Komplex von ATM/NEMO wird daraufhin phosphoryliert, nachfolgend ubiquitiniert und transloziert ins Cytoplasma. Durch Bindung von NEMO an die IKKα und IKKβ Untereinheiten wird die Aktivierung von NF-κB ausgelöst. (Modifiziert nach Keutgens *et al.*, 2006 und Habraken und Piette, 2006)

Eine NF-κB Aktivierung nach Exposition mit genotoxischen Substanzen wie Doxorubicin, Camptothecin, Etoposid und ionisierender Strahlung erfolgt nur in Anwesenheit eines funktionellen IKK-Komplex bestehend aus NEMO, IKKα und IKKβ (Li *et al.*, 1998 und 2001; Panta *et al.*, 2004). Das zurzeit postulierte Modell der NF-κB Aktivierung nach Induktion von Doppelstrangbrüchen geht von zwei alternativen Signalkaskaden aus, die abhängig vom Schadensmaß induziert werden (Habraken und Piette, 2006). Bei einer geringen Anzahl von DSB kommt es zu einer Mre11/Rad50/NBS(MRN)-abhängigen Aktivierung von ATM. Alternativ dazu wird in der zweiten Signalkaskade das Protein PIDD (*Homo sapiens leucine-rich repeat and death domain*

containing) aktiviert und formt nach Übergang vom Cytoplasma in den Kern einen Komplex mit NEMO und RIP1 (*receptor interacting protein 1*), was wiederum eine SUMOylierung von NEMO auslöst. Die SUMOylierung, d.h. die Übertragung des SUMO Proteins (*small ubiquitin related modifier*) wurde nur bei NF- κ B Aktivierung über DNA-schädigenden Stimuli, nie aber nach Zytokinen beobachtet. Beide Signalwege konvergieren bei der Bindung von ATM an NEMO und dessen nachfolgender Phosphorylierung. NEMO, derart modifiziert und an ATM gebunden, verlässt den Kern und bildet mit IKK α und IKK β den NF- κ B initiiierenden IKK-Komplex. Bei der Ausbildung dieses „irregulären“, klassischen IKK-Komplexes ist ELKS als Regulator beteiligt (Ducut Sigala *et al.*, 2004).

Die Zeitkinetik der transkriptionellen Aktivität des NF- κ B Pathways wurde in der Zelllinie A549 nach Exposition mit verschiedenen Strahlenarten über eine quantitative Real Time RT-PCR Analyse des Inhibitors I κ B α untersucht (Bottero *et al.*, 2003). Das Inhibitorprotein I κ B α zählt neben I κ B β und I κ B ϵ zu den wichtigsten Vertretern dieser Familie, deren Aufgabe nicht nur in der Hemmung des NF- κ B Komplexes in der nicht-stimulierten Zelle, sondern auch im Schutz vor einer konstitutiven Expression besteht. Das Fehlen von I κ B α oder die Expression von nicht funktionsfähigem I κ B α , wie sie in Hodgkin-Tumoren vorkommt, könnten ursächlich für eine permanente Aktivierung von NF- κ B sein (Wood *et al.*, 1998).

Wie aus Abbildung 4-4 ersichtlich ist, werden durch Bestrahlung mit ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung zwei vollkommen verschiedene Aktivierungswege von NF- κ B angeschaltet. Beiden gemeinsam ist die letztendliche Degradierung des Inhibitors I κ B α und dessen Ubiquitinierung und Abbau über das 26S Proteasom.

Bestrahlung mit einer Fluenz von 20J /m² UV-C führte zu einer signifikanten Verringerung der Transkriptmenge des Inhibitors I κ B α , die 8,5 Stunden nach Bestrahlung ein Minimum (-2,2fach) zeigte. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von I κ B α nach Exposition mit 4 Gy Röntgenstrahlen über einen Zeitraum bis 48 Stunden moderat induziert.

Die Expressionsanalyse nach Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung ergab ein recht uneinheitliches Bild. So zeigten die mit Alpha-Teilchen bestrahlten A549 Zellen bis vier Stunden nach Bestrahlung eine Herunterregulierung der Expression, die im weiteren Verlauf um Basalwerte schwankte. Zwei Stunden nach Bestrahlung mit Blei-Ionen konnte in den mit niedrigerer Fluenz bestrahlten Zellen eine tendenzielle Induktion der Genexpression beobachtet werden, während die mit hoher Fluenz bestrahlten Zellen einen Trend zur Herunterregulierung des Inhibitors zeigten.

Unter einer Dauerstimulation des NF- κ B Signalwegs, die durch Inkubation von A549 Zellen in TNF α -haltigem Wachstumsmedium (10 ng/ml) erreicht wurde, wurde bereits 30 Minuten nach Versuchsstart ein hochsignifikanter Anstieg der Transkriptmenge des Inhibitors detektiert (Abb. 4-5, Arenz *et al.*, 2006).

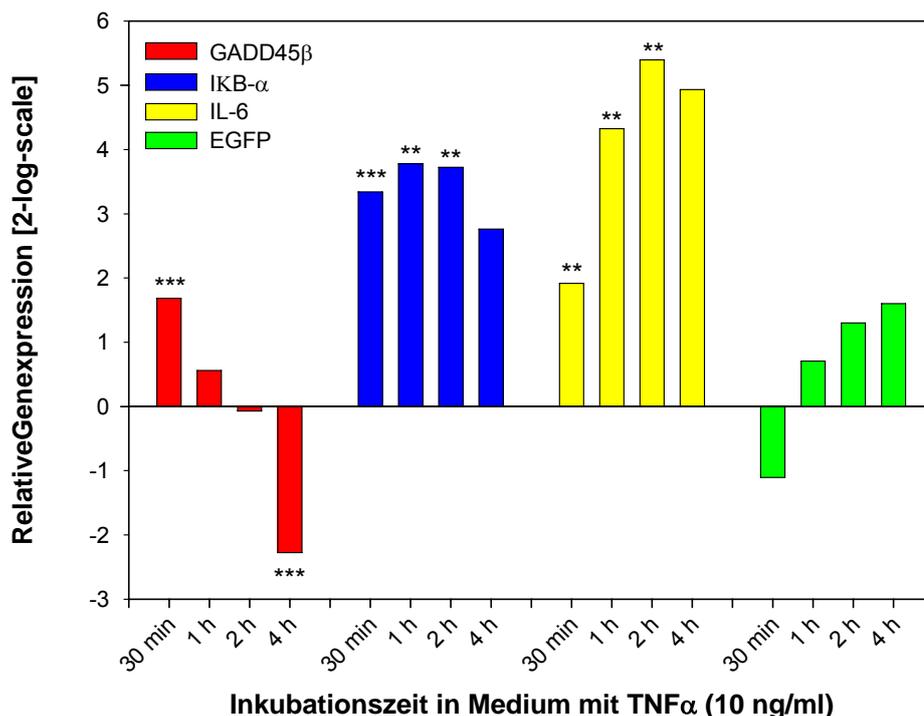


Abb. 4-5: Quantitative Analyse der IκBα-Expression in einer rekombinanten A549 Zelllinie. Das Reporter-gen EGFP steht in dieser Zelllinie unter der Kontrolle eines synthetischen Promotors, der neben einem Minimalpromotor vier NF-κB-Bindungsstellen enthält (A549-pNF-κB-EGFP/Neo) (Hellweg *et al.*, 2003). Nach Behandlung mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNFα (10 ng/ml) wurde zu den angegebenen Zeiten RNA isoliert und die Expression des TNFα-induzierbaren Gens GADD45β, des Inhibitors IκB-α, des Zytokins Interleukin 6 (IL-6) und EGFP durchgeführt. Signifikanzniveau im Randomisationstest *** p=0.001; ** p≤ 0.050 (Aus Arenz *et al.*, 2006)

Für die Zelllinie HEK konnte gezeigt werden, dass diese Hochregulierung unter Dauerstimulation über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Stunden anhält (Spitta, 2006). Nach Hellweg *et al.* (2003) ist NFκB auf Proteinebene bis 96 Stunden in Gegenwart von TNFα (10 ng/ml) an die DNA gebunden. Die Hochregulierung des Inhibitors IκBα scheint dem Schutz vor einer konstitutiven Expression unter Dauerstimulation zu dienen, da IκBα nicht nur bei der Hemmung, sondern auch bei der Beendigung der NF-κB-Aktivität eine entscheidende Rolle (Karin und Ben-Neriah, 2000; Chen *et al.*, 2001) spielt. NF-κB stimuliert unter anderem auch die Expression von IκB Genen: Neu synthetisiertes IκBα kann somit in den Zellkern eintreten, an NF-κB binden und die Bindung von NF-κB an dessen Bindungssequenz in der DNA verhindern. Über die am aminoterminalen Ende des IκBα befindlichen nukleären Exportsequenz (NES) kann der Komplex zurück ins Zytoplasma transportiert werden (Zabel *et al.*, 1993).

4.1.1.3.6 Abschließende Wertung der Ergebnisse der Expressionsanalysen nach Bestrahlung

Strahlung induziert eine komplexe Kaskade von Genen, deren Genprodukte an der Regulierung des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt sind. Während eine Modulation der Genexpression schadensrelevanter Gene in der aus primären Fibroblasten etablierten Zelllinie

nicht, oder nur in sehr moderater Weise nachgewiesen werden konnte, zeigten Zellen der immortalisierten Linien hingegen eine Induktion von Genen, die in der Regulation des Zellzyklus (**p21**) und der DNA-Reparatur (**GADD45 α** , **p53R2**) involviert sind. Es wurden ausschließlich nicht-synchronisierte Zellen untersucht, die sich mit einer Konfluenz von 60-70% in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Höhe der Induktion war sowohl von der Zelllinie, der Strahlenart und applizierten Dosis als auch von der Inkubationszeit nach Bestrahlung abhängig. So zeigten die mit UV-C behandelten Proben eine deutlich stärkere Veränderung der Expression der untersuchten Gene.

Durch Strahlung, insbesondere durch UV-C, wurde das in den Reparaturweg der homologen Rekombination (HR) involvierte Gen **BRCA2**, dessen Funktion noch unzureichend aufgeklärt ist, reprimiert. Eine Vielzahl der Genprodukte der *Homologen Rekombination* bzw. des *Nicht-homologen End-Joinings* (NHEJ) werden auf post-translationalem Weg reguliert bzw. weisen (wie auch andere Reparaturgene) hohe basale Expressionslevel auf, die für die Reparatur von DNA-Schäden ausreichen. Ob eine Reprimierung des BRCA2 Gens, wie von Fan (1998) und Andres (1998) postuliert, einen Teil einer zellulären Überlebensstrategie darstellt, kann nur nach weitergehenden Untersuchungen geklärt werden, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

In seiner Expression überwiegend reprimiert wurde auch das in die Kontrolle des Zellzyklus und dem Überleben nach DNA-Schaden involvierte Gen **GADD45 β** . Abgesehen von einer hoch signifikanten, UV-C induzierten Hochregulierung der mRNA Expression in AGS-Zellen, wiesen die mit anderen Strahlenqualitäten exponierten Zellen eine Verringerung der GADD45 β -Transkriptmenge auf.

Die transkriptionelle Aktivität des NF- κ B Pathways wurde über eine Quantifizierung des Inhibitors **I κ B α** untersucht und ergab ein recht uneinheitliches Bild. Mitglieder der NF- κ B Familie werden in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus in unterschiedlichen Aktivierungswegen induziert, die sich durch die an der Signalkaskade beteiligten Proteine unterscheiden. Bestrahlung mit UV-C konnte die transkriptionelle Aktivität des Inhibitors I κ B α nicht steigern, während Exposition mit 4 Gy Röntgenstrahlen eine moderate Induktion in A549 Zellen zeigten.

Für die Entwicklung eines indikativen Bioassay zur Detektion strahleninduzierter Genaktivität erschienen die Zellzyklus- und Reparaturgene p21 und GADD45 α sowie der im Jahr 2000 erstmals beschriebene Reparaturfaktor p53R2 als geeignete Markergene. Sowohl p21 als auch GADD45 α standen in den letzten Jahren im Focus zahlreicher Untersuchungen, die die zelluläre Antwort auf Strahlung unterschiedlicher Qualität untersucht haben. Um einen Beitrag zur Identifizierung der biologischen Relevanz des p53R2-Gens zu leisten, wurde die p53-Bindestelle des p53R2-Gens als regulatorisches Element in einen Expressionsvektor kloniert, der Vektor stabil in A549 Zellen transfiziert und die entstehende EGFP-Fluoreszenz nach Bestrahlung untersucht.

4.1.4. Reporter-Vektor-System auf Basis der p53-abhängigen Form der Ribonukleotid Reduktase

p53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von mehr als 150 Genen (Zhao *et al.*, 2000). Die p53-DNA-Konsensus-Sequenz wurde 1992 durch systematische Analyse genomischer DNA von El-Deiry *et al.* ermittelt. Sie besteht aus mindestens zwei hintereinander angeordneten Dekameren, wobei jedes Dekamer aus zwei invertierten pentameren *Repeats* besteht. Die Sequenz eines Dekamers setzt sich zusammen aus: 5.-[RRRCWWGYYY]-3. (R = A oder G, W = A oder T, Y = C oder T). Die im ersten Intron des p53R2-Gens von Tanaka *et al.* (2000) identifizierte Sequenz folgt den Anforderungen an eine p53-Konsensussequenz und wurde als regulatorisches Element, verstärkt durch einen Thymidinkinase-Minimalpromotor, in einen promotorlosen EGFP-Expressionsvektor (Clontech) kloniert. Nach Klonierung und Etablierung der Konstrukte in der humanen Zelllinie A549 wurde die rekombinante Zelllinie *A549-RRM2b-EGFP* (Klon 4.6) verschiedenen Bestrahlungsprotokollen unterworfen und die Induzierbarkeit des Testsystems mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Bei der Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie wird der übertragene Expressionsvektor mit einer Häufigkeit von 0,001 - 1% (Alam und Cook, 1990) in das Genom der Säugerzelle eingebaut. Für eine Integration in die Säugerzelle ist eine Linearisierung des Expressionsvektors notwendig, wodurch wichtige Bereiche zerstört werden können. Ist ein Bereich des EGFP-Gens zerstört, resultieren EGFP-negative Klone, die aber nach Einbau des intakten Resistenzgens überleben. Findet eine Linearisierung im Bereich des Resistenzgens statt, wird die Zelle hingegen sterben. Das Vorliegen nicht-induzierbarer Klone weist hingegen auf eine Linearisierung im Bereich des Promotors bzw. des regulatorischen Elements hin.

Zur Bestimmung der Insertionshäufigkeit der Vektor-DNA im Genom der Zelllinie *A549-RRM2b* wurde eine qRT-PCR Analyse durchgeführt und die Kopienzahl des Reportergens EGFP über eine absolute Quantifizierung gegen Vektor-DNA bekannter Konzentration ermittelt (3.4.2.6). Anhand dieser Untersuchung konnte ein Einbau von drei Kopien pro Säugerzelle nachgewiesen werden. Nach Middleton und Sugden (1994) werden *oriP*-enthaltende Plasmide mit einer Häufigkeit von 1 - 60 Kopien ins Genom von Säugerkellen eingebaut.

Neben der Häufigkeit ist der Integrationsort innerhalb des Säuger-genoms von Bedeutung. Erfolgt der Einbau in einem dicht gepackten Abschnitt des Chromosoms, der vermindert abgelesen wird, kann EGFP in seiner Expressionshöhe reduziert sein oder die Expression ganz fehlen. Erfolgt die Integration hingegen in einen physiologisch wichtigen Gen, kann dessen Funktion nach dem Einbau gemindert oder zerstört werden, was insbesondere bei der Untersuchung von DNA-Reparaturgenen Bedeutung hat. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl resistenter Klone hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit getestet und in Bezug auf ihre strahlenbiologischen Charakteristika und Wachstumseigenschaften mit der Ausgangszelllinie verglichen.

Um eine Analyse transfizierter Zellen anhand ihrer EGFP-Expression zu ermöglichen, muss eine Mindestmenge an Fluoreszenzprotein exprimiert werden, die eine Detektion mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Diese Menge ist nicht nur von der GFP-Variante, sondern auch von der Zelllinie abhängig und liegt z.B. für die Expression von EGFP in HeLa-Zellen bei etwa 30 nM (Diamond und DeMaggio, 2000). Zudem sollte die Expression des zu untersuchenden Gens möglichst hoch sein, um eine maximale Aussage zu erlangen. Nur bei Vorliegen dieser Voraussetzungen kann eine rasche Auf- als auch Abregulierung der Genexpression durch Verwendung der destabilisierten EGFP-Variante (d2EGFP, Abb. 8-27) gemessen werden. In diesem Vektor wird das *grün fluoreszierende Protein* durch Fusionierung des EGFP-Gens mit der PEST-Sequenz des murinen Ornithin-Decarboxylase-Gens (Li *et al.*, 1998) zum schnelleren zellulären Abbau markiert und weist daher eine Halbwertszeit von ungefähr drei Stunden auf. Die Etablierung einer rekombinanten Zelllinie *A549-RRM2b-d2EGFP* scheiterte, da die detektierbare EGFP-Fluoreszenz im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrollpopulation zu gering war (Daten nicht gezeigt). Die Ursache dafür, dass EGFP mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden in dem etablierten System nicht zum Erfolg führte, lässt sich vermutlich auf die niedrige Expressionsrate von p53R2 in der Zelle zurückführen. Die an der Stressantwort beteiligten Gene werden nicht nur auf relativ niedrigem Niveau exprimiert (Friedberg, 1995), sondern können darüber hinaus über hohe Basalwerte innerhalb der Zelle verfügen. Eine schnelle und signifikante Hochregulierung der Transkriptionsrate, wie sie in einem Vektorsystem mit einer destabilisierten EGFP-Variante erforderlich ist, wird vermutlich in Verbindung mit diesen so genannten *low abundant genes* nicht praktikabel sein. Aus diesen Gründen wurde die stabile EGFP-Variante im Vektorsystem verwendet. Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten zeigte in diesem System eine dosis- und zeitabhängige Induktion der RRM2b-Genexpression anhand einer messbaren Fluoreszenzzunahme. Durch Akkumulation des fluoreszierenden Proteins konnte innerhalb von 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzausbeute quantifiziert werden. In Abhängigkeit vom induzierten Schadensmaß konnte ein Fluoreszenzmaximum in einem Zeitraum von 48 bis 62 Stunden nach Induktion gefunden werden. Dieser Effekt liegt vermutlich in der langen Stabilität des Reporters begründet.

Die in der Zelllinie *A549-RRM2-EGFP* als induzierbar getesteten Klone wiesen unter nicht-induzierten Bedingungen übereinstimmend eine Hintergrundfluoreszenz auf, die durch Exposition mit Strahlung unterschiedlicher Qualität dosisabhängig gesteigert und über Durchflusszytometrie Analyse quantifiziert werden konnte (Abb. 3-63). Weder der Zeitraum zwischen Aussaat und Analyse, noch potentiell induzierende Faktoren in der Medienformulierung, waren für die Ausbildung dieser Hintergrundfluoreszenz verantwortlich. Hakansson *et al.* konnten 2006 in Versuchen mit Fibroblasten auf Proteinebene zeigen, dass Zellen, die sich in der Ruhephase des Zellzyklus befinden (so genannte *resting cells*), auf niedrigem Level konstitutiv p53R2, aber kein RRM2 exprimieren. Die Autoren postulieren, dass dieser niedrige Grundlevel zusammen mit einem Grundlevel an RRM1-Protein, für die Bereitstellung von DNA-Bausteinen für Reparaturpro-

zesse und die mitochondriale DNA-Synthese in G0/G1-Zellen essentiell ist. Diesen Ergebnissen zufolge lässt sich die Hintergrundfluoreszenz des induzierbaren Vektorsystems auf eine Basisaktivität des p53R2-Gens zurückführen.

Die bisherige Hypothese, dass p53 als latenter Transkriptionsfaktor erst nach Aktivierung durch genotoxischen Stress an spezifische Promotor-Elemente bindet, konnte durch aktuelle Untersuchungen widerlegt werden. So konnten Kaeser und Iggo (2002) zeigen, dass p53 auch konstitutiv an Promotoren der entsprechenden Zielgene *in vivo* bindet und genotoxischer Stress einen nur geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität von p53 hat. Zudem konnte gezeigt werden, dass einige dieser Promotoren in einer offenen Konformation, d.h. frei von Nukleosomen vorliegen (Xiao *et al.*, 1998; Braastad *et al.*, 2003) und auf einem niedrigen, basalen Level transkribiert werden, wobei p53 die Expression der untersuchten Gene nach Zellschädigung verstärkt (Braastad *et al.*, 2003).

Nach dem Modell von Xue *et al.* (2003) liegt p53R2 im Zytoplasma der Zelle gebunden an p53 vor, d.h. eine große Anzahl an p53 Bindestellen sind besetzt. Nach Induktion durch einen genotoxischen Schaden wird die Bindungsaffinität zu p53 herabgesetzt und p53R2 diffundiert in den Kern, um dort zusammen mit der großen Untereinheit hRRM1 ein funktionelles Holoenzym zu bilden und für die schnelle Bereitstellung von DNA-Bausteinen zur Reparatur zu sorgen. Aufgrund der Stabilisierung von p53 kann dieses die Transkription von p53R2 anschalten und die Menge an gebundenem p53R2 erhöhen, was in dem artifiziellen Reporter-Vektorsystem durch Kopplung an den Reporter sichtbar gemacht wird.

Die Spezifität der p53-Bindung konnte durch Behandlung der rekombinaten Zellen mit dem p53-Inhibitor Pifithrin (PFT) nachgewiesen werden (Abb. 3-66). Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des Reporterproteins nach UV-C vermittelter Induktion deutlich geringer ist als in der mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrollpopulation. Die Wirkung von Pifithrin ist nicht nur zeitlich begrenzt, sondern auch reversibel. Um das System gänzlich auszuschalten, sind vermutlich höhere Dosen des Inhibitors und/ oder längere (Vor-) Inkubationszeiten notwendig.

4.1.5. Verifizierung des entwickelten zellulären Testsystems unter Einsatz Weltraum-relevanter Strahlenqualitäten

Die Ergebnisse der Experimente der Induktionsversuche mit dem in A549-Zellen etablierten Testsystem zeigten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen im Dosisbereich von 0-16 Gy eine gute, reproduzierbare, dosisabhängige Ansprechbarkeit. Um eine für den Astronauten im Weltraum relevante Risikoabschätzung vornehmen zu können, kann die Verwendung von Röntgenstrahlung allerdings nur einen Modellcharakter haben. Daher war die Überprüfung des induzierbaren Zellsystems in Experimenten mit Strahlung höheren LETs (siehe 1.5.2.) unbedingt notwendig. Bestrahlungsexperimente mit beschleunigten Ionen zur Simulation einzelner Komponenten der Weltraumstrahlung wurde in Anlagen der Physikalisch Technischen

Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig und im Schwerionenbeschleuniger GANIL (Caen, Frankreich) vorgenommen.

Um relevante Dosisbereiche zu identifizieren, wurde eine strahlenbiologische Charakterisierung der A549 Linie mit dicht-ionisierender Strahlung durchgeführt. Während die Überlebenskurven nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (LET von 1-3 keV/μm) im Bereich niedriger Dosen eine Schulter zeigten, wiesen die Kurven nach Exposition mit dicht ionisierender Strahlung einen rein exponentiellen Verlauf ohne Ausbildung einer Schulter auf. Bei Exposition ionisierender Strahlung mit höheren LET-Werten entstehen aufgrund der großen räumlichen Nähe der Ionisationsereignisse vorwiegend schwere DNA-Schäden, die nur unzureichend repariert werden können. Ein Vergleich der D_0 -Werte der Überlebenskurven in A549- und HEK-Zellen nach Exposition mit Kohlenstoff- (LET 29,28 KeV/μm), Argon- (LET 232.2 keV/μm) und Blei-Ionen (LET-Wert 13000 keV/μm) zeigte, dass mit steigendem LET der Strahlung die Anzahl der Treffer (Fluenz) abnimmt, die zur Induktion eines letalen Ereignisses benötigt werden. Diese Informationen stellen die Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse mit den Rezeptor-Reporter-Zellsystemen dar. Während der Vitalitätstest in konstitutiv EGFP-exprimierenden Zellen (A549-pEGFP-N1; 3.4.1) ein Absterben der Zellen mit einer reduzierten Fluoreszenzausbeute anzeigt, erfordert der Nachweis einer induzierbaren Genexpression einen bestimmten Anteil überlebender Zellen in A549-RRM2b-Zellen. Aus den gezeigten Ergebnissen wurde der Dosisbereich ermittelt, der den Nachweis einer schadensrelevante Genexpression vermuten lässt.

Das Maximum der auf Basis der p53R2-induzierten Genexpression in A549-RRM2b-Zellen (Abb. 3-70) wurde 62 Stunden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung im Bereich von 8 Gy gefunden. Dies entspricht einem im Koloniebildungstest gemessenen Überlebenslevel von etwa 1 % (Abb. 3-7). Im Vitalitätstest konstitutiv EGFP-exprimierender Zellen konnte allerdings gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit dieser Dosis eine Vermehrungsfähigkeit der Zellen nach einem Zeitraum von 163 Stunden nach Bestrahlung vorliegt (Abb. 3-56 und 3-57). Während der Koloniebildungstest eine nahezu unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit der Zellen erfordert, zeigt der Vitalitätstest eine kurzzeitige Vermehrungsfähigkeit bei erhaltener Syntheseleistung der Zellen an. Diese Befunde lassen Schlussfolgerung auf die Entstehung möglicher strahleninduzierter Spätschäden (Tumore, Katarakte) zu. Neuere Untersuchungen zum Bystander-Effekt (Lorimore *et al.*, 2003; Kadhim und Wright, 1998) haben gezeigt, dass auch in unbestrahlten Zellen strahlenbedingte Effekte eine genetische Instabilität bedingen und zur Entwicklung von Spätfolgen nach Strahlenexposition beitragen.

Experimente mit dem induzierbaren Testsystem konnten zeigen, dass nach Bestrahlung mit schweren Ionen trotz Vorliegen eines höheren, möglicherweise wesentlich schlechter zu reparierenden Schadens, die Ribonukleotid-Reduktase induziert wird (Abb. 3-71 und 3-72). Dies kann als Hinweis auf die Beteiligung der p53-abhängigen Form der Ribonukleotid Reduktase auch bei der Reparatur der nach Hoch-LET-Bestrahlung induzierten Schäden gewertet werden.