Aus der Klinik für Strahlentherapie

Direktorin : Prof. Dr. Engenhart-Cabillic

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Strahlenbiologische Charakterisierung des murinen Lewis-Lung-Modells

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Fabian B. Eberle aus Immenstadt i.A.

Marburg 2013

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

TABELLENVERZEICHNIS VIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IX

Vorwort 1

1. Einleitung 2

1.1 Biologische Strahlenwirkung 3

1.2 Ionisierende Strahlung 3

1.3 Fragestellung und Zielsetzung 6

2. Literaturübersicht 8

2.1 Das Lewis-Lung-Carcinoma (LLC1) 8

2.2 Tumorprogression 10

2.3 Apoptose und p53 11

2.3.1 p53-und Reparaturgene 12

2.3.2 p53 und Apoptose regulierende Gene 13

2.3.3 p53 und Zellzyklus regulierende Gene 14

2.4. DNA-Doppelstrangbrüche und γH2AX 15

2.5 Die Dosis-Effekt-Beziehung 16

3. Material und Methoden 19

3.1 Zellkultur 19

3.1.1 Tumorzellen 19

3.1.2 Zellkulturmaterialien 19

3.1.3 Zellkulturmedien 19

3.1.4 Auftauen und Kultivierung der Zellen 20

3.1.5 Aussaatdichte 21

3.1.6 Plattierungseffizienz 21

3.1.8 Wachstumskurve und Verdopplungszeit 22

3.1.9 Morphologie, interpassagere Transformation (*in vitro*) 23

3.1.10 Analyse von Tumorschnitten (*in vivo*) 24

3.1.11 Karyotypisierung 24

3.1.12 Kryokonservierung 25

3.2. Histologische Analyse der LLC1-Zellen 25

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Kernflächen-Messung 25

3.2.2 γH2AX-Färbung zur Doppelstrangbruch-Visualisierung 26

3.2.3 Mikroskopische Auswertung (DNA-DSB) 27

3.3 Durchführung der Photonenbestrahlung 27

3.4 Generierung von Dosis-Effekt-Kurven 28

3.5 Durchflußzytometrie 29

3.5.1 Zellzyklusanalyse 29

3.5.2 Apoptoseinduktion 30

3.6 PCR-Analyse 31

3.6.1 Die RNA-Gewinnung 32

3.6.2 Bewertung der RNA 32

3.6.3 Herstellung der cDNA 33

3.6.4 Primerdesign und Primeroptimierung 34

3.6.5 Durchführung der quantitativen RT-PCR 35

3.6.6 Auswertung der RT-PCR 35

3.7 Westernblot 36

3.7.1 Proteinisolation und Quantifizierung 36

3.7.2 Gelelektrophorese: Auftrennung der Proteine im Gel 37

3.7.3 Membran-Transfer 38

3.7.4 Antikörperfärbung und Auswertung 38

3. 8. Mutationsanalyse des murinen p53 Gens (Trp53) in LLC1 38

4. Ergebnisse 41

4.1. Überblick 41

4.2 Wachstumbsedingungen 42

4.2.1 Wachstumskinetischer Einfluß der Aussaatdichte 42

4.2.2 Beschichtungen der Wachstumsflächen 43

4.2.3 Plattierungseffizienz 44

4.2.4 Wachstumskurve 46

4.2.5 Morphologie und interpassagere Transformation 48

4.2.6 Histologische Beurteilung von Tumorschnitten 50

4.3 Kernflächen und Besiedlungsdichte 52

4.4 Karyotypisierung der LLC1-Zellen 54

4.5 Strahlenbiologische Analyse 56

4.5.1 Dosis-Effekt-Kurve (DEK) 56

4.5.2 Durchflusszytometrische Analyse 58

4.5.2.1 Strahleninduzierte Zellzyklusarretierung 59

4.5.2.2 Strahleninduzierte Apoptoseinduktion 64

4.5.3 Doppelstrangbruchreparatur 67

4.5.4 Proteinstatus 70

4.5.4.1 CDKN1A (p21) 70

4.5.4.2 p53 72

4.5.5 Mutationsanalyse des murinen p53 Gens (Trp53) in LLC1 76

4.5.6 Änderung der Genexpression nach Bestrahlung 78

4.5.6.1 Genetische Modulatoren des Zellzyklusarrests in LLC1-Zellen 78

4.5.6.2 Genetische Modulatoren der DNA-Reparatur in LLC1-Zellen 80

4.5.6.3 Genetische Modulatoren der Apoptoseinduktion in LLC1-Zellen 82

5. Diskussion 85

5.1 Grundlegende Charakterisierung der LLC1-Zellen 85

5.1.1 Kultur-Milieu und Wachstumsbedingungen 85

5.2 Mikroskopische und immunhistochemische Charakterisierung 86

5.2.1 Morpholgie der LLC1-Zellen 86

5.2.2 Karyotypisiering der LLC1-Zellen 87

5.3 Strahlenbiologische Analyse 89

5.3.1 Beurteilung der Dosis-Effekt-Kurve 90

5.3.2 DNA-DSB bezogene Reparaturmechanismen (γH2AX) 92

5.3.3 Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest 94

5.3.4 p21 Status 96

5.3.5 p53 Status 97

5.3.6 Gen-Expressionsniveau nach Photonenbestrahlung 99

5.3.6.1 Genregulatoren der Zellzyklusprogression 100

5.3.6.2 Genregulatoren der Apoptose 101

5.3.6.3 Genregulatoren der DNA-Reparatur 103

5.3.7 Mutationsanalyse des murinen p53 Gens (Trp53) in LLC1 107

6. Zusammenfassung 110

7. Summary 112

8. Literaturverzeichnis 114

ANHANG 131

Material und Bezugsquellen (Artikel und Hersteller) 131

CURRICULUM VITAE 144

VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER 145

DANKSAGUNG 146

ERKLÄRUNG 148

EIGENE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE 149

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung1: p53-abhängige Regulation schadensrelevanter Gene.....13

Abbildung 2: DEK nach Photonenbestrahlung.....17

Abbildung 3: Zellzählung mittels Neubauerkammer.....23

Abbildung 4: Darstellung repräsentativer Dot Plots mit Quandrantenanalyse zur Quantifizierung der vitalen, früh-apoptotischen und spät-apoptotisch/ nekrotischen Zellen.....31

Abbildung 5: RNA-Qualitätsvergleich Standard / Probe.....33

Abbildung 6: Wachstum auf unterschiedlichen Wachstumsflächen.....44

Abbildung 7: Plattierungseffizienz LLC1.....46

Abbildung 8: Wachstumskurve LLC1.....47

Abbildung 9: Phänotypen der LLC1-Zellen in vitro.....49

Abbildung 10: Mauslunge mit LLC1-Tumor (HE gefärbter Gefrierschnitt).....51

Abbildung 11: Verteilung der LLC1-Kernflächen.....53

Abbildung 12: Karyogramm der LLC1-Zellen.....55

Abbildung 13: Klonogenes Überleben LLC1 nach Photonebestrahlung.....58

Abbildung 14a: LLC1-Zellen in der G2-Phase nach Photonenbestrahlung.....61

Abbildung 14b: LLC1-Zellen in der G1-Phase nach Photonenbestrahlung.....62

Abbildung 15: Zellzyklusverteilung der LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung..63

Abbildung 16: Apoptoseinduktion der LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung....65

Abbildung 17: FACS dot-plot LLC1-Zellen 24h nach Photonenbestrahlung.....66

Abbildung 18: γH2AX-Foci nach Photonbestrahlung mit 1 Gy.....68

Abbildung 19: γH2AX-Foci in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung mit 1 Gy....69

Abbildung 20: p21-Expression in LLC1- und A549-Zellen 3 h nach Bestrahlung 71

Abbildung 21: p21-Expression in LLC1- und A549-Zellen.....71

Abbildung 22: Westernblot zur GAPDH- und p53-Expression in LLC1-Zellen.....74

Abbildung 23: p53-Expressionsniveau unterschiedlicher Zellen 75

Abbildung 24: Trp 53 Basensequenz 1 aus LLC1 Zellen (fwd sequence 5´-3).....77

Abbildung 25: Trp 53 Basensequenz 3 aus LLC1 Zellen mit Leserichtung 3`5`..77

Abbildung 26: Zellzyklus-Regulation in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung..79

Abbildung 27: Expression DNA-Reparatur-assoziierter Gene in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung.....81

Abbildung 28: Apoptose-Regulation in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung...84

Abbildung 29: Vorversuch zur m-FISH Analyse der LLC1-Zellen.....89

Abbildung 30: Zellzyklus, Apoptose und genetische Modulatoren.....99

Abbildung 31: Ribonukleotidreduktase und DNA-Reparatur (Xue et al., 2003)... 105

Abbildung 32: Code-Sonne mit stop-codon UAA (modifiziert nach Crick)..... 107

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Relativer biologischer Effekt (RBE) ionisierender Strahlug……..…..3

Tabelle 2: LLC1-Zellinokulation zur Dosiseffektkurve……..27

Tabelle 3: Verwendete Primer Zielgene……33

Tabelle 4: Verwendete Primer Referenzgene……..33

Tabelle 5: Trp 53 Gesamtfragment und analysierte Sequenzen……..48

Tabelle 6: Entwicklung der Zellzahl bei variablen Aussaatdichten……..42

Tabelle 7: Dosis-Wirkungsbeziehungen bei LLC1-Zellen……56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MHC	Major Histocompatibility Complex
°C	Grad Celsius
µl	Mikro-Liter
AK	Antikörper
ca.	Circa
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
d	Tage
d.F.	der Fälle
d.h.	das heißt
DEK	Dosis-Effekt-Kurve
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DSB	Doppelstrangbruch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Gy	Gray
h	Stunde
IK	Inkubation
LET	Linearer Energietransfer
LLC	Lewis Lung Carcinoma
LLC1	Lewis Lung Carcinoma Line 1 (Subklon der LLC)
LLCab	Lewis Lung Carcinoma Linie 2 (bone type A) (Subklon der LLC)
LLCL3	Lewis Lung Carcinoma Line 3 (Subklon der LLC)

LQ	Linear-quadratisches (Modell)
m-FISH	Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
min	Minute
ml	Milli-Liter
PE	Plattierungseffizienz
PI	Propidiumiodid
post rad	post radiationem
PS	Petrischale(n)
rEN	relatives Genexpressionsniveau
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SHMT	Single-Hit-Multi-Target (Modell)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
γH2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

Vorwort

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Zeitraum von April 2008 bis Dezember 2009 im Zentrum für Radiologie in der Klinik für Strahlentherapie (Leiterin Frau Prof. Dr. Engenhart-Cabillic) durchgeführt.

Die Arbeit enstand in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Engenhart-Cabillic wurde von Frau Dr. rer. nat. Arenz betreut.

Die vorliegende Arbeit ist dem Gebiet der Radioonkologie und der Strahlenbiologie zuzuordnen.

Das murine Lewis-Lung-Modell ist ein im tierexperimentellen Bereich weit verbreitetes pulmonales Adenokarzinom-Modell, dem insbesondere für *in vivo* Untersuchungen an Mäusen eine hohe Wertigkeit beizumessen ist. Hauptvorteil dieses Modells gegenüber artifiziellen humanen Modellen (z.B. A 549) im murinen Tierexperiment ist dabei das Ausbleiben unerwünschter biologischer Prozesse wie Abkapselung, Abszedierung und Inflammation, die insbesondere nach ektoper Implantation die *in vivo* Generierung reproduzierbarer Ergebnisse limitieren. Durch das Ausbleiben dieser Prozesse sowohl bei orthotoper als auch bei ektoper Implantation muriner LLC-Tumorzellen in Mäuse können dabei *in vivo* in Mäusen deutlich bessere, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Ziel dieser Arbeit war die *in vitro* Charakterisierung und erstmalige strahlenbiologische Analyse der LLC1-Zelllinie nach Bestrahlung mit dünn ionisierender Photonenstrahlung als Basis weiterführender Experimente *in vivo*. Dazu wurden zunächst grundlegende Wachstumsbedingungen der LLC1-Zellen *in vitro* analysiert und charakterisiert.
Ferner wurden strahlenbiologisch relevante Endpunkte wie das Überleben, die zelluläre Reparaturkapazität, die Induktion der Apoptose, das Verhalten des Zellzyklus und die Modulation schadensrelevanter Gene nach Bestrahlung mit dünn ionisierender Strahlung *in vitro* untersucht.

1. Einleitung

Das Bronchialkarzinom stellt die häufigste Ursache malignom-assoziierter Mortalität in den Industrieländern dar (Ferlay et al., 2010, Parkin et al., 2005). Ein zentraler Bestandteil einer multidisziplinären Therapie ist die Strahlentherapie. Dabei hängen strahlentherapeutische Behandlungserfolge des Bronchialkarzinoms wesentlich von der Strahlensensitivität der Tumorzellen ab. Insbesondere für die gegenüber Photonen resistenten Tumore werden durch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen bessere Tumorkontrollraten und somit eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten erwartet (Kraft, 2000). Eine Grundvoraussetzung für die Optimierung der Strahlentherapie mit Kohlenstoffionen ist es, Veränderungen der biologischen Wirkung im Normalgewebe und im Tumor unter Berücksichtigung seines speziellen Mikromilieus zu verstehen und diese Erkenntnisse bei der Bestrahlungsplanung zu berücksichtigen. Zum Verständnis der komplexen Prozesse, die auf zellulärer Ebene und im Tumorgewebe nach Strahlung initiiert werden, ist die Verwendung von Primärmaterial aus Tumorresektaten nur bedingt einsetzbar, da hier von einer genetisch determinierten, interindividuellen Strahlenempfindlichkeit ausgegangen werden muss (Erhard et al., 2005). Einen wichtigen Beitrag leisten daher in diesem Zusammenhang gut untersuchte und etablierte Modellzelllinien und Tumormodelle. Zu diesen etablierten Zellkultur- und Tiermodellen in der medizinischen Tumorforschung gehört das Lewis-Lung-Modell (LLC, ATCC-Nr. CRL-1642); dieses ist ein murines, hochmalignes pulmonales Adenokarzinom der Maus.

Trotz der weitverbreiteten Anwendung dieses Tumormodells im Tierexperiment ist das strahlenbiologische Verhalten von LLC-Einzelzellen nach Exposition gegenüber dünn ionisierender Photonenstrahlung *in vitro* bisher nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit ist die erstmalige strahlenbiologische Charakterisierung der LLC1-Zellen anhand der Analyse zellulärer Strahlensensitivität, Reparaturkapazität, bestrahlungsinduzierten Apoptose, Zellzyklusarretierung und der strahleninduzierten Genexpressionsänderung relevanter Gene sowie des p53-Status in LLC1-Zellen.

1.1 Biologische Strahlenwirkung

Für biologische Organismen haben Ionisationsprozesse eine Schädigung von Zellorganellen, Membranschäden, Veränderungen des Zellstoffwechsels (Proteinsynthese) oder Veränderungen der DNA mit Mutation, Proteindenaturierung oder final resultiernden Zelltod zur Folge. Das Ausmaß des relativen biologischen Effekts (RBE) einer Strahlung ist von einer Vielzahl Faktoren wie dem linearen Energietransfer (LET) einer Strahlung, der Strahlenart, der Dosis, sowie deren Fraktionierung abhängig. Darüber hinaus nehmen noch milieubedingte und zelluläre Faktoren wie der Sauerstoffeffekt, das Vorliegen chemischer Modifikatoren (Radioprotektoren/Radiosensitizer), die Zellzyklusphase, der Zelldifferenzierungsgrad (Grading), die Temperatur und die Größe des Bestrahlungsvolumens Einfluss auf die Strahlenwirkung (Krieger, 2009a). Radiosensitivstes Target ist die DNA, daher steigt mit der vorhandenen DNA-Menge auch die Radiosensitivität (Munro, 1970, Altmann et al., 1970) des biologischen Zielvolumens. Bei Bestrahlung mit 1 Gy werden in einer Zelle zwischen 4000 und 5000 DNA-Schäden induziert, dabei entstehen hauptsächlich Basenschäden, aber auch Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Schäden an Protein-DNA-Verbindungen und komplexe Schäden wie das gleichzeitige Auftreten von Basenschäden und Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen (Jenner et al., 1998, Jenner et al., 2001, Newman et al., 2000).

1.2 Ionisierende Strahlung

Strahlung ist definiert als Übertragung von Energie oder Teilchen und Energie ohne Kopplung an ein Transportmedium (Reiser et al., 2006). Alle Arten von Strahlung, die aufgrund ihrer kinetischen Energie oder ihrer Quantenenergie in der Lage sind, Elektronen aus dem Verbund eines Atoms zu lösen, werden als ionisierende Strahlung bezeichnet (Geisse, 2010). Anschaulich kann zwischen Wellenstrahlung wie Röntgenstrahlung (elektromagnetische Strahlung mit 100-250 keV) oder γ-Strahlung (elektromagnetische Strahlung über 200 keV) und Korpuskularstrahlung wie α-Strahlung (Heliumkern aus zwei Neutronen und zwei Protonen), β-Strahlung (geladene Elektronen und Neutrino), Protonen (positiv geladener Atombestandteil), Neutronen (la-

dungsneutraler Atombestandteil) und Ionenstrahlung (geladene Moleküle) mit Energien über 10-100 eV unterschieden werden *(vgl. Tab1)*.

	Strahlenart	**Energie(MeV)**	**LET(keV/µm)**	**RBE**
niedrig-LET ***dünn ionisierend***	Röntgenstrahlung	0,2	2,5	1
	γ-Strahlung	1,25	0,3	0,5
hoch-LET ***dicht ionisierend***	Protonenstrahlung	2	17	1,2
	^{12}C-Ionenstrahlung	10-400	15-200	>3

Tabelle 1: Relativer biologischer Effekt (RBE) ionisierender Strahlung

Bei Bestrahlung von Materie unterscheiden sich die Strahlungsarten hinsichtlich der Verteilung der Energiedeposition. Dabei induzieren Photonenstrahlen (Röntgen- und γ-Strahlen) gleichmäßig verteilte Ionisationsereignisse mit großem Abstand zueinander; daher werden sie als „dünn ionisierende Strahlung" bezeichnet *(vgl. Tab. 1)*. Ionenstrahlung und Protonenstrahlung hingegen werden aufgrund dicht gelegener Ionisationsereignisse in kleinen kompakten Volumina um die Bahnspur des Teilchens herum zu den „dicht ionisierenden Strahlen" gezählt. Durch die ionisierende Wechselwirkung der Strahlen, im Sinne von Addition oder Entfernung geladener Teilchen von Atomen oder Molekülen, kann es durch Zerstörung chemischer Bindungen zu Schadensereignissen in bestrahlter Materie kommen. Dabei finden unmittelbar einstufige, direkte Ionisationsprozesse an organischen Molekülen und mehrstufige, indirekte Ionisationsprozesse über chemische Sekundärprozesse (Radiolyse von Wasser) statt (Krieger, 2009a).

Die von einer Materie absorbierte Energie einer ionisierenden Strahlung pro Masseneinheit wird als Dosis (D) definiert. Die Dosis wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben (1 Gy=1 Joule/kg) (Krieger, 2009c). Die Zahl der durch die Strahlung hervorgerufenen Ionisationsereignisse in einem biologischen Zielvolumen ist die ausschlaggebende Komponente für den biologischen Effekt der Strahlung (Kraft, 2000, Schweinfurth, 2007). Diese mikroskopische Energieverteilung wird durch den linearen Energietransfer (LET) einer Strahlung ausgedrückt (Krieger, 2009b). Der LET einer Strahlung ist zentraler Parame-

ter für den relativen biologischen Effekt (RBE) einer Strahlung. Hoch-LET-Strahlung zeigt meist einen höheren RBE als Niedrig-LET-Strahlung. Der RBE charakterisiert die für einen bestimmten biologischen Effekt erforderliche Energiedosis einer Strahlenart in Relation zu einer Referenzstrahlung (z.B. 250 keV Röntgenstrahlung). Da der LET und somit auch die biologische Wirksamkeit der meisten ionisierenden Strahlenarten höher sind als die der Referenzstrahlung, haben viele Strahlungsarten RBE-Werte größer 1 *(vgl. Tab1)* (Kraft, 2000).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Trotz der weitverbreiteten Anwendung des LLC-Tumormodells im Tierexperiment ist das strahlenbiologische Verhalten der LLC 1-Zellen nach Exposition gegenüber dünn ionisierender Photonenstrahlung *in vitro* bisher nicht untersucht worden. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die LLC1-Zellen strahlenbiologisch zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst das Wachstumsverhalten der Zellen *in vitro* charakterisiert und die Kultivierungsbedingungen optimiert. Dies umfasste:

- Ermittlung der optimalen Zusammensetzung des Wachstumsmediums.
- Generieren von Wachstumskurven zur Ermittlung der Verdopplungszeiten in Abhängigkeit verschiedener Aussaatdichten.
- Einfluss unterschiedlicher Beschichtungen der Wachstumsflächen auf die Wachstumskinetik der Zellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Lewis-Lung-Tumor pathologisch und molekularpathologisch untersucht. Dazu gehörte

- Histologische Phänotypisierung von Tumorschnitten.
- Ermittlung der Kernfläche als relevantes Target bei Ionenbestrahlung.
- p53-Status der LLC1-Zellen.
- Karyotypisierung des LLC1-Genoms.

Nach Analyse der physiologischen Verhaltensweisen folgte die strahlenbiologische Untersuchung der LLC1 Zellen *in vitro* nach Exposition gegenüber dünn ionisierender Strahlung als Grundstein weiterführender Experimente mit dicht ionisierender Partikelstrahlung. Zu den strahlenbiologisch relevanten Endpunkten, die in diesem Rahmen untersucht wurden, zählten:

- Generierung von Dosis-Effekt-Kurven zur Analyse des klonogenen Überlebens und der Strahlenempfindlichkeit.
- Analyse des p53-Status.
- Induktion und Reparatur von Strahlenschäden anhand des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises des phosphorylierten Histons H2AX als Indikator der Doppelstrangbruchreparatur.
- Einfluss der Strahlung auf die Zellzyklusprogression mittels durchflusszytometrischer Analysen
- Apoptoseinduktion nach Strahlenexposition.
- Expressionsänderung schadensrelevanter Gene mittels quantitativer RT-PCR.

2. Literaturübersicht

2.1 Das Lewis-Lung-Carcinoma (LLC1)

1951 wurde das Lewis-Lung-Modell im Sinne eines spontan in einer C57BL-Maus emergierten und wachsenden Adenokarzinoms der Lunge von M.R. Lewis als transplantierbares Tumormodell der Maus etabliert. Seitdem wurde dieses Modell weitverbreitet als Standardtumormodell vor allem bei der Erforschung von Metastasierungsprozessen und chemotherapeutischen Wirkmechanismen *in vivo* eingesetzt. J.S. Bertram und P. Janik etablierten und adaptierten 1980 eine Zell-Klonlinie (LLC1) des ursprünglich *in vivo* wachsenden Lewis-Lung-Carcinomas an ein Wachstum *in vitro*. Dabei wurden die Zellen aus dem in einer C57BL-Maus wachsenden Adenokarzinom gewonnen, in die zuvor primäre Lewis-Lung-Zellen intramuskulär implantiert wurden. Die extrahierten Zellen wurden in Kultur gebracht und hinsichtlich eines grundlegenden Kultur-Milieus charakterisiert. Primär wurden ihr Verhalten bei erneuter Reimplantation und ihr *in vitro* Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika analysiert. Bei Reimplantation in Mäuse zeigte sich eine weiterhin erhaltene, hohe murine Tumorigenität (Bertram and Janik, 1980, Takasu et al., 1999).

Nach der Entstehung 1951 wurde das Lewis-Lung-Modell in der wissenschaftlichen Praxis vorzugsweise zur Analyse der Tumormorphologie, Invasionskinetik und der Wachstums- und Metastasierungscharakteristik *in vivo* herangezogen (Fidler, 1978, Mayo, 1972). Die Utilisation des Lewis-Lung-Modells als experimentelles System für therapeutische Untersuchungsansätze wurde als klinisch relevant gewertet (Ovejera et al., 1975) und war daher zur Betrachtung chemotherapeutischer Wirkmechanismen *in vivo* (Mayo et al., 1972, Sugiura and Stock, 1955) etabliert.

In vivo zeigten sich Disparitäten der physiologischen Aktivität, insbesondere der tumorigenen Kapazität und des metastatischen Potentials (van Lamsweerde et al., 1983, Henry et al., 1983, Takenaga, 1986, Takenaga et al., 1994, Takenaga et al., 1997, Koshikawa et al., 2000, Koshikawa et al., 2003,

Koshikawa et al., 2006). Ursächlich dafür war die Ausbildung diverser Subklone der LLC Modelle, die im Laufe ihrer Verwendung entstanden. Die Theorien zur Entstehung dieser Subklone umfassten, durch biochemisch aktive Agenzien induzierte (Takenaga, 1986), durch kultivierungsbedingte Selektion und Klonung bei vorbestehender parentaler Heterogenität (Henry et al., 1983, van Lamsweerde et al., 1983, Fidler and Kripke, 1977) entstandene sowie spontan (van Lamsweerde et al., 1983) im Sinne einer Tumorprogression (Takenaga, 1986) auftretende Klone.

Heute werden drei Hauptklone der ursprünglich aus der C57BL-Maus extrahierten LLC-Zellen klassifiziert, die sich phänotypisch vor allem anhand ihrer MHC-Expression und ihrer tumorigenen Aktivität unterscheiden (Storey et al., 2004): LLCab (isoliert aus Knochenmetastasen) mit niedrigem MHC Expressionsniveau, LLC1 (isoliert aus Lungenmetastasen) mit moderatem MHC Expressionsniveau und LLCC3 (isoliert aus Lungenmetastasen) mit hohem MHC Expressionsniveau. Das Metastasierungspotential geht hierbei konkordant mit dem MHC Expressionsniveau, die Tumorigenität verhält sich umgekehrt proportional dazu. Als hinsichtlich des linearen Wachstums konsistentestes *in vivo* Modell mit geringster Wachstumsvariabilität erwies sich das in dieser Arbeit untersuchte LLC1-Subklonmodell (Storey et al., 2004).

Die oben angesprochene phänotypische Variabilität als Ausdruck einer schrittweisen, spontan oder unter Einfluss der Kulturbedingungen auftretenden Selektion, zeigt sich auch bei *in vitro* Kultivierung in Form veränderter Phänotypen. Die vielfältige Morphologie und Größe, unterschiedliche Adhäsionseigenschaften, Migrationsfähigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit, sowie wechselnder Proteingehalt wurde schon früh auf inhärente zelluläre Charakteristika der unterschiedlichen LLC-Subklone zurückgeführt (Young et al., 1985). So können sich *in vitro*, insbesondere bei lang andauernder Kultivierung spontan neue Phänotypen bilden (van Lamsweerde et al., 1983). Diese *in vitro* Charakteristik lässt wiederum Rückschlüsse auf das Verhalten des entsprechenden Klons *in vivo* zu. Hierbei korreliert die metastatische Potenz der Subklone *in vivo* negativ mit ihrer Wachstumsgeschwindigkeit *in vitro* (Henry et al., 1983).

Hinsichtlich der strahlenbiologischen Charakteristik *in vitro* finden sich keine Daten.

2.2 Tumorprogression

Die Tumorprogression deklariert einen Prozess, bei dem sich die malignen Zellen innerhalb einer neoplastischen Struktur bezüglich einer Vielzahl zellulärer Phänotypen wie Zellmorphologie, Wachstumsrate, Adhäsionsfähigkeit, Enzymaktivität, Proteingehalt, Invasionsfähigkeit, Metastasierungspotential und chemotherapeutischer Sensibilität entwickeln und der zu einer ausgeprägten neoplastischen Heterogenität führt. In einigen Fällen findet ein Phänotypendrift der Tumorzellen hin zu höher oder niedriger malignen Formen statt (Takenaga, 1986). Neben impermanenten Modifikationen der DNA spielen dabei eine Vielzahl postgenetischer Modifikationen wie z.B. die Hyperacetylierung von Histonen eine wichtige Rolle. Oft sind die aus diesen postgenetischen Mechanismen hervorgehenden phänotypischen Alterationen transient und instabil. Treten sie aber gleichzeitig zusammen mit genetischen Modifikationen auf, können die resultierenden Phänotypen stabil und vererbbar sein. Dieses Phänomen ist auch bei LLC-Zellen zu beobachten (Takenaga, 1986).

Neuere Untersuchungen legen eine multilaterale Genese der phänotypischen Heterogenität nahe. Diese umfasst die Variabilität des zellulären Rezeptorrepertoires im Sinne unterschiedlicher MHC-Expression und variablen Oberflächenlectingehalts (Gaenko et al., 2002), die Apoptoseresistenz (Takasu et al., 1999), die Überexpression des antiapoptotischen Mcl-1 Proteins (Koshikawa et al., 2006), das VEGF-Genpromoter (HRE) abhängige Metastasierungspotential (Koshikawa et al., 2000, Koshikawa et al., 2003) und die Motilitätseigenschaften in Abhängigkeit des kalziumbindenden Proteins pEL98 (Takenaga et al., 1994, Takenaga et al., 1997). Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli wie Entzug von Wachstumsfaktoren oder Glucose-Entzug, Hypoxie und Stress am Endoplasmatischen Retikulum (Takasu et al., 1999) stellt den Hauptgrund für ein hohes Metastasierungspotential von Tumorzellen dar (Glinsky and Glinsky, 1996, McConkey et al., 1996, Glinsky, 1997, Del Bufalo et al., 1997, Inbal et al., 1997, Shtivelman,

1997, Takaoka et al., 1997, Fernández et al., 2000, Lowe and Lin, 2000, Wong et al., 2001).

2.3 Apoptose und p53

Der physiologische Mechanismus der Zelle sich selbst zu zerstören wird Apoptose genannt (Kerr et al., 1972). Ziel der Apoptose ist die Wahrung der Gewebshomöostase durch Entfernung irreparabel geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen. Apoptotische Zellen zeigen nachweisbare biochemische und morphologische Kriterien. Dabei kondensieren initial Zytoplasma und Zellkern, das Zellvolumen nimmt ab und die Zellmembran bildet Evaginationen (Arends and Wyllie, 1991, Wyllie, 1993). Im Anschluss werden Membranen und DNA fragmentiert und in membranumhüllte, apoptotische Vesikel überführt, die von Makrophagen phagozytiert werden. Die wichtigste Komponente des kontrollierten Zelltodes sind spezifische Proteasen (Caspasen), die durch Spaltung einer Vielzahl von Proteinen zur Zerstörung der Zelle maßgeblich beitragen (Thornberry and Lazebnik, 1998, Earnshaw et al., 1999).

Die Apoptose kann durch extrinsischen zellulären Stress z.B. Exposition gegenüber ionisierender Strahlung induziert werden. Wichtigster Regulator ist hierbei das Tumorsuppressor-Gen p53, das grundlegende physiologische Prozesse der zellulären Strahlenantwort wie Zellzyklusarrest, DNA-Reparaturprozesse oder Apoptoseinduktion steuert und somit die genomische Integrität wahrt (Hollstein et al., 1991, Levine et al., 1991, Harris and Hollstein, 1993). Bei Vorliegen von DNA-Schäden kommt es durch gesteigerte Translation und erhöhte Proteinstabilität (Maltzman and Czyzyk, 1984, Kastan et al., 1991, Kastan et al., 1992, Kuerbitz et al., 1992) zu einer Stabilisierung und Anreicherung von p53 Protein in der betroffenen Zelle. Durch Phosphorylierung, Acetylierung oder Glykosylierung (Giaccia and Kastan, 1998) wird p53 aktiviert und wirkt dann als Transkriptionsfaktor regulatorischer Gene der DNA-Reparatur, der Apoptose oder des Zellzyklusarrests (Levine et al., 1991, Levine, 1997, el-Deiry, 1998, Zhao et al., 2000, Vogelstein et al., 2000). Damit ist p53 als unumgänglicher Knotenpunkt zwischen zellulären Reparatur- und Zellzyklus-Regulationsmechanismen anzusehen *(vgl.*

Abb. 1). In der Klinik stellen die malignen Neoplasien den größten und zugleich heterogensten Anteil der, auf veränderte regulatorische Zellmechanismen zurückzuführenden, genetisch bedingten Erkrankungen. Trotz dieser genetischen Heterogenität sind bestimmte Gene auffallend häufig in ihrer Funktionalität verändert. Zu diesen klinisch interessanten Genen gehört auch angesprochenes Tumorsupressorgen p53, für das in 50-60% aller menschlichen Tumoren Mutationen nachgewiesen werden konnte (Hollstein et al., 1991, Dornreiter, 2006).

2.3.1 p53-und Reparaturgene

Zur DNA-Reparatur fungiert p53 entweder als eigenständiges Detektions- und Reparaturprotein (Lee et al., 1995, Janus et al., 1999, Albrechtsen et al., 1999) oder aktiviert als sequenzspezifischer Promoter andere p53 abhängige Reparaturproteine wie GADD45 (Hermeking et al., 1997), ERCC1(Rahn et al., 2010) und RRM2b (Tanaka et al., 2000). Über diese beiden Funktionsmechanismen ist p53 an allen bekannten DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Sengupta and Harris, 2005) *(*vgl. *Abb. 1)*. Hauptaufgaben des durch ionisierende Strahlung induzierbaren GADD45-Genproduktes (Hollander et al., 1993) sind die Stimulation der Nucleotid-Exzisionsreparatur sowie die Inhibition des G1/S-Überganges und des G2/M-Überganges (vgl. 2.3.3).
Das ERCC1-Genprodukt ist über eine 5´-Inzisions-Endonucleaseaktivierung an der Nucleotid-Exzisionsreparatur beteiligt (Prasher et al., 2005). Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Crosslink-Mutationen zwischen den DNA-Strängen (Rahn et al., 2010).
Das RRM2b-Genprodukt ist eine spezielle Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase, einem Enzym, das durch die Konversion von Ribonucleosid-Diphosphaten zu Desoxyribonukleosiden ein unentbehrliches Produkt der DNA-Synthese und –Reparatur G1 oder G2 arretierter Zellen bereitstellt (Guittet et al., 2001).

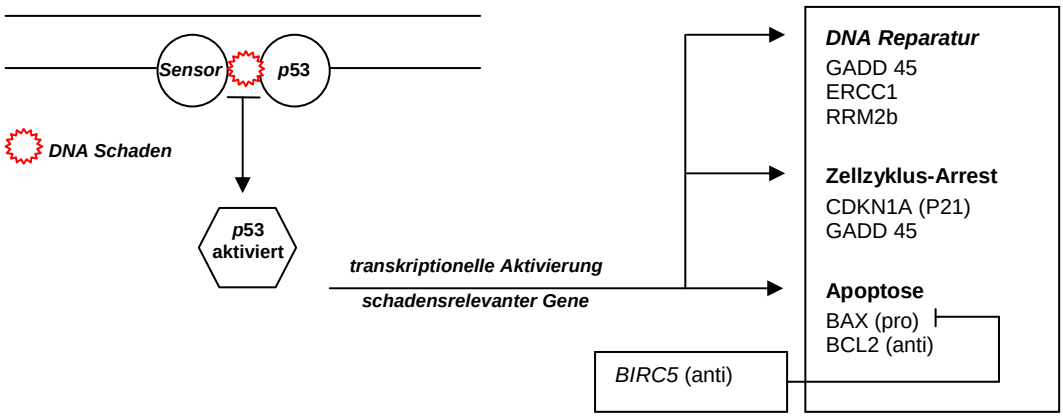


Abbildung1: p53-abhängige Regulation schadensrelevanter Gene (m.n. Levine, 1997)

Nach Induktion eines DNA-Schadens z.B. durch ionisierende Strahlen wird das an der Schadensstelle vorliegende p53 durch ein DNA-Schaden-Detektorprotein (Sensor) phosphoryliert und liegt dann als aktive Form vor (p53 stabilisiert). Aktiviertes p53 reguliert die Transkriptionsaktivität verschiedener schadensrelevanter Gene und nimmt somit Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen, den Zellzyklusarrest und die Induktion (pro) oder Hemmung (anti) der Apoptose (Levine, 1997, Ko and Prives, 1996). BIRC5 (Survivin) wirkt hierbei als p53-unabhängiger antiapoptotischer Regulator (Tamm et al., 1998).

2.3.2 p53 und Apoptose regulierende Gene

Die Steuerung der Apoptose erfolgt über transkriptionelle Aktivierung zweier antagonisierender Proteine (Chao and Korsmeyer, 1998, Oltvai et al., 1993), dem antiapoptotischen BCL-2 (B-Cell-Lymphoma-2-Protein) (Yin et al., 1995) auf der einen und dem proapoptotischem BAX (BCL-X-activating-Protein) (Miyashita and Reed, 1995, Levine, 1997) auf der anderen Seite. Eine Überexpression von BCL-2 führt bei malignen Tumoren zu einer verstärkten Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie und zeigt die klinische Relevanz dieser genetischen Regulationsmechanismen (Strasser et al., 1997, Collecchi et al., 1998, Rakozy et al., 1998). So exprimieren zum Beispiel Zellen mit langer Lebensdauer (Villuendas et al., 1991, Hockenbery et al., 1991) antiapoptotisches BCL-2 auf mitochondrialen, endoplasmatischen und nukleä-

ren Membranen (Hockenbery et al., 1990).

Über die p53 gesteuerte Apoptose hinaus existieren noch weitere p53 unabhängige Regulationsmechanismen. Dazu zählt beispielsweise die Steuerung der Apoptose durch die IAP-Proteinfamilie, zu der auch das BIRC5-Protein (Survivin) zählt. BIRC5 wird vor allem von neoplastischen Zellen exprimiert und entfaltet seine antiapoptotische Wirkung über eine Zymogen-Progressionshemmung, wobei vor allem die Aktivierung der Prokaspasen 3 und 7 gehemmt wird (Tamm et al., 1998).

Der Abbau des p53 Proteins (Haupt et al., 1997, Honda et al., 1997, Kubbutat et al., 1997) wird durch das ebenfalls p53 abhängige MDM-2 Protoonkogen (Barak et al., 1993, Wu et al., 1993) über einen Mechanismus negativer Rückkopplung gesteuert.

2.3.3 p53 und Zellzyklus regulierende Gene

Der Zellzyklusarrest ist eine zelluläre Reaktion auf extrinsischen Stress mit DNA-Schädigung. Dieser versetzt die Zelle in die Lage, Reparaturen an der DNA vorzunehmen und eine Inaktivierung der Teilung oder die Apoptose einzuleiten. Grundsätzlich wird ein permanenter, zeitlich unbegrenzter von einem transienten, zeitlich begrenzten Arrest unterschieden. Ein transienter Arrest findet sich bei allen Zellen nach Bestrahlung und betrifft hauptsächlich die Arretierung in der G2-Phase. Der Zyklusarrest dient der Zelle hauptsächlich zur Reparatur entstandener DNA-Schäden und Entfernung defekter Zellen aus dem Proliferationsmodus (Pouget and Mather, 2001).

An der Steuerung der Phasenübergänge und somit auch an der Einleitung eines Zyklusarrests ist p53 maßgeblich beteiligt (vgl. Abb. 1). So ist sowohl der G1/S Übergang (Kastan et al., 1992, Hollander et al., 1993, el-Deiry et al., 1993) als auch der G2/M Übergang (Michalovitz et al., 1990, Agarwal et al., 1995, Stewart et al., 1995, Gao et al., 2005) p53 gesteuert.

Der G1-Arrest wird ausschließlich von p53 moduliert, d.h. Zellen mit defektem, mutiertem oder fehlendem p53 sind nicht in der Lage einen G1-Arrest einzuleiten (Kastan et al., 1992, Kuerbitz et al., 1992). Die p53 abhängige Einleitung des G1-Arrests erfolgt hauptsächlich über Transkription des CDKN1A(P21), das für einen potenten cyklinabhängigen Kinaseinhibitor

(Cyclin E-CDK2/ Cyclin E CDK5) kodiert (Harper et al., 1993) *(*vgl*. Abb.30)*.
Obwohl die Einleitung einer G2-Arretierung vorrangig ATM/ATR gesteuert erfolgt (Barton, 2010), nimmt p53 über transkriptionelle Aktivierung von p21 (Pouget and Mather, 2001) und GADD45 (Hermeking et al., 1997)sowie cdc2, Cyklin B Transkriptionshemmung (Winters et al., 1998, Innocente et al., 1999, Harper et al., 1993) indirekt Einfluss auf die Dauer einer G2-Arretierung. Aufgrund der ATM/ATR Modulation des GADD45 ist aber auch die Einleitung einer G2-Arretierung in Zellen mit defektem, mutiertem oder fehlenden p53 möglich (Barton, 2010).
Nach Bestrahlung wird regelgerecht eine G2/M-Blockierung beobachtet (Michalovitz et al., 1990, Agarwal et al., 1995, Stewart et al., 1995) Dieses Verhalten der Zelle an strahlenbiologisch interessantesten Zellzyklus-Restriktionspunkten ist ausschlaggebend für deren Ansprechen auf eine Bestrahlungstherapie. So führt ein schneller Übergang zwischen G2-Phase und Mitose zu einer erhöhten Strahlensensitivität mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für einen radiogenen Zelltod (McKenna et al., 1991, Guillouf et al., 1995) und ein Verlust der strahleninduzierten G2/M Arretierung zu einer Zunahme der Apoptosefrequenz (Palayoor et al., 1995, Bernhard et al., 1996). Auch die Dauer des G2/M-Arrests scheint mit dem Umfang der DNA-Reparatur und dem Zellüberleben post radiationem zu korrelieren (McKenna et al., 1991, Nagasawa et al., 1994).

2.4. DNA-Doppelstrangbrüche und γH2AX

Durch ionisierende Strahlung werden DNA-Schäden vor allem in Form von Strangbrüchen und Basenschäden erzeugt, wobei die schwerwiegendsten Folgen für das Zellüberleben bei Doppelstrangbrüchen (DSB) zu erwarten sind. DSB müssen zwingend vor der S-Phase behoben werden, da sonst die Weitergabe von Chromosomenabberationen und der Zelltod drohen. Zur Reparatur der DNA-Schäden stehen mit der Homologen Rekombination, dem nicht homologen Verknüpfen der DNA-Enden (Non-Homologous DNA End Joining) und dem Single-Strand-Annealing (SSA) drei Hauptwege zur Verfügung (Pouget and Mather, 2001, Kanaar et al., 1998, Critchlow and Jackson, 1998), an denen jeweils viele spezielle Histone beteiligt sind. Histonvarianten

beeinflussen dabei die Strukturbildung der DNA auf nukleosomaler Ebene (Gontijo et al., 2003, van Attikum and Gasser, 2005, Altaf et al., 2007) und ermöglichen so durch Anreicherung an DNA-Schadensstellen einen effizienten Reparaturprozess.

Für die DSB Reparatur spielt die phosphorylierte Variante des Histon H2AX (γH2AX), unabhängig von der Induktionsart der DSB, eine entscheidende Rolle. So sind auch nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung γH2AX-Foci und somit auch indirekt radiogene DSB nachweisbar (Rogakou et al., 1998). γH2AX ist dabei an der schnellen Komponente der DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Peak et al., 1991). Es kann bereits drei Minuten nach Bestrahlung detektiert werden und erreicht die maximale Anreicherungsmenge nach 10-30 min (Schweinfurth, 2007). Die genaue Funktion des γH2AX nach DSB ist nicht nachweislich geklärt, es existieren aber mehrere Theorien, die eine Funktion als Andockstelle für Reparaturkomplexe (Paull et al., 2000, Bassing et al., 2002, Celeste et al., 2003) oder eine Funktion beim Zusammenhalten der getrennten DNA-Enden (Bassing et al., 2002) nennen.

2.5 Die Dosis-Effekt-Beziehung

Werden im halblogarithmischen Maßstab das relative Überleben der Zellen nach Bestrahlung gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen, erhält man eine Zelltyp spezifische Dosis-Effektkurve. Diese Kurve beginnt oft mit einem flach verlaufenden Anteil, der dann in einen gerade verlaufenden, exponentiellen Teil übergeht. Der flache Anfangsteil wird als Schulter bezeichnet und lässt Rückschlüsse auf die Reparaturkapazität der untersuchten Zelllinie zu. Der Kurvenverlaufe zwischen den dosisspezifisch bestimmten Überlebensfraktionen S ($S=PE_{bestr}/PE_{unbestr}$) wird anhand zweier mathematischer Modelle, dem Single-Hit-Multi-Target-Modell (SHMT-Modell) und dem Linear-Quadratischen Modell (LQ-Modell) berechnet.

Das LQ-Modell beinhaltet zwei Theorien, die einem Inaktivierungsereignis der Zelle z.B. eines DNA-Doppelstrangbruches zugrundeliegen können. Erstens kann ein DNA-Doppelstrangbruch durch zwei dicht nebeneinander liegende Spuren mehrerer ionisierender Teilchen (Multi-Hit-Single-Target-Modell) bewirkt werden, wobei diese Inaktivierungsvariante linear von der

Dosis abhängt (α-Komponente). Die zweite Inaktivierungsvariante, bei der DNA-Strangbrüche durch ein einzelnes ionisierendes Teilchen hervorgerufen werden (Single-Hit-Single-Target-Modell) hängt quadratisch von der Dosis ab (β-Komponente). Um für die DEK beide Varianten zu berücksichtigen und somit ein möglichst realitätsnahes Modell zu generieren, werden beide Varianten überlagert (Krieger, 2009a). Der bestimmende Parameter des resultierenden Modells ist der α/β-Wert. Dieser Wert bestimmt die Dosis bei der das Auftreten letaler Zellereignisse zu gleichen Teilen durch den linearen und den quadratischen Anteil bedingt ist (Wannemacher et al., 2006).

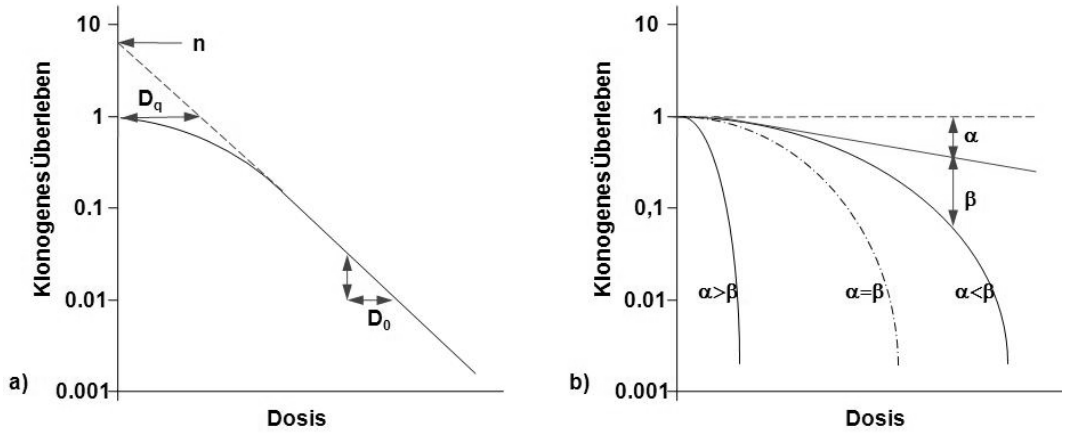


Abbildung 2: DEK nach Photonenbestrahlung (modifiziert nach Weber, 2006)

a) zeigt die Extrapolationsnummer (n), die Quasithreshold-Dosis (D_q) und die 37%-Inaktivierungsdosis (D_0) als wichtige Beurteilungskriterien der Strahlensensibiliät von Säugerzellen. b) zeigt DEKs nach dem Linear-Quadratischen- oder α/β-Modell mit unterschiedlichen linearen α und quadratischen β Anteilen.

Zusätzlich wurden für die strahlenbiologische Charakterisierung wichtige Regressionsparameter mathematisch bestimmt. Dabei werden nach logarithmischer Transformation der Überlebenswerte über eine lineare Regression des linearen Kurvenanteils drei Kenngrößen n, D_q und D_0 berechnet. Die Extrapolationsnummer n, die durch Extrapolation des linearen Anteils der DEK zur Dosis 0 Gy gewonnen wird, kann als heuristisches Prinzip die Vorstellung mehrerer kritischer Bereiche im Sinne zu treffender Targets bis zur Inaktivierung der Zelle (2-10 bei Säugerzellen) betrachtet werden. Die Quasi-

Threshold-Dosis D_q bildet die subletale Dosis ab, welche die Reparaturfähigkeiten der Zelle noch nicht übersteigt. Die 37 %-Inaktivierungsdosis D_0 errechnet sich aus dem linearen Anteil der DEK und ist die Dosis, die zu einer 37 % Reduktion der überlebens- und wachstumsfähigen Zellen führt (1-2 Gy bei Säugerzellen) *(*vgl*. Abb. 2a)*.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Tumorzellen

Für alle Versuche wurden Lewis-Lung-Carzinoma-Zellen (LLC, ATCC-Nr.: CRL-1642) des Subklons LLC1 benutzt, die aus einem pulmonalen Adenokarzinom der Maus stammen (vgl. 2.1).

3.1.2 Zellkulturmaterialien

Zellkulturschalen/Gefäße:

T25 / 75: SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

P 30, 50, 100 mm: SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

P 30, 50 mm: NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Falcon 15 ml, 50 ml, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Pipetten:

Pasteurpipetten: Otto E. Kobe KG, Marburg, Deutschland

Pipetten: Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Kunststoffpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml: SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Elektrische Pipettierhilfe: Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Dtl.

3.1.3 Zellkulturmedien

LLC-Kulturmedium:

RPMI 1640 mit Glutamin: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

+ 3 % FCS (fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C, steril filtriert): PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin): PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

3.1.4 Auftauen und Kultivierung der Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Bei Zellbedarf für die Kultivierung wurden mit LLC1 Zellen gefüllte Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und dort aufgetaut. Im Anschluss wurde die so wieder flüssig vorliegende Zellsuspension unter der Flowbench Hera safe bei sterilem Arbeitsumfeld in 10 cm Petrischalen (PS) mit 36 °C warmem Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen in einem Inkubator Hera cell bei 37 °C, einem CO_2-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Um das nach dem Auftauen im Kulturmedium verbliebene kryoprotektive Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen, wurde nach 24 h ein Mediumwechsel vorgenommen, um so den DMSO bedingten Effekt auf die Wachstumskinetik zu minimieren. Zeigten sich die Zellen im weiteren Wachstumsverlauf subkonfluent, was in einem Zeitintervall zwischen 48 h und 60 h nach Wiederaussaat zu erwarten war (vgl. 4.2.1), wurden sie passagiert, um weiterhin optimales Zellwachstum und -vitalität zu gewährleisten. Dazu wurde das alte Kulturmedium aus den Petrischalen (PS) abgesaugt, die Zellen mit auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium gespült und anschließend mit ebenfalls 37 °C warmer Accutase für 3 min im Brutschrank inkubiert, um optimale Ablösungsergebnisse vitaler Zellen zu erhalten und eine hohe Zellmortalität wie bei Einsatz von Trypsin zu vermeiden. Die so abgelösten Zellen wurden in ein mediumgefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Die noch auf der Platte befindlichen Zellen wurden ebenfalls mit Medium abgespült und mit den zuvor abgelösten Zellen im Zentrifugenröhrchen vereinigt und bei 1200 U/min für 2 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in einer Dichte von 1,5 x 10^4 Zellen/cm^2 wieder ausgesät (vgl. 4.2.1). Die optimale Vertei-

lung und gutes morphologisches Erscheinungsbild wurden zuletzt lichtmikroskopisch kontrolliert.

3.1.5 Aussaatdichte

Zur Analyse der optimalen Wiederaussaatdichte bei der Subkultivierung wurden die Zellen mehrfach in unterschiedlichen Zelldichten zwischen 1,5 x 10^4 Zellen/cm^2 und 4,0 x 10^4 Zellen/cm^2 in T75-Kulturflaschen wieder ausgesät, nach 48 h Wachstum lichtmikroskopisch bezüglich ihrer Morphologie und Konfluenz beurteilt, mit Accutase abgelöst und mittels einer Neubauerzählkammer gezählt (vgl. *Abb. 3*). Gleichzeitig wurde auch die maximale Verweildauer im Kulturgefäß bis zum Erreichen eines subkonfluenten Zustandes lichtmikroskopisch untersucht.

3.1.6 Plattierungseffizienz

Auch die Plattierungseffizienz (PE) ist zellspezifisch und war daher für die Charakterisierung der LLC1-Zellen von Interesse. Sie errechnet sich aus dem Quotienten zwischen Koloniezahl und Aussaatzahl. Dazu wurden zwischen 100 und 500 LLC1-Zellen in 6 cm PS, d.h. auf einer Wachstumsfläche von 21 cm^2 in 4 ml Wachstumsmedium mit unterschiedlichen Beschichtungen (vgl. 3.1.7) und variablem FCS-Gehalt zwischen 2 und 10 % ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Nach 6, 8 und 10 Tagen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, die PS vorsichtig mit PBS gespült und die Zellkolonien mit Kristallviolett fixiert und gefärbt. Der Farbüberstand wurde in einem Wasserbad ausgeschwenkt, die PS trockneten bei RT und wurden quadrantenweise ausgezählt. Dabei wurden Kolonien mit mindestens 50 Zellen im Verbund als vollwertige Kolonie gewertet. Aus der so gewonnen Koloniezahl und Zellzahl der ausgesäten Zellen ließ sich die Platierungseffizienz errechnen (Franken et al., 2006, Pomp et al., 1996).

3.1.7 Beschichtung der Wachstumsflächen

Um Auswirkungen auf die Plattierungseffizienz zu überprüfen, wurden LLC1-Zellen in PS unterschiedlicher Hersteller und mit unterschiedlichen auf die Wachstumsfläche aufgebrachten Beschichtungen ausgesät. So wurden unbeschichtete PS der Firmen Nunc und Sarstedt mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Lysin beschichteten PS von Sarsted via Prüfung der PE verglichen. Zur Beschichtung mit Poly-D bzw. Poly-L-Lysin wurde steril eine 1:10 Verdünnung mit deionisiertem Wasser hergestellt, mit der die Oberfläche der zu beschichtenden Gefäße für 5 min bei Raumtemperatur (RT) bedeckt wurde. Die Poly-D/L-Lysin-Verdünnung wurde nach der Inkubationszeit abgesaugt. Die beschichteten Gefäße wurden 1 h bei RT getrocknet.

3.1.8 Wachstumskurve und Verdopplungszeit

Um die Aussagen bezüglich der Passagezeiten weiter präzisieren zu können, wurden zusätzlich zur lichtmikroskopischen Beurteilung Wachstumskurven der LLC1 Zellen zur Ermittlung der Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase angefertigt. Dazu wurden Zellen in PS mit einer Wachstumsfläche von 8,8 cm^2 mit einer Konzentration von 1 x 10^4 Zellen/cm^2 in jeweils 2 ml Wachstumsmedium mit 3 % FCS ausgesät. Der Wachstumszeitraum betrug 8 Tage, wobei in einem Zeitintervall von 12 h ausgezählt wurde und nach vier Tagen ein Mediumwechsel in den noch verbleibenden Proben durchgeführt wurde. Insgesamt wurden pro Versuch 17 PS für unterschiedliche Abnahmezeitpunkte besiedelt. Zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten wurden die Zellen einer PS mit 500 µl Trypsin-EDTA abgelöst und die Wirkung des Trypsins mit 500 µl Wachstumsmedium inhibiert. Anschließend wurde eine Neubauerkammer mit 2x10 µl Zellsuspension befüllt und der Mittelwert der Auszählung aus vier Großquadraten a 12 Kleinquadraten gebildet *(*vgl. *Abb. 3)*.

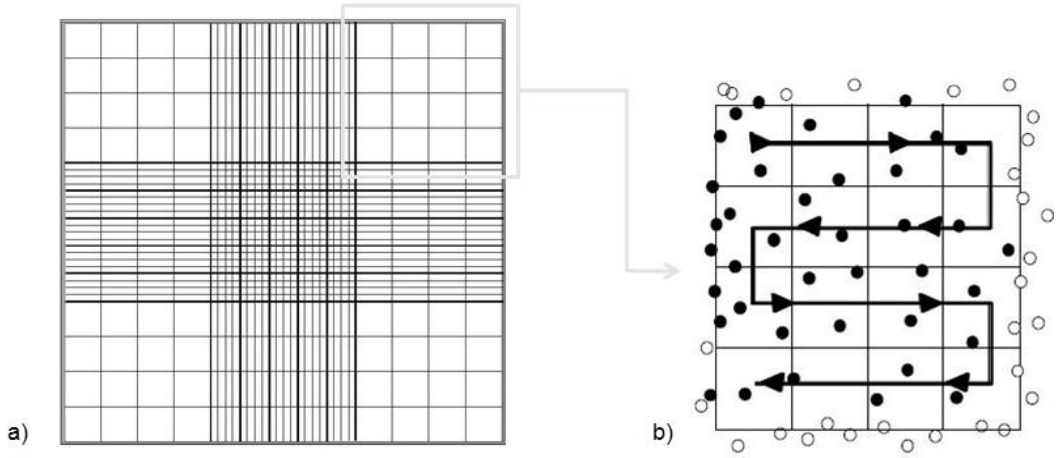


Abbildung 3: Zellzählung mittels Neubauerkammer

a) Die Neubauerkammer besteht aus neun Großquadraten. Jedes Großquadrat hat eine Fläche von 1 mm² und eine Tiefe von 0,1 mm d.h. ein Volumen von 0,1 µl. b) Großquadrat einer Zählkammer: Zellen mit Berührung oben/außen werden mitgezählt (oben & links). Zellen mit Berührung innen/unten werden ausgeschlossen (unten & rechts)(modifiziert nach Sommer)

Die so ermittelten Werte wurden in ein Diagramm mit Inkubationszeit [h] (x-Achse) und Zellzahl pro cm² (y-Achse) eingetragen und die Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase der Kultur wurde anhand der Steigung der Regressionsgeraden (m) mittels der Gleichung y = a + bx berechnet. Daraus ließ sich die Verdopplungszeit (VZ) der LLC1 Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase als

$$VZ=\log 2/m$$

mit dem Programm SigmaPlot 11 berechnen und darstellen.

3.1.9 Morphologie, interpassagere Transformation (*in vitro*)

Um die Transformation der LLC1-Zellen zwischen dem frei flotierenden und adhärenten Zustand (vgl. 2.1) *in vitro* zu verstehen, wurden die LLC1-Zellen in T75-Kulturflaschen kultiviert. Nach 48 h wurde im subklonfluenten Stadi-

um das Kulturmedium mit den frei flotierenden Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert und in einer neuen T75-Kulturflasche mit einer Zelldichte von 1,5 x 10^4 Zellen/cm^2 wiederausgesät. Die adhärenten LLC1-Zellen wurden wie beschrieben in einer neuen T75 Kulturflasche mit einer Zelldichte von 1,5 x 10^4 Zellen/cm^2 wiederausgesät. Beide Kulturen wurden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach 20 h wurden deren Zellzahl- und Morphologie lichtmikroskopisch einander gegenübergestellt.

3.1.10 Analyse von Tumorschnitten (*in vivo*)

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten, auf Objektträger aufgebrachten und mit Pertex eingedeckten Gefrierschnitte der Lunge einer LLC1 transfizierten C57BL-Maus wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg untersucht. Dabei wurden die in den Lungenpräparaten vorhandenen, soliden LLC1-Tumoren mittels Durchlichtmikroskopie in verschiedenen Vergrößerungen (25 fach - 630 fach) genau betrachtet, folgend klinischer Beurteilungskriterien analysiert und fotografiert. Die Tumorschnitte wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Florentine Kamlah zur Verfügung gestellt.

3.1.11 Karyotypisierung

Zur genetischen Aufarbeitung wurden Karyogramme der LLC1-Zellen angefertigt und mit Karyogrammen von C57BL/6 Mausfibroblasten als nicht maligne transformierte Zelle verglichen. Ziel war dabei einen Überblick über den Chromosomensatz einzelner sich teilender Zellen zu gewinnen und numerische Chromosomenveränderungen zu identifizieren. Die Chromosomenbandenanalyse setzte voraus, dass die zu untersuchenden Zellen im Stadium der Zellteilung vorlagen, da sich die Chromosomenbanden nur im Stadium der Metaphase darstellen ließen. Initial wurden die zuvor in 10 cm PS plattierten und subkonfluent wachsenden LLC1-Zellen durch die Zugabe von 0,2 ml Colcemid über 2 h bei 37 °C in einer Konzentration von 10µg/ml in der Metaphase arretiert. Zur anschließenden Quellung der Zellen wurde der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt, 6 ml einer auf 37 °C vorgewärmten hypotonen KCl-NaCitrat-Lösung zugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die

Fixierung erfolgte in mehreren Schritten durch Zugabe von -20 °C kaltem Carnoy`s Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1, 2x7 ml und 1x1 ml Fixativ) und anschließendem Zentrifugieren. Die so fixierten Zellen wurden nach Pelettgröße mit 0,5-1 ml Essigsäure versetzt, auf Objektträger aufgetropft, auf einer Heizplatte getrocknet und zur lichtmikroskopischen Auswertung 5 min in Sörensen-Puffer mit 8% Giemsalösung gefärbt, gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Die mikroskopische Auswertung und Ermittlung der Chromosomenzahl und des Ploidiegrades erfolgte mittels des Analysesystems Ikaros.

3.1.12 Kryokonservierung

Zur längerfristigen Aufbewahrung, insbesondere zur Schaffung eines Grundstocks an Zellen in niedriger Passagezahl, wurden die LLC1-Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die einzufrierenden Zellen aus ihrem Kulturgefäß gelöst (vgl. 3.1.4), in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellett in eiskaltem Gefriermedium (RPMI 1640 + 10 %FCS + 5 %DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dabei wurde die Zellzahl zwischen 1 und 2 Mio/ml Gefriermedium eingestellt. Um eine langsame Adaptation an die niedrigen Temperaturen zu gewährleisten wurden die Kryoröhrchen in einer Isopropanol gefüllten Gefrierbox über Nacht bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff mit -196 °C überführt.

3.2. Histologische Analyse der LLC1-Zellen

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Kernflächen-Messung

Zur Ermittlung der Targetgröße (Kernfläche) als Basis der Bestrahlung mit dicht ionisierender Partikelstrahlung wurde die Kernfläche der LLC1-Zellen fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Dazu wurden die Zellen auf Super Frost Plus Glasobjektträgern ausgesät und für 48-60 h kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und mit Methanol + 1 µg DAPI pro ml Methanol gespült. Die Methanol/DAPI Spül-Lösung wurde abgesaugt, die Objektträger erneut mit Methanol/DAPI Lösung bedeckt und über 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt, die Zellen einmal mit Methanol gewaschen, bei

RT getrocknet und mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Die so gefärbten LLC1-Zellen wurden im Anschluss mit einem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200 MOT betrachtet und ihre Kernfläche mit der Auswertesoftware Axio Vision R.4.6. bestimmt.

3.2.2 γH2AX-Färbung zur Doppelstrangbruch-Visualisierung

Zur Färbung des phosphorylierten Histon H2AX zur Visualisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) wurden Glasobjektträger in 10 cm PS mit Zellsuspension bedeckt ($2x10^4/cm^2$ 24 h prä rad) und bei nahezu konfluentem Zustand mit 1 Gy Photonenstrahlung bestrahlt. Zu ausgewählten Zeitpunkten (0 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h post rad) wurden die Zellen mit eiskaltem (-20 °C) Methanol über 30 min bei -20 °C fixiert. Ein Objektträger mit der unbestrahlten Kontrolle wurde idem zu jeder Kondition behandelt. Nach der Fixierung wurden die LLC1-Zellen mit PBS pH 7,4 gewaschen und mit eiskaltem (-20°C) Aceton über eine Minute auf Eis permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurde zweimal über jeweils 5 min mit 1% FCS in PBS gewaschen und der unspezifische Hintergrund mit 1 % BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Sodann wurden 300µl des primären Antikörpers in einer 1:400 Verdünnung mit 1 % FCS in PBS aufgetragen und bei RT 1 h lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen über jeweils 15 min mit 1 % BSA in PBS wurden die Zellen mit 300 µl des 1:200 verdünnten sekundären Antikörpers über 1h lichtgeschützt in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Im Anschluss an ein zweimaliges Waschen mit PBS erfolgte die Kernfärbung mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Dazu wurde DAPI in einer Konzentration von 0,25 µg/ml PBS auf den Objektträger aufgebracht und bei RT für 3 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Zuletzt Waschen über 3 x 5 min mit PBS bei RT und blasenfreies Eindecken mit *Fluorescent Mounting Medium*. Die so gewonnenen Präparate wurden über Nacht bei 4 °C ausgehärtet, wichtig war hierbei ein zu jeder Zeit lichtgeschütztes Vorgehen.

3.2.3 Mikroskopische Auswertung (DNA-DSB)

Die mikroskopische Auswertung hinsichtlich der γH2AX-Foci erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop, einer angeschlossenen Digitalkamera und des Bildbearbeitungsprogramms Axiovision R4.6. Dabei wurden ein DAPI- (Wellenlänge: 380-420 nm) und ein FITC-Filter (Wellenlänge: 420-515 nm) der Firma Carl Zeiss Vision GmbH verwendet. Die Belichtungszeit und Belichtungsstärke des FITC-Filters wurde mit Hilfe der Kontrolle eingestellt, die Schnitte bei verschiedenen Vergrößerungen mikroskopiert und fotografiert. Jeweils dieselbe Einstellung wurde mit dem Blaufilter betrachtet und fotografiert. Beide Bilder wurden digital miteinander verschmolzen und gespeichert. Die so gewonnen Aufnahmen wurden nun hinsichtlich der Anzahl von γH2AX Foci im FITC-Fenster analysiert.

3.3 Durchführung der Photonenbestrahlung

Die Photonenbestrahlung der LLC1-Zellen erfolgte im Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg in der Klinik für Strahlentherapie. Dabei wurde das klinische Bestrahlungsgerät Elekta Supernova und ein ausschließlich für Monolayer-Kulturen entwickeltes Bestrahlungsprotokoll verwendet. Die durch die Supernova generierte maximale Photonenenergie betrug 6 MV bei einem maximalen Mittelwert der Strahlleistung für Bremsstrahlung von 5,30 Watt. Die maximale Dosisleistung im Nutzstrahl für Bremsstrahlung betrug 4 Gy/min in einem Meter Abstand. Die in einem Zielfeld von 40 cm^2, bei 180 ° gekippter Gantry von unten applizierte Dosis wurde mittels gerätespezifischer Monitoreinheiten bemessen, wobei 91 Monitoreinheiten einer Dosis von 1 Gy entsprachen. Die energieabhängige Tiefe des Dosismaximums liegt für Energien von 6 MV bei 15 mm. Daher wurde eine 15 mm starke PMMA Kunststoffplatte vor den Proben im Strahlengang plaziert, um das Dosismaximum im Probenvolumen zu generieren.

3.4 Generierung von Dosis-Effekt-Kurven

Das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit dünn ionisierender Photonenstrahlung wurde durch die Generierung von Dosiseffektkurven (DEK) untersucht. Das klonogene Überleben ist definiert als Fähigkeit einer Zelle innerhalb von 15 Tagen nach Bestrahlung makroskopisch sichtbare Kolonieen zu bilden (Franken et al., 2006, PUCK and MARCUS, 1956). Dazu wurde das Wachstumsmedium aus den Kulturflaschen abgesaugt, die LLC1-Zellen abgelöst (vgl.3.1.4), zentrifugiert, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und mittels einer Neubauerkammer gezählt. In dosisabhängiger Zahl wurden die LLC1-Zellen in die einzelnen, vorbeschrifteten und Poly-D-Lysin beschichteten 6 cm PS von Nunc in 4 ml Medium inokuliert *(*vgl. *Tab. 2)*.

Studie [#]	1	2	3	4
Dosis[Gy]	**Zellen [n]**	**Zellen [n]**	**Zellen [n]**	**Zellen [n]**
0	150	165	-	-
0	200	220	400	500
0,5	200	220	430	550
1	240	264	460	600
1,5	320	352	600	650
2	500	550	700	750
4	1500	1650	2000	2400
6	15000	16500	10000	10000
8	60000	66000	50000	45000
10	290000	320000	100000	100000

Tabelle 2: LLC1-Zellinokulation zur Dosiseffektkurve

Aufgrund der großen auszusäenden Zellzahl bei 8 Gy und 10 Gy wurden für diese Dosen ebenfalls Poly-D-Lysin beschichtete 10 cm PS von Nunc mit 10ml Medium verwendet. Für den Transport zum Bestrahlungsgerät wurden die Zellen in einer 37 °C warmen, styroporisolierten Transportbox befördert. Die Bestrahlung mit dünn ionisierender Photonenstrahlung durch ein klinisches Bestrahlungsgerät Elekta Supernova erfolgte in aufsteigenden Dosen von bis 10 Gy. Nach 10 d Inkubationszeit im Brutschrank post radiationem (post rad) wurde das Kulturmedium abgesaugt und die gebildeten LLC1-Zell-Kolonieen mit 0,1 % Kristallviolett + 10 % Formaldehyd fixiert, gefärbt und ausgezählt (vgl. 3.1.6) (Franken et al., 2006). Die so gewonnenen Rohdaten wurden mittels FORTRAN 77-Dosis-Routinen per Linear-Quadratischem-Modell (LQ-

Modell) und Single-Hit-Multi-Target-Modell (SHMT-Modell) ausgewertet und DEK generiert (vgl. 2.5).

3.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellmorphologie und Fluoreszenzintensität intakter Einzelzellen. Dazu wird die zu untersuchende Zellsuspension mittels eines Hüllstromes an einem Laser als monochromatische Lichtquelle, vorbeigeführt. Grundlage der Messung sind nun die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen. Das Ausmaß der Fluoreszenz dient vor allem der quantitativen Analyse molekularer Zelleigenschaften (DNA-Gehalt, Proliferationsstatus, Zellzyklusphase, Granularität usw.) und wird primär mittels des so genannten ‚side scatters', das im rechten Winkel zum Laserstrahl abgelenkete Licht, detektiert. Der ‚forward scatter', das in einem kleinen Winkel zum Laserstrahl abgelenkte Licht, dient als unscharfes Größenmaß der Zelle (Rothe, 2007).

3.5.1 Zellzyklusanalyse

Die durchflusszytometrische Analyse kann zur Ermittlung der Zellzyklusphase herangezogen werden, da sich in den unterschiedlichen Zyklusphasen die Granularität und somit die Streu- und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen unterscheiden. Die LLC1-Zellen wurden in 6 cm PS mit dünn ionisierender Photonenstrahlung der Dosis 0 Gy, 2 Gy und 6 Gy bestrahlt. Nach Inkubationszeitenzeiten von 6 bis 64 h wurden die LLC1-Zellen mit 1,5 ml Accutase abgelöst und in 3,5 ml eiskaltem, 100 % Ethanol fixiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen 30 min mit Propidiumiodid Färbepuffer (50mg/ml Rnase A +0,1 % Triton X +20 µg/ml Propidiumiodid) inkubiert und im Durchflusszytometer BD LSRII gemessen. Die Datenaquisition wurde mit dem Programm FACS Diva vorgenommen. Die Integrität der Zellen wurde im FSC/SSC Dotplot überprüft und Zelldupletten, die bei der Fixierung der Zellen entstehen können, über eine Eingrenzung der Singuletten im FL-2W/FL-2A Dotplot aus der Analyse ausgeschlossen. Die einzelnen Zellzyklusphasen wurden in einem FL-2A

Histogramm angezeigt und die prozentuale Verteilung mit dem Programm *FlowJo*, Version 7.5.3 ausgewertet.

3.5.2 Apoptoseinduktion

Die Apoptoserate der LLC1-Zellen nach Bestrahlung mit 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy und 10 Gy wurde gegen das Zellgift Staurosporin 24 h post rad mittels FACS-Analyse gemessen. Zur Vorbereitung der Zellen wurde der Apoptose Kit *Apo AF* verwendet. Das Kit ist ein sensitver Test zur Detektion früher Apoptose in lebenden, unfixierten Zellen. Er beruht auf der Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin. Phosphatidylserin (PhS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PhS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin-V bindet an PhS. Durch Bindung von FITC-Annexin-V konnten so apoptotische Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden. Anhand der FITC-Annexin-V Fluoreszenz können jedoch apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Zusätzlich wurde daher die LLC1-Population mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, das nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen eindringt. Anhand unterschiedlicher Fluoreszenz konnte so zwischen vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen differenziert werden *(*vgl.*Abb. 4)*.

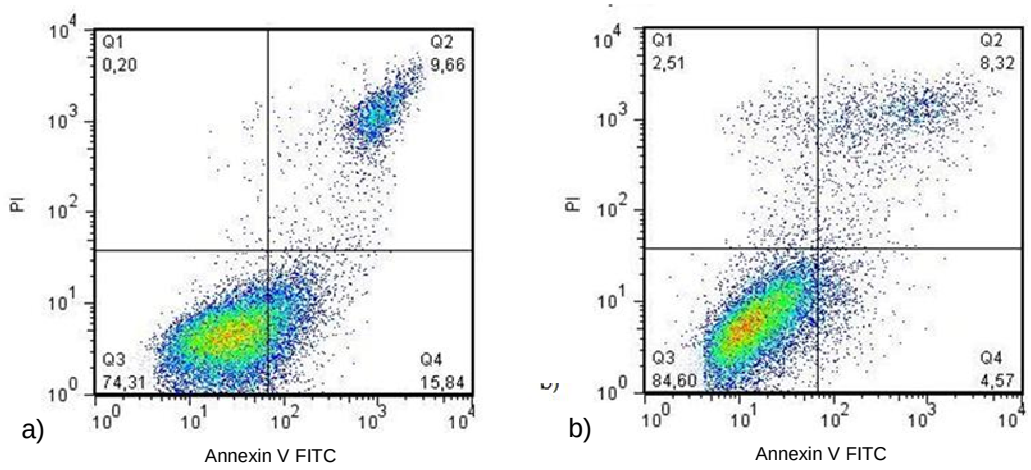


Abbildung 4: Darstellung repräsentativer Dot Plots mit Quandrantenanalyse zur Quantifizierung der vitalen, früh-apoptotischen und spät-apoptotisch/ nekrotischen Zellen

Färbung mit Annexin-V-FITC-PI a) und b) Q3 vitale Zellen (geringes FITC/PI Signal), Q4 früh-apoptotische Zellen (hohes FITC/niedriges PI Signal), Q2/Q1 spätapoptotische/nekrotische Zellen (hohes bzw. niedriges FITC/hohes PI Signal) Abb. 4a) zeigt im Vergleich zu Abb. 4b) eine Erhöhung der früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellfraktion.

3.6 PCR-Analyse

Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens handeln. Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von bis zu 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus folgenden Schritten: Denaturierung bei ca 95 °C zur Trennung der DNA-Doppelstränge, Hybridisierung bei einer primerspezifischen Annealing Temperatur zur optimalen Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge und der Elongation, bei der die DNA-Polymerase, vom 3´-Ende des Primers ausgehend, die Komplementärstränge synthetisiert.

3.6.1 Die RNA-Gewinnung

Zur RNA-Isolation aus den LLC1-Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach Bestrahlung mit 0Gy,2Gy und 6Gy Photonen wurde das RNeasy Mini Kit (Quiagen GmbH) verwendet. Dabei wurden initial die Zellen im Kulturgefäß in Puffer RLT mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-Mercaptoethanol/ ml Puffer RLT) mittels Zellschaber aufgenommen und vollständig im Puffer gelöst. Die Menge des Puffers richtete sich nach der vorhandenen Zellzahl: bis 5 x 10^6 Zellen wurden 350 µl Puffer RLT und zwischen 5 x 10^6 und 1 x 10^7 Zellen wurden 600 µl Puffer RLT verwendet. Die Probe wurde mittels einer 21 G-Nadel homogenisiert und mit gleichem Volumen 70% Ethanol gemischt. Bis zu 700 µl des samples wurden auf einer RNeasy mini spin column verarbeitet. Um den DNAse-Verdau zum Abbau genomischer DNA auf der Säule durchzuführen, wurden 350 µl Puffer RW1 und danach 10 µl DNase I Stocklösung + 70 µl Puffer RDD direkt auf die Säule aufgetragen und bei RT über 15 min inkubiert. Danach wurde die Säule mehrmals mit 350 µl Puffer RW1 und 500 µl Puffer RPE gewaschen und die Membran durch zentrifugieren getrocknet. Durch Aufbringen von 30-50 µl RNase freien Wassers auf die Membran und Zentrifugieren wurde die auf der Rneasy Säule befindliche RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und bei –80 °C gelagert.

3.6.2 Bewertung der RNA

Zur quantitativen und qualitativen Bewertung der so gewonnenen RNA wurde der Agilent Bioanalyzer 2100, ein *RNA nano LabChip* und die Software *Eukaryote Total RNA Nano Series II*, Version 2.5. verwendet.
Der Bioanalyzer nutzt die Mikrofluidtechnologie um sowohl die Menge der Gesamt-RNA bzw. m-RNA als auch deren Integrität, d.h. deren Qualität durch Ermittlung einer RNA-Integritätsnummer (RIN), zu bestimmen (Schroeder et al., 2006). Initial werden dabei die farbstoffmarkierten Probenkomponenten elektrophoretisch getrennt, dann die Einzelkomponenten durch eingelagerten Fluoreszenzfarbstoff detektiert, in „gel-like-images“ sowie Elektropherogramme übersetzt und mit einer standardisierten Probe verglichen *(vgl. Abb. 5)*.

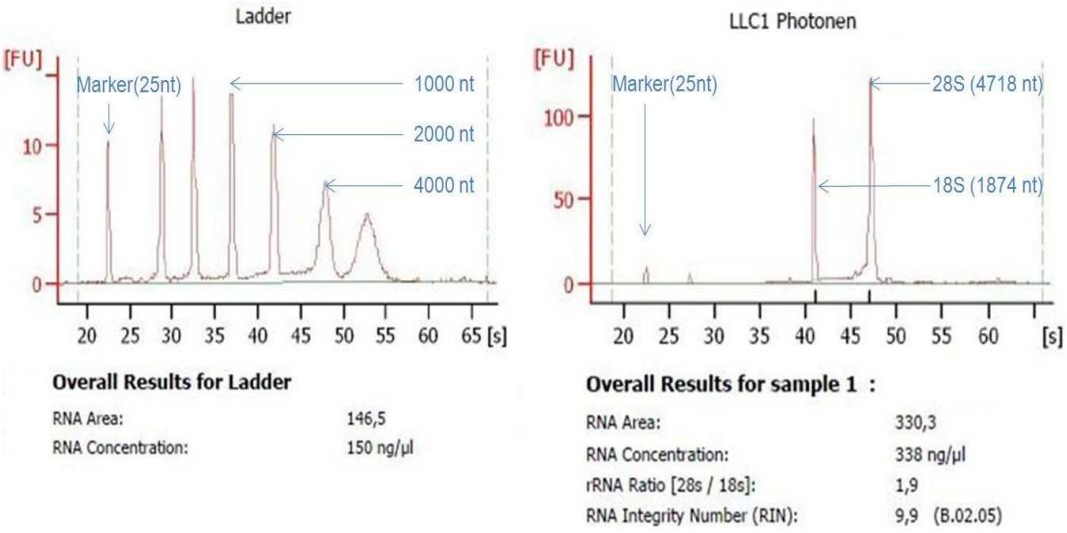


Abbildung 5: RNA-Qualitätsvergleich Standard / Probe

links: Kriterien zur Qualitätsbeurteilung des RNA-Größenstandards: 7 klar abgrenzbare Peaks zw. 25 und 6000 nt (Nucleotid) davon 1 klarer Markerpeak bei 25 nt. rechts: Kriterien zur Qualitätsbeurteilung des RNA-runs: Markerpeak bei 25 nt + 2 klar abgrenzbare ribosomale Peaks für 18S bei 1874 nt und 28S bei 4718 nt, RIN >9

3.6.3 Herstellung der cDNA

Die Herstellung der cDNA erfolgte mittels des *iScript cDNA Synthesis Kit*. Die RNA-Proben zur cDNA-Herstellung wurden auf Eis in RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass pro Probe 750 ng RNA nach einem Denaturierungsschritt über 2 min bei 65°C in 10 µl Gesamtvolumen vorlagen. Diesem Volumen wurden pro Probe 10 µl eines Mastermixes zugeführt. Der Mastermix bestand aus 4 µl 5x i-script Puffer, 5 ml RNase-freiem Wasser und 1 µl i-script Reverser Transkriptase pro Probe. Im Thermocycler PTC 100 wurden die 20 µl-Proben zur Reverse-Transkriptase-Reaktion 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.4 Primerdesign und Primeroptimierung

Die Primer wurden innerhalb eines frei zugänglichen Bereichs der mRNA über die Software *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.) entworfen. Für jedes Primerpaar wurden optimale PCR-Bedingungen für mehrere Parameter wie Primerkonzentration, Annealingtemparatur sowie Annealingzeit ermittelt und die Spezifität der Amplifikation über Schmelzkurvenanalyse und Gelelektorphorese des PCR-Produktes verifiziert.

Zielgene				
CDKN1A(P21) mus	fwd TTGCACTCTGGTGTCTGAGC rev TCTGCGCTTGGAGTGATAGA	61,3 °C	112bp	NM_007669.3
GADD45a mus	fwd GAAGACCGAAAGGATGGACA rev GCAGGCACAGTACCACGTTA	60,0 °C	143bp	NM_007836.1
RRM2b mus	fwd CGGTTCGTCATCTTTCCAAT rev TTGTTCCAGTGAGGGAGGTC	59,1 °C	119bp	NM_199476.1
BAX mus	fwd TGTTTGCTGATGGCAACTTC rev GATCAGCTCGGGCACTTTAG	59,1 °C	104bp	NM_007527.3
BCL2 mus	fwd AGTACCTGAACCGGCATCTG rev GCTGAGCAGGGTCTTCAGAG	59,1 °C	131bp	NM_009741.3
Birc 5 mus	fwd CATCGCCACCTTCAAGAACT rev AAAACACTGGGCCAAATCAG	59,1 °C	121bp	NM_009689
ERCC1 mus	fwd CCACAACCTCCATCCAGACT rev CTGCTGGGGATCTTTCACAT	60,0 °C	106bp	NM_007948.1

Tabelle 3: Verwendete Primer Zielgene

Referenzgene				
ACTB mus	fwd GATCTGGCACCACACCTTCT rev GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	61,3 °C	138 bp	NM_007393.3
B2M mus	fwd GAGCCCAAGACCGTCTACTG rev GCTATTTCTTTCTGCGTGCAT	59,1 °C	134 bp	NM_009735.3
Gusb mus	fwd TCCAAGGGGTCAATAAGCAC rev GGGATAGTGGCTGGTACGAA	60,0 °C	128 bp	NM_010368.1

Tabelle 4: Verwendete Primer Referenzgene

Die Tabellen zeigen von links nach rechts die verwendeten Primer, die Sequenz

in 5´- 3´, die optimale Annealing-Temperatur, die Produktlänge der Zielgene [bp] und den NCBI-Locus.

3.6.5 Durchführung der quantitativen RT-PCR

Für die quantitative RT-PCR wurde die cDNA zur Effizienzbestimmung mit RNase-freiem Wasser wie folgt verdünnt: 50 ng/2 µl (unverdünnt), 25 ng/2 µl, 5 ng/2 µl, 1 ng/2 µl, 0,2 ng/2 µl, 0,04 ng/2 µl. In einem Reaktionsvolumen von 25 µl wurden 12,5 µl 2x Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix, 10 µl RNAse freies Wasser, Forward Primer und Reverse Primer in einer Endkonzentration von 0,2 µM zu 2 µl cDNA vereinigt und die PCR-Reaktion in einem iQ5 PCR-Gerät (Biorad) durchgeführt. Es wurde folgendes Programm durchlaufen: Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C zur Aktivierung der Hot Start-Polymerase über 15 Minuten schlossen sich 40 Zyklen mit jeweils (i) 15 Sekunden bei 95 °C, (ii) 30 Sekunden bei der spezifischen Annealingtemperatur des jeweiligen Primers und (iii) 30 Sekunden bei 72 °C an. Nach jedem Zyklus wurde im Anschluss an die Elongationsphase der Reaktion die Fluoreszenz gemessen. Alle Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt. Neben den experimentellen Proben wurden eine Negativkontrolle mit Wasser (*No Template Control, NTC*) und eine so genannte *No Amplification Control (NAC)* zur Detektion einer Amplifikation genomischer DNA mitgeführt. Im Startmaterial dieser Kontrolle war der cDNA-Syntheseschritt ohne Enzymzugabe durchgeführt worden.

3.6.6 Auswertung der RT-PCR

Zur Berechnung der Expressionsraten nach Bestrahlung wurden Kontroll- und Zielgruppe als CP- Mittelwerte zusammengefasst und daraus die mittlere Expressionsrate für jedes Zielgen berechnet, dabei wurde über mehrere stabile Referenzgene normalisiert (vgl. Tab. 3&4). Die Statistik beruhte dabei auf einem von der Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest. Das mathematische Modell zur Errechnung des relativen Expressionsniveaus (R) basierte auf der Effizienz der Amplifikation (E) und der CP- Differenz (ΔCP) zwischen bestrahlter (CP-sample) und unbestrahlter (CP-control) Gruppe.

Dieses relative Expressionsniveau stellt ein adäquates Mittel zur Untersuchung physiologischer Unterschiede im Genexpressionsniveau dar.

$$R = (E_{target}{}^{\Delta CP\ target}) \,/\, (E_{ref}{}^{\Delta CP\ ref})$$

CP_{ref} = CP- Wert des Referenzgens

CP_{target} = CP- Wert des Zielgens

$\Delta CP_{target} = CP_{control} - CP_{sample}$

$\Delta CP_{ref} = CP_{control} - CP_{sample}$

R= Relatives Expressionsverhältnis

E_{target}= Effizienz der Amplifikation des Zielgens

E_{ref}= Effizienz der Amplifikation des Referenzgens

Die gewonnen Daten wurden mit dem Kalkulationsprogramm REST (Relative Expression Software Tool) RG beta hinsichtlich einer signifikanten Regulation zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe ausgewertet (Pfaffl et al., 2002, Pfaffl et al., 2004). Die Ergebnisse wurden mit dem Grafikprogramm SigmaPlot dargestellt und dabei ein $p < 0,05$ als signifikante Regulation gewertet und mit Stern gekennzeichnet.

3.7 Westernblot

3.7.1 Proteinisolation und Quantifizierung

Zur Proteinisolation aus den LLC1-Zellen wurden diese in 10 cm PS plattiert, bis zum Erreichen von 80 % Konfluenz kultiviert und zu definierten Analysezeitpunkten nach Bestrahlung verarbeitet. Nach dem Waschen wurden die Zellen im NP 40 Puffer mit frisch zugefügten Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren pro ml NP40-Puffer 10 µl PMSF und 10 µl Protease-Inhibitor

Cocktail- mit dem Zellschaber abgelöst und durch eine 21 G-Nadel homogenisiert. Das totale Zelllysat wurde auf Eis über 30 min inkubiert und bis zur Auftrennung im Gel bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung des Proteinertrages erfolgte mittels des *Pierce BCA Protein Assay Kit* und des Spectrophotometers *Dynatech Mrx*. Hierbei wurde mittels des Spectrophotometers die Extinktion der Proben gegen einen BSA-Standard bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt und daraus die in der Probe enthaltene Proteinmenge errechnet.

3.7.2 Gelelektrophorese: Auftrennung der Proteine im Gel

Zur Auftrennung der Proteine wurde die kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet. Nach dem Gießen von Trenn- und Sammelgel wurden 20 µl des totalen Zelllysats mit 5 µl eines 5x Probenpuffer versetzt und bei 94 °C für 5 min im Thermocycler denaturiert. Je 20 µl der Proben wurden dann mit Gel-Ladetips in die mit Laufpuffer bedeckten Gelkammern pipettiert. Für die Zuordnung der Proteinbanden zu ihrem Molekulargewicht wurden 5 µl eines Proteinmarkers (MBI Fermentas) verwendet. Der Lauf erfolgte über 1,5 h bei 125 V.

3.7.3 Membran-Transfer

Die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel wurden anschließend im elektrischen Feld über das sogenannte Semi-Dry-Blotting Verfahren vollständig auf eine immobilisierende, synthetische Membran übertragen. Nach Equilibrieren der Membran über 2 min in 100 % Methanol, 3 min in dH_2O und 10 min in kaltem Transferpuffer wurde auf der Unterseite des *PeQLab* Semi-Dry-Blotters ein Gel-Membran-Sandwich (Blottingpapier, Membran Gel, Blottingpapier) aufgebaut. Der Transfer erfolgte bei konstant 120 mA über 1 h. Nach dem Transfer wurde die Membran in 5% Milchpulver-TBST für 1 h bei RT zur Blockierung unspezifischer Bindungen inkubiert.

3.7.4 Antikörperfärbung und Auswertung

Als primäre Antikörper wurden ein Phospho-p53 (Ser15) und ein p21 (CDKN1A) Antikörper verwendet. Als Kontrolle für das Auftragen gleicher Proteinmengen wurde GAPDH als Referenzprotein mitgeführt.Die primären Antikörper wurden 1:1000 in 5 % Trockenmilch-TBST verdünnt und inkubierten über Nacht bei 4 °C. Nach der Inkubation wurde die Membran wiederholt mit TBST gewaschen und der sekundäre, HRP-gekoppelte Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung über 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschschritten in TBST wurde die Membran mit einer Detektions-Lösung, bestehend aus gleichen Teilen Luminol/Enhancer und Peroxide Puffer über 1 min inkubiert und die Chemilumineszenz im ChemiDoc XRS gemessen. Die Auswertung der Banden erfolgte densiometrisch mit Hilfe der Quantity One Software.

3. 8. Mutationsanalyse des murinen p53 Gens (Trp53) in LLC1

Für die Sequenzierung des murinen p53 Gen (Trp 53) wurden Gendatenbankeinträge des *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) verwendet (NCBI Reference Sequence:

NM_011640.3). Initial wurde RNA unbestrahlter LLC1-Zellen in cDNA umgeschrieben und mittels eines Primerpaares (vgl. Tab. 5) ein Gesamtfragment der kodierenden Sequenz von 1639 Basenpaaren (bp) amplifiziert. Die so gewonnene und in die PCR (Gradienten zwischen 58 °C und 63 °C) eingesetzte cDNA lieferte bei einer optimalen Annealingtemperatur von 60 °C ein, in der Gelkontrolle bestätigtes, Amplifikat der gewünschten Größe. Eine folgend durchgeführte Re-PCR mit 1 µl des primären PCR-Produktes lieferte erneut ein in der Gelkontrolle bestätigtes Amplifikat der gewünschten Größe. Das Produkt dieser PCR wurde gemäß Angabe des Herstellers mit einem Qiagen PCR Purification aufgereinigt und in drei Ansätzen zusammen mit den Sequenzierprimern (vgl. Tab. 5) ins Servicelabor (Eurofins MWG) geschickt (7,5 µl PCR-Produkt Konz.: 20 ng/µl + 7,5 µl Primer Konz.: 2 pmol/µl).

```
1     tttcccctcc cacgtgctca ccctggctaa agttctgtag cttcagttca ttgggaccat
61    cctggctgta ggtagcgact acagttaggg ggcacctagc attcaggccc tcatcctcct
121   ccttcccagc agggtgtcac gcttctccga agactggatg actgccatgg aggagtcaca
181   gtcggatatc agcctcgagc tccctctgag ccaggagaca ttttcaggct tatggaaact
241   acttcctcca gaagatatcc tgccatcacc tcactgcatg gacgatctgt tgctgcccca
301   ggatgttgag gagtttttg aaggcccaag tgaagccctc cgagtgtcag gagctcctgc
361   agcacaggac cctgtcaccg agacccctgg gccagtggcc cctgccccag ccactccatg
421   gcccctgtca tcttttgtcc cttctcaaaa aacttaccag ggcaactatg gcttccacct
481   gggcttcctg cagtctggga cagccaagtc tgttatgtgc acgtactctc ctcccctcaa
541   taagctattc tgccagctgg cgaagacgtg ccctgtgcag ttgtgggtca gcgccacacc
601   tccagctggg agccgtgtcc gcgccatggc catctacaag aagtcacagc acatgacgga
661   ggtcgtgaga cgctgccccc accatgagcg ctgctccgat ggtgatggcc tggctcctcc
721   ccagcatctt atccgggtgg aaggaaattt gtatcccgag tatctggaag acaggcagac
781   ttttcgccac agcgtggtgg taccttatga gccacccgag gccggctctg agtataccac
841   catccactac aagtacatgt gtaatagctc ctgcatgggg ggcatgaacc gccgacctat
901   ccttaccatc atcacactgg aagactccag tgggaacctt ctgggacggg acagctttga
961   ggttcgtgtt tgtgcctgcc ctgggagaga ccgccgtaca gaagaagaaa atttccgcaa
1021  aaaggaagtc ctttgccctg aactgccccc agggagcgca aagagagcgc tgcccacctg
1081  cacaagcgcc tctccccccgc aaaagaaaaa accacttgat ggagagtatt tcaccctcaa
1141  gatccgcggg cgtaaacgct tcgagatgtt ccgggagctg aatgaggcct tagagttaaa
1201  ggatgcccat gctacagagg agtctggaga cagcagggct cactccagct acctgaagac
1261  caagaagggc cagtctactt cccgccataa aaaaacaatg gtcaagaaag tggggcctga
1321  ctcagactga ctgcctctgc atcccgtccc catcaccagc ctccccctct ccttgctgtc
1381  ttatgacttc agggctgaga cacaatcctc ccggtccctt ctgctgcctt ttttaccttg
1441  tagctagggc tcagcccccct ctctgagtag tggttcctgg cccaagttgg ggaataggtt
1501  gatagttgtc aggtctctgc tggcccagcg aaattctatc cagccagttg ttggaccctg
1561  gcacctacaa tgaaatctca ccctacccca caccctgtaa gattctatct tgggccctca
1621  tagggtccat atcctccagg gcctactttc cttccattct gcaaagcctg tctgcattta
1681  tccacccccc accctgtctc cctcttttt ttttttttac ccctttttat atatcaattt
1741  cctattttac aataaaattt tgttatcact taaaaaaaaa a
```

Tabelle 5: Trp 53 Gesamtfragment und analysierte Sequenzen

Trp53-Gesamtfragment mit 1639 bp (grün) fwd: tgctcaccctggctaaagtt rev: aaggaaagtaggccctggag, Sequenzierprimer Trp53-1 (orange) fwd: acctagcattcaggccctcatc (94- 115), Sequenzierprimer Trp 53-2 (rot) fwd: ggccatctacaa-

gaagtcac (628-647) und Sequenzierprimer Trp 53-3 (blau) rev: tccagtgtgat-gatggtaagg (901- 921).

Nach Erhalt der Sequenzen des Servicelabor wurden diese im Fasta-Format mit dem Programm BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool,*) gegen Gendatenbankeinträge analysiert (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden mittels des Computerprogramms *ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd.) editiert und ausgewertet.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil untergliedert sich in zwei Hauptteile, dabei sind die Ergebnisse zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen der LLC1-Zellen Inhalt des ersten Darstellungsteils, im zweiten Teil ist deren strahlenbiologische Beurteilung figurativer Hauptgegenstand.

4.1. Überblick

Es wurden aus dem Lewis-Lung-Modell als Subklon abstammende LLC1 Zellen *in vitro* kultiviert und dabei essentielle Kulturtechniken und Wachstumsbedingungen erarbeitet. Dafür wurde die Zusammensetzung des optimalen Wachstumsmediums zur Kultivierung der LLC1-Zellen in vergleichenden Versuchen ermittelt. Desweiteren erfolgte eine histologische Phänotypisierung und die Ermittlung der Kernfläche als relevantes Target für eine Bestrahlung mit dicht ionisierender Partikelstrahlung. Zur anschließenden Analyse der Wachstumskinetik wurden Wachstumskurven zur Ermittlung der Verdopplungszeiten generiert und unterschiedliche Beschichtungen der Wachstumsflächen sowie divergierende Aussaatdichten vergleichend betrachtet.
Strahlenbiologisch relevante Beurteilungskriterien waren strahleninduzierte Veränderungen auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene. Durch die Generierung von Dosis-Effekt-Kurven sowie durchflusszytometrischer FACS-Analysen wurden das klonogene Überleben, die Zellzyklusprogression und Apoptoseinduktion nach Photonenbestrahlung untersucht. Das Reparaturvermögen der Zellen nach Photonenbestrahlung, analysiert über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des phosphorylierten Histons H2AX als Indikator für Doppelstrangbrüche, war Bestandteil der immunhistochemischen Untersuchung, zur molekularbiologischen Untersuchung geänderter Genexpression diente die quantitative RT-PCR. Anhand einer DNA-Sequenzierung wurde die Zelllinie auf das Vorliegen einer Mutation im p53-Gen untersucht und die Funktionalität anhand der Expression bekannter Zielgene auf Proteinebene überprüft.

4.2 Wachstumsbedingungen

Zur Kultivierung wurde RPMI 1640 mit unterschiedlichen Anteilen fetalem Kälberserum (FCS) verwendet. Die Konzentration des FCS hatte dabei direkten Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit und das morphologische Erscheinungsbild (vgl. 4.2.5) der LLC1-Zellen. Je höher die FCS- Konzentration gewählt wurde, desto geringer waren die Verdopplungszeiten *in vitro*. Auffällig war hierbei ein mit steigender FCS-Konzentration zunehmender Anteil an frei im Kulturmedium flotierenden Zellen. Je geringer die FCS-Konzentration gewählt wurde, desto größer war der Anteil der an der Wachstumsfläche adhärent vorliegenden Zellen und desto länger war die Verdopplungszeit. Die am besten steuer- und reproduzierbaren Kultivierungsergebnisse wurden mit einer Konzentration von 3% FCS in RPMI 1640 erzielt. Hierbei zeigte sich ein für die weiterführenden Kultur- und Bestrahlungsexperimente vorteilhafter Wachstumsverlauf mit adäquater Verteilung der LLC1-Zellen zwischen flotierender und adhärenter Fraktion bei deutlichem Überwiegen der adhärenten Fraktion. Diese adhärente Fraktion war hinsichtlich der praktischen strahlenbiologischen Aufarbeitung deutlich viabler als die frei flotierende Fraktion.

4.2.1 Wachstumskinetischer Einfluss der Aussaatdichte

Die Aussaatdichte bei Neu- und Wiederaussaat war relevant für die Wachstumskinetik. Hierbei war zum einen die Quantität der LLC1-Zellen im Sinne der Zellausbeute bei Kultivierung, zum anderen die Qualität der LLC1-Zellen in Hinblick auf deren experimentelle Weiterverarbeitung von Bedeutung. Der Zellzuwachs in Kultur war bei einer Aussaatdichte von $1{,}5 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 verglichen mit steigenden Aussattdichten bis 4×10^4 Zellen/ cm^2 maximal. In geringerer Ausaatdichte fand ein Wachstum bis $1{,}5 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 statt, was einem Zellzuwachs von 500 % entspricht. Bei maximaler Aussaatdichte fand ein Wachstum der LLC1-Zellen bis $2{,}5 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 statt, dies entspricht einem Zellzuwachs von 310 % *(*vgl*. Tab. 6)*. Dies macht deutlich, dass mit einer geringeren Aussaatdichte ein maximaler Zellzuwachs zu erzielen ist. Darüber hinaus variierte mit der Aussattdichte auch die Qualität der ge-

nerierten Zellen hinsichtlich deren experimenteller Eignung: so zeigte sich ein größerer Anteil der langgestreckten, spindelförmigen adhärenten und ein geringerer Anteil der kugelig, rundlichen frei flotierenden LLC1-Zellen nach niedrigkonzentrierter, geringer Zellaussaat. Nach Ablösung dieser adhärenten Fraktion von der Wachstumsfläche entstand nach geringer Aussaat ein lichtmikroskopisch deutlich homogeneres Zellbild mit weniger Verklumpung, Duplettierung oder Fragmentierung.

Aussaatdichte [Zellen/cm²]	**Medium [RPMI]**	**Wachstumszeit [h]**	**Zellzahl [Zellen/cm²]**	**Zuwachs [%]**	**Morphologie**
$1{,}5x10^4$	20ml	48	$1{,}5x10^5$	500	1
$2{,}0x10^4$	20ml	48	$1{,}8x10^5$	450	1
$2{,}7x10^4$	20ml	48	$2{,}3x10^5$	420	2
$4{,}0x10^4$	20ml	48	$2{,}5x10^5$	310	3

Tabelle 6: Entwicklung der Zellzahl bei variablen Aussaatdichten

Bei Aussaat von $1{,}5x10^4$/ cm² findet ein Zellzuwachs von 500% in 48 h statt, bei Aussaat von $4x10^4$/ cm² findet ein Zellzuwachs von 310% in 48 h statt. Morphologie: 1 = wenig flotierende, spindelförmig adhärente, 2 = mäßig flotierende, nicht konsequent spindelförmig adhärente, 3 = viele, auch verklumpte flotierende, gemischt morphologisch adhärente.

4.2.2 Beschichtungen der Wachstumsflächen

Das Wachstumsverhalten der LLC1-Zellen wurde im Kulturexperiment zwischen unbeschichteten und mit verschiedenen Agenzien beschichteten Wachstumsflächen vergleichend untersucht. Geprüft wurden hierbei unbeschichtete, mit Poly-D-Lysin, Poly-L-Lysin und Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße von Sarstedt und unbeschichtete Zellkulturgefäße von NUNC. Die unterschiedliche Reaktion der LLC1-Zellen auf die veränderten Kulturbedingungen wurde mittels Koloniebildung gruppenvergleichend im Verhältnis zu unbeschichteten Sarstedt Kulturgefäßen begutachtet. Hierbei zeigten sich für Poly-L-Lysin und Gelatine beschichtete Sarstedt Wachstumsflächen schlechtere, für Poly-D-Lysin beschichtete Sarstedt und unbeschichtete NUNC Kul-

turgefäße bessere Wachstumsergebnisse. In den beiden Gruppen mit überlegener Wachstumsleistung zeigte sich zudem eine bessere Reproduzierbarkeit und geringere Variabilität in der Zahl der gebildeten Kolonien, d.h. der Anzahl nach Aussaat reproduktionsfähigen LLC1-Zellen. *Abbildung 6* zeigt exemplarisch einen Koloniebildungsversuch auf unterschiedlich beschichteten Wachstumsflächen nach Fixierung und Färbung.

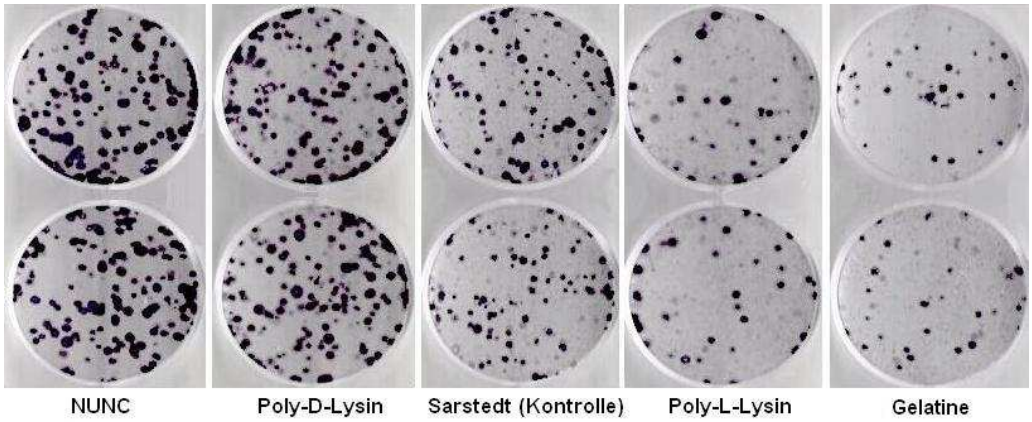


Abbildung 6: Wachstum auf unterschiedlichen Wachstumsflächen

Koloniebildung auf unterschiedlichen Wachstumsflächen nach Aussaat von 300 LLC1-Zellen pro PS (21cm²) nach 8 d Wachstumszeit. v.l.: unbeschichtete NUNC-PS, Poly-D-Lysin beschichtete Sarstedt-PS, unbeschichtete Sarstedt-PS als Kontrolle, Poly-L-Lysin beschichtete Sarstedt-PS, Gelatine beschichtete Sarstedt-PS.

4.2.3 Plattierungseffizienz

Die Plattierungseffizienz der LLC1-Zellen variierte abhängig von Aussaatdichte, Serumkonzentration im Wachstumsmedium, Beschichtung der Wachstumsfläche und Wachstumsdauer nach Aussaat. Auf unbeschichteten Sar-stedt und Poly-L-Lysin beschichteten Sarstedt Wachstumsflächen war der Streubereich der Ergebnisse mit einer Plattierungseffizienz zwischen 3 und 70 % überaus hoch und war auch innerhalb der verschiedenen Konditionen nicht konsistent reproduzierbar, d.h. hinsichtlich einer Aussaat für strahlenbiologische Untersuchungen nicht zielführend. Wie auch bei den Experimenten zur Beschichtung der Wachstumsflächen zeigten sich bezüglich der Plattierungseffizienz die konstantesten und reproduzierbarsten Werte

auf Poly-D-Lysin beschichteten Sarstedt oder unschichteten NUNC Wachstumsflächen nach 8 d Wachstumsdauer, bei einer Serumkonzentration von 3 % und Aussaat von 200 LLC1-Zellen auf einer Wachstumsfläche von 21 cm^2. Unter diesen Konditionen lagen die Plattierungseffizienzen zwischen 40 und 60 %. *Abbildung 7* zeigt exemplarisch einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Aussaatdichten und veränderter Serumkonzentration.

Hier wurden bei Aussaat von 200 Zellen und einer FCS Konzentration von 3 % 107 Kolonien gezählt, dies entspricht einer Plattierungseffizienz von 53,5 %. Bei Aussaat von 100 LLC1-Zellen auf 21 cm^2 bei 3 % FCS Konzentration lag die Plattierungseffizienz hier, bei 53 gezählten Kolonien, bei 26,5 %. Bei Aussaat von 300 LLC1-Zellen auf 21 cm^2 bei gleichen Bedingungen lag die Plattierungseffizienz hier, bei 135 gezählten Kolonien, bei 45 %. Bei letztgenannter Aussaatdichte waren die Kolonien jedoch nicht so klar voneinander abgrenzbar, wie bei Aussaat von 200 Zellen auf 21 cm^2. Bei Aussaat von 300 Zellen bildeten sich in der Mehrzahl der Fälle zusätzlich zu den wertbaren Kolonien zwar sichtbare Kolonien, die jedoch die zur Wertung als vollwertig ausgebildete Kolonie erforderliche Zellzahl von 50 Zellen im Verbund nicht erfüllten. Dies erschwerte die Auszählung und schmälerte die Klarheit der generierten Ergebnisse. Auch deswegen erwies sich die Aussaat von 200 Zellen in unbeschichtete NUNC/ Poly-D-Lysin beschichtete Sarstedt Kulturgefäße (21 cm^2) bei 3 % FCS Konzentration und 8 d Wachstumsdauer als zuverlässigste Kondition zur Bestimmung der Plattierungseffizienz.

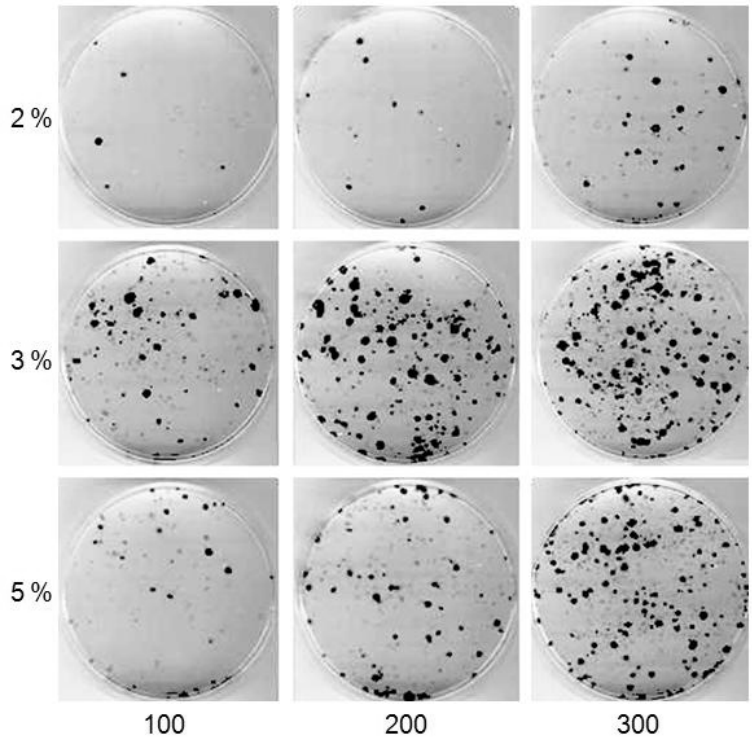


Abbildung 7: Plattierungseffizienz LLC1

Plattierungseffizienz unterschiedlicher Ausaatdichten bei verschiedenen Serumkonzentrationen auf unbeschichteter NUNC Wachstumsfläche (21 cm²) nach 8 d Wachstum. v.l.: Aussaat von 100, 200 und 300 Zellen pro PS. v.o.: Konzentration von 2, 3 und 5 % FCS im Wachstumsmedium. Die Zählung bei 3 % FCS ergab 53 (bei 100), 107 (bei 200) und 135 (bei 300 inokulierten Zellen) Kolonien mit PEs von 26,5 %, 53,5 % und 45 %.

4.2.4 Wachstumskurve

Nach Erarbeitung der geeigneten Kulturbedingungen für ein optimales Wachstum der LLC1-Zellen *in vitro* folgte nun die Anfertigung einer Wachstumskurve (vgl. 3.1.8). Zur Anfertigung der Wachstumskurve wurden LLC1-Zellen der Passage 31 auf Poly-D-Lysin beschichteter Wachstumsfläche ausplattiert.

In der lag-Phase zwischen 0 h und 23 h nach Aussaat hefteten sich die LLC1-Zellen an die Wachstumsfläche an und adaptierten sich an die Wachstumsbedingungen. Diese Adaptierung war nach ca. 24 h Kolonisierungszeit abgeschlossen und es begann ein exponentielles Wachstum, mit linearem Anstieg der Wachstumskurve. Aus der Steigung *m* dieses linearen Anteils zwischen

23 h und 72 h nach Ausplattierung berechnet sich die Verdopplungszeit der beobachteten Zellen, die für die LLC1-Zellen mit 16 h anzugeben ist. Zwischen 72 h und 110 h nach Aussaat ging die Wachstumsgeschwindigkeit zurück und die Zellen traten in die stationäre Wachstumsphase ein. Auch zu späteren Messzeitpunkten bis 170 h war keine maßgebliche Zunahme der Zellzahl mehr festzustellen. Auch ein Wechsel des Wachstumsmediums, d.h. ein erneutes Zuführen von Wachstumsfaktoren in Form von FCS nach 108 h hatte keinen Wiederanstieg des Zellwachstums mehr zur Folge. Diese Wachstumsstagnation zeigte sich in der Wachstumskurve in Form eines breiten Plateaus *(vgl. Abb. 8)*. Während der stationären Wachstumsphase findet vor Erreichen der Konfluenz eine Kontaktinhibition statt, d.h. die LLC1-Zellen beginnen sich von der Wachstumsfläche abzulösen und erreichen auch zu späten Analysezeitpunkten nur eine optische Dichte von maximal 70-80 %.

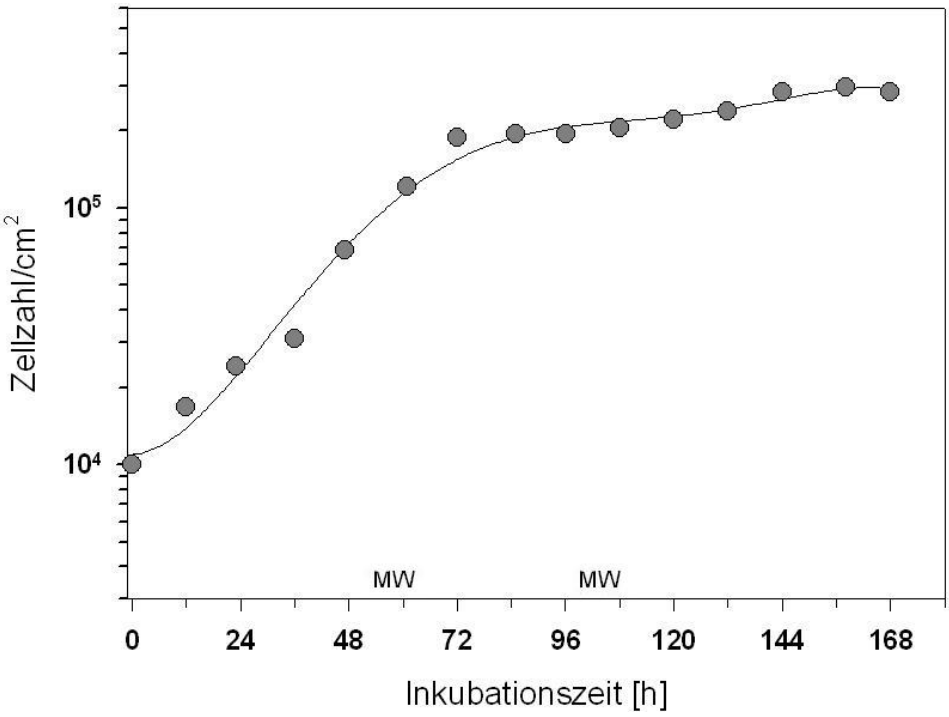


Abbildung 8: Wachstumskurve LLC1

Wachstumskurve der LLC1 Zellen (Passage 31) mit linearem Anstieg im Sinne eines exponentiellen Wachstums zwischen 23 h und 72 h, einer Verdopplungszeit von 16 h und dem Erreichen der Plateauphase im Sinne einer Maximalbesiedlung nach 110 h. Nach 56 h und 108 h fand ein Wechsel des Wachstumsmediums statt (MW).

4.2.5 Morphologie und interpassagere Transformation

In vitro zeigten sich unterschiedliche Zellmorphologien, die sich über den kompletten Passagezeitraum als konsistent fortbestehend präsentierten. Grundsätzlich sind hier zwei unterschiedliche Hauptfraktionen zu nennen, die sich vor allem durch ihr phänotypisches Erscheinungsbild und ihr Adhäsionsverhalten unterscheiden. Die eine Fraktion beinhaltet überwiegend abgerundete, kugelige und frei im Wachstumsmedium flotierende Zellen mit schlechter Adhäsionsfähigkeit *(*vgl. *Abb 9 b)*, die andere langestreckte, schlanke, spindelförmige Zellen mit guter Adhäsionsfähigkeit *(*vgl*. Abb. 9 c)*. Zwischen beiden Phänotypen scheint ein stetiger Übergang stattzufinden. So erscheinen auch nach strikter Separation, anschließend getrennter Wiederaussaat und Weiterkultivierung der frei flotierenden oder der adhärenten Fraktion nach einer Wachstumszeit von 20 h wieder Zellen des jeweils anderen Phänotyps in den sich nach Separation als rein präsentierenden Kulturen *(*vgl*. Abb 9 d)*. Dieser „Phänotypenswitch“ konnte sowohl nach reiner Aussaat der flotierenden Fraktion mit Wiederauftreten adhärenter Zellen beobachtet werden, als auch nach reiner Aussaat der adhärenten Fraktion mit Wiederauftreten der frei flotierenden Fraktion.

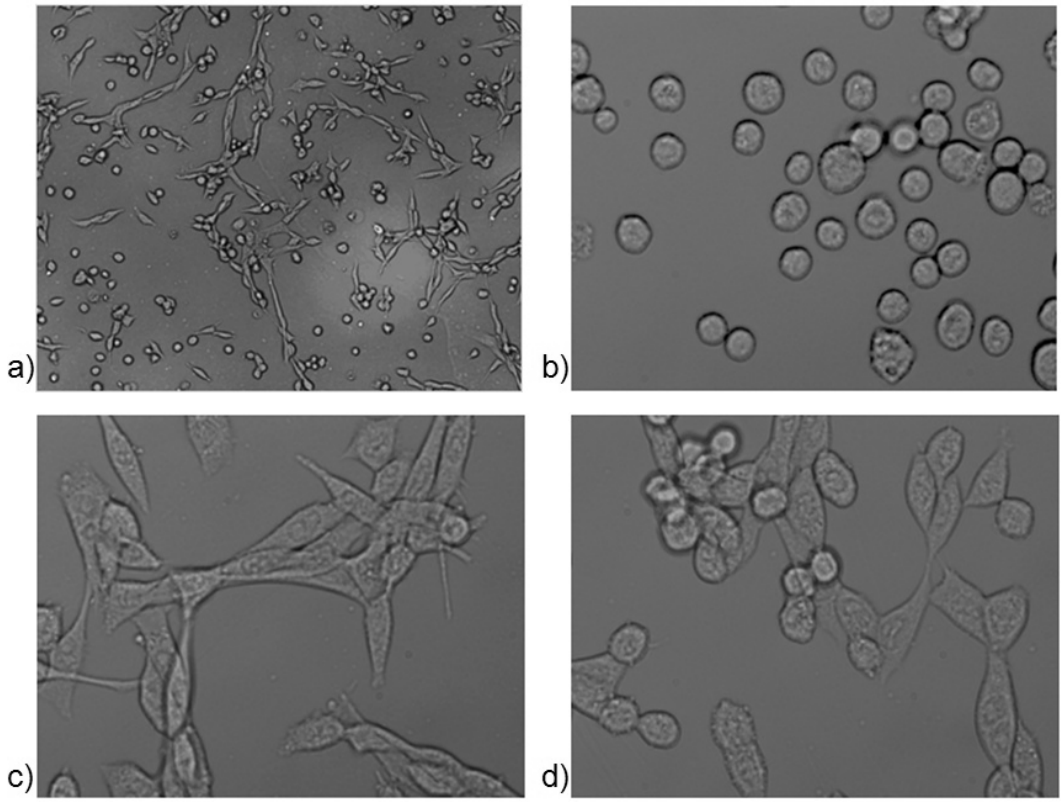


Abbildung 9: Phänotypen der LLC1-Zellen in vitro

a) zeigt die gemischte Ausgangspopulation der LLC1-Zellen im Kulturgefäß mit gleichzeitigem Vorliegen der adhärenten und frei flotierenden Fraktion. Beide Fraktionen wurden zur Wiederaussaat durch Zentrifugieren voneinander getrennt b) die nach Separation rein flotierende bzw. c) rein adhärente Fraktion direkt nach Wiederaussaat. d) zeigt die aus nur flotierenden oder adhärenten, neu kultivierten LLC1-Zellen hervorgehende Mischpopulation mit erneutem Vorliegen beider Phänotypen nach 20 h Wachstumszeit.

4.2.6 Histologische Beurteilung von Tumorschnitten

Um die LLC1-Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und Klassifikation grundlegend einschätzen zu können, wurden gefärbte Tumorschnitte aus *in vivo* Experimenten in C57BL-Mäusen im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg lichtmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte der dort als maligne eingestufte, solide Tumorzellverbund typische Charakteristika eines nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. Zytologische Hauptkriterien für diese maligne Klassifizierung waren die erheblichen Kernpleomorphien, Hyperchromasie der Nuklei mit prominenten Nukleolen, deutlich sichtbare atypische Mitosen und eine verschobene Relation zwischen Kern- und Plasma-Anteil zu Gunsten des nukleären Anteils. Histologisch klassifizierte sich der Tumorzellverbund aufgrund einer ausgeprägten Lymphangiosis carcinomatosa und einer Entdifferenzierung ohne drüsige oder plattenepitheliale Differenzierung als maligne (vgl. *Abb. 10*)

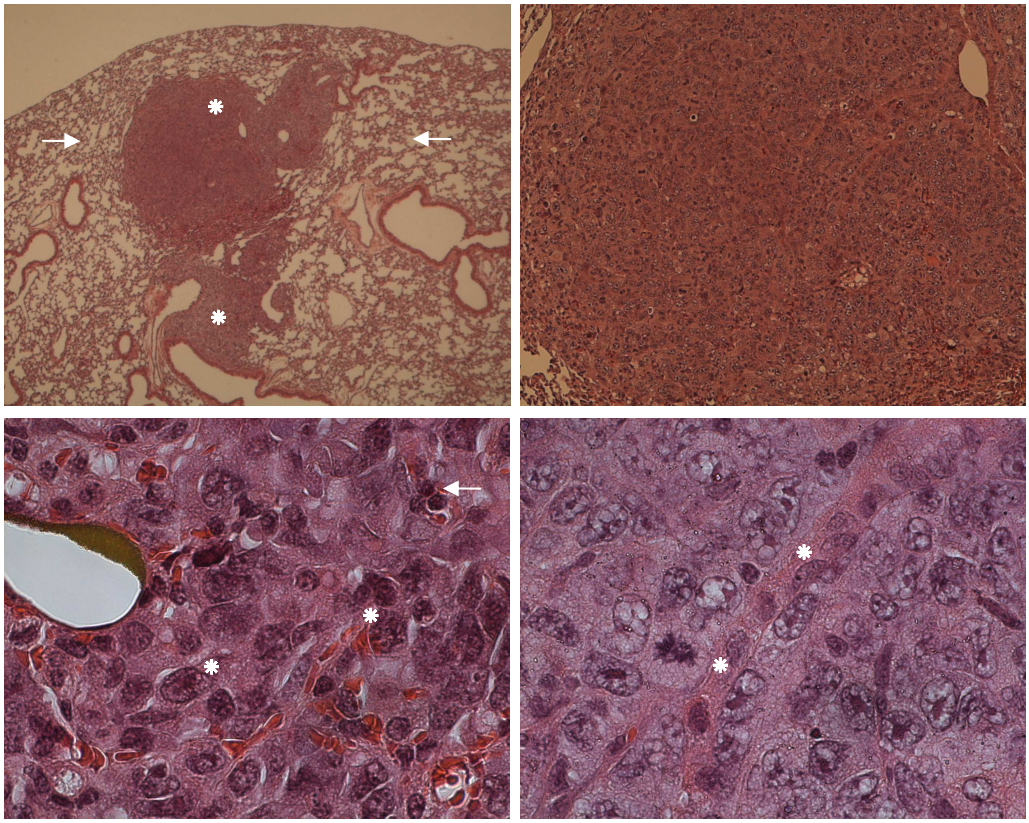


Abbildung 10: Mauslunge mit LLC1-Tumor (HE gefärbter Gefrierschnitt)

a) 2,5 fach vergrößerter Lungenschnitt einer C57BL-Maus mit solidem LLC1-Tumor (Pfeil) im umgebenden Parenchym (Stern) b) zeigt die solide Struktur des Tumorzellverbandes in 100 facher Vergrößerung c) eine 630 fach vergrößerte Übersicht mit Kernpleomorphie (Stern) und atypischen Mitosen (Pfeil) d) zeigt die Lymphangiosis carcinomatosa in 630 facher Vergrößerung (Stern).

4.3 Kernflächen und Besiedlungsdichte

Zur Vorbereitung geplanter Folgeexperimente zur Bestrahlung der LLC1-Zellen mit dicht-ionisierender Partikelstrahlung wurden die Flächen der Zellkerne und damit die Größe des Targets zur Ermittlung der mittleren Trefferzahl mikroskopisch bestimmt. Die Zellen lagen in dünnem und intermediär dichtem Besiedlungszustand, die beide ein exponentielles Wachstum ermöglichten und in nahezu konfluentem Besiedlungszustand der Plateauphase, in dem kein exponentielles Wachstum mehr stattfand, vor. Die Größe der gemessenen Zellkerne variiert dabei zwischen den einzelnen Zuständen, wobei die Kerngröße bei konfluenter Besiedlung am höchsten war. Die durchschnittliche Kerngröße der unbestrahlten LLC1-Zellen liegt bei dünner Besiedlung, d.h. bei einer Zelldichte von $2x10^4$ Zellen/ cm^2 zum Zeitpunkt der Messung bei 107 μm^2, bei intermediärerer Besiedlung, d.h. bei einer Zelldichte von $1x10^5$Zellen/ cm^2 zum Zeitpunkt der Messung bei 103 μm^2 und bei dichter Besiedlung, d.h. bei einer Zelldichte von $2x10^5$ Zellen/ cm^2 zum Zeitpunkt der Messung bei 128 μm^2 *(vgl. Abb. 11)*.

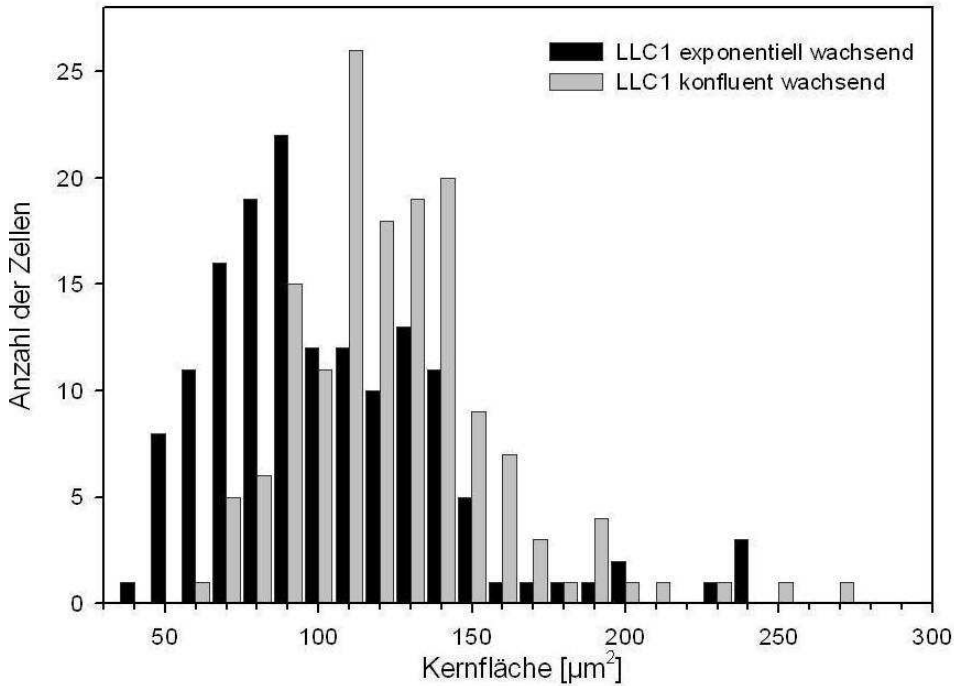


Abbildung 11: Verteilung der LLC1-Kernflächen

Die Messung der Kernfläche unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen zeigte tendenziell eine Größenzunahme des Zellkerns bei nahezu konfluenter Besiedlung der Wachstumsfläche in der Plateauphase. Die durchschnittliche Kernfläche bei dünner Besiedlung betrug 107 µm², die Kernfläche bei dichter Besiedlung betrug durchschnittlich 128 µm².

4.4 Karyotypisierung der LLC1-Zellen

Sowohl männliche als auch weibliche C57B-Mäuse, aus denen auch die LLC1-Zellen stammen, sind vom genetischen Standpunkt aus betrachtet homogen und im Sinne genetischer und strahlenbiologischer Experimente gut verwertbar.
Im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg wurde eine Karyotypisierung der murinen LLC1-Zellen aus der C57Bl/6-Maus vorgenommen. Von Interesse waren bei der Karyotypisierung die Größe der Chromosomen mit Lage der Zentromeren, der Ploidiegrad und das Vorliegen struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen.
Im Karyogramm der LLC1-Zellen zeigten sich kleine, akrozentrische Chromosomen. Die kleinsten, in allen analysierten Proben gemessenen Chromosomen waren dabei 0,7µm lang, die größten wiesen eine Länge von 10 µm auf. Das Größenverhältnis zwischen kleinstem und größtem Chromosom innerhalb derselben Metaphase lag durchschnittlich bei ca. 3:1. Bei Karyotypisierung aus 54 Metaphasen zeigte sich eine große Bandbreite unterschiedlicher Chromosomenzahlen pro Metaphase. Die Ergebnisse zwischen den einzelnen Metaphasen variierten bei einem Mittelwert von 85 Chromosomen/Metaphase stark. So lagen minimal 57 Chromosomen und maximal 97 Chromosomen in einer Metaphase vor. Durch die Vielzahl der Chromosomen und die minimalen Größenunterschiede zwischen ihnen ist eine Unterscheidung und Sortierung anhand der Chromosomengröße nicht suffizient. Die großen Chromosomen lassen bedingt eine differenzierte morphologische Charakterisierung anhand der Bänderung zu, bei mittelgroßen und kleinen Chromosomen ist eine morphologische Differenzierung lichtmikroskopisch nicht möglich. Wird von einem, in der Literatur beschriebenen, diploiden Chromosomensatz mit 20 Chromosomenpaaren bei Mäusen ausgegangen (Sachs, 1954, OHNO et al., 1957, OHNO et al., 1959a, OHNO et al., 1959b, FORD and WOOLLAM, 1963, Weiner et al., 1964), lagen hier in allen Fällen

polyploide Chromosomensätze vor, wobei rein tetraploide Chromosomensätze in 28% der untersuchten Metaphasen vorlagen und den größten einheitlichen Anteil bildeten. *Abb. 12* zeigt exemplarisch einen aus LLC1-Zellen gewonnenen tetraploiden Chromosomensatz.

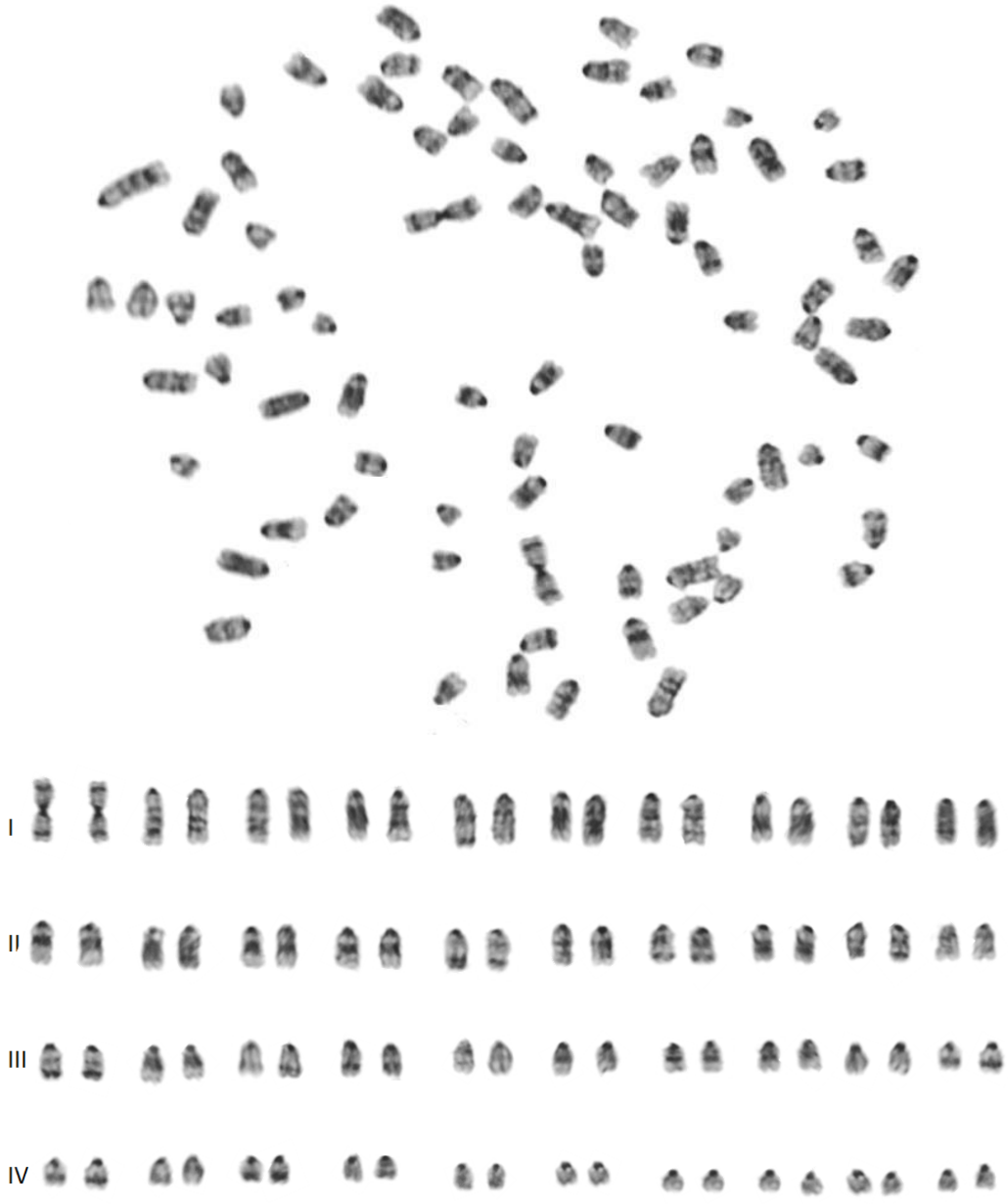


Abbildung 12: Karyogramm der LLC1-Zellen

oben: Unsortiertes Karyogramm der LLC1-Zellen direkt nach Präparation (tetraploid, 40 Chromosomenpaare) unten: Karyogramm der LLC1-Zellen größenweise sortiert (tetraploid, 40 Chromosomenpaare).

4.5 Strahlenbiologische Analyse

Die Grundlage für weiterführende strahlenbiologische Versuche und die Bestrahlungsexperimente mit dicht ionisierender Partikelstrahlung war die Anfertigung einer Dosis-Effekt-Kurve nach Photonenbestrahlung. Dazu wird das klonogene Zellüberleben in logarithmischem Maßstab gegen die Dosis in linearem Maßstab aufgetragen. Aus den so, entweder nach dem Single-Hit-Multi-Target-Modell oder dem linearquadratischem Modell, generierten Kurven lassen sich mathematisch bestimmte Parameter gewinnen, die unterschiedliche Zelltypen hinsichtlich ihrer individuellen Strahlenempfindlichkeit charakterisieren und die Zellen so strahlenbiologisch vergleichbar machen. Dazu gehören die 37%-Inaktivierungsdosis (D_0), die Quasithresholddosis (D_q), die Extrapolationsnummer n, sowie die nach dem linearquadratischen Modell berechneten α- und β-Werte und der aus ihnen gebildete Quotient. Dieser Wert bezeichnet die Dosis, bei der die Beiträge zur Zellinaktivierung durch den linearen und den quadratischen Term gleich groß sind (vgl.2.5).

4.5.1 Dosis-Effekt-Kurve (DEK)

Diese Kurve bildet das klonogene Überleben der LLC1-Zellen, d.h. den Anteil der koloniebildungsfähig vorliegenden Zellen post rad ab *(*vgl*. Abb. 13)*. Die Wahrscheinlichkeit des klonogenen Zellüberlebens ist hierbei streng an die applizierte Dosis im Zielvolumen gekoppelt. So überleben in der unbestrahlten Kontrollgruppe 100 % der Zellen, bei einer minimal applizierten Dosis von 0,5 Gy 93 % der Zellen und bei einer maximal applizierten Dosis von 10 Gy noch 0,4 % der bestrahlten Zellen *(*vgl*. Tab. 7a)*. Die die zelluläre Reparaturkapazität noch nicht übersteigende Subletaldosis, die sogenannte Quasithreshold-Dosis (D_q), liegt für die LLC1-Zellen bei 1,491 Gy, die 37 %-Inaktivierungsdosis (D_0), bei der eine Reduktion der vitalen Zellen um 37 % eintritt, liegt für die LLC1-Zellen bei 1,678 Gy *(*vgl*. Tab. 7b)*.

a)

Dosis [Gy]	Überleben [%]
0	100
0,5	93
1	84,7
1,5	75,5
2	65,9
2,5	56,4
3	47,2
4	31,0
5	18,8
6	10,4
8	2,5
10	0,4

b)

D_0 [Gy]	1,678
n [Gy]	2,432
D_q [Gy]	1,491
A	0,124
B	0,042
α/β [Gy]	4,8205

Tabelle 7: Dosis-Wirkungsbeziehungen bei LLC1-Zellen

a) Prozentuales Überlebensniveau der LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung mit unterschiedlichen Dosen b) nach Single-Hit-Multi-Target-Modell errechnete Werte für 37 %-Inaktivierungsdosis (D_0), die Extrapolationsnummer (n), Quasithreshold Dosis (D_q) und die nach dem linearquadratischen Modell errechneten α/β- Werte (vgl. 2.5).

Diese beiden Werte sind wichtig für die strahlenbiologische Einschätzung der Zellen und erlauben zusammen mit den, aus dem linearquadratischen Modell errechneten α- und β- Werten und dem α/β-Wert, eine Einschätzung der Strahlensensibiliät und der Reparaturkapazität der LLC1-Zellen.
In der DEK zeigen sich diese unterschiedlichen Erholungsfähigkeiten grafisch in Form einer mehr (Überwiegen des quadratischen β-Anteils) oder weniger (Überwiegen des linearen α-Anteils) ausgeprägten Erholungsschulter *(*vgl*. Abb. 2)*. Die Ausprägung der Erholungsschulter ist dabei abhängig vom Ausmaß der vorhandenen Erholungs- und Reparaturmechanismen der bestrahlten Zelle.
Bei den LLC1-Zellen liegt der α/β-Wert bei 4,82 Gy *(*vgl. *Tab. 7b)*. Anhand der Werte D_q von 1,491 Gy, D_0 von 1,678 Gy und α/β von 4,82 Gy lassen sich die LLC1-Zellen als strahlensensible Zellen mit mäßig bis schlecht ausgeprägter Reparaturkapazität einstufen.

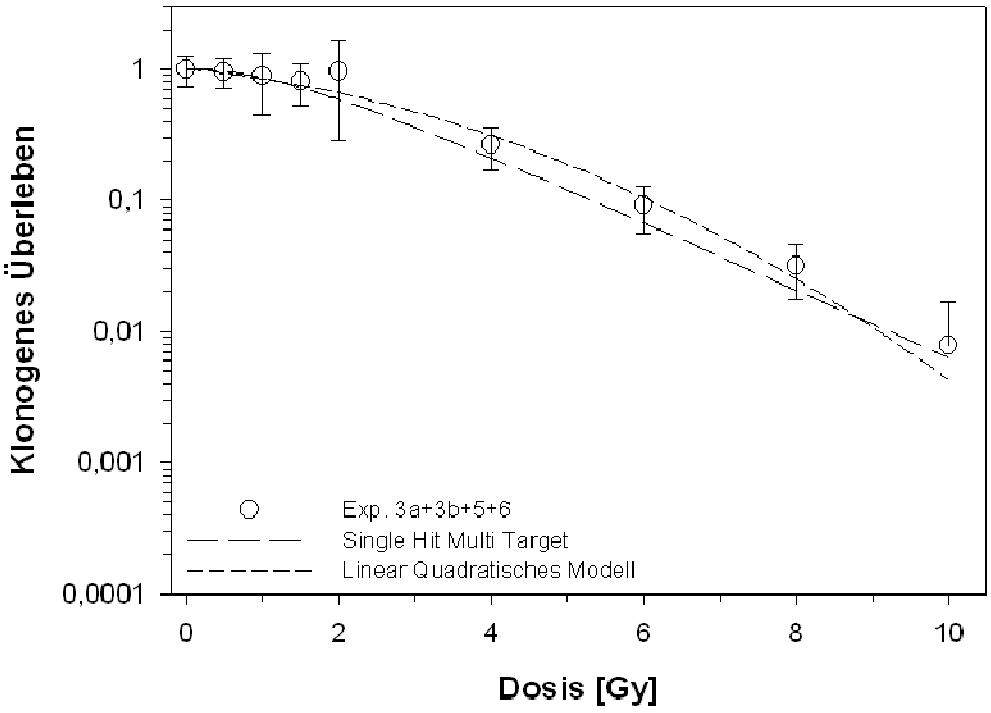


Abbildung 13: Klonogenes Überleben LLC1 nach Photonebestrahlung

Abb. 13 zeigt die dosisabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens der LLC1-Zellen nach Bestrahlung mit dünn ionisierender Photonenstrahlung, errechnet nach dem linearquadratischen Modell und dem Single-Hit-Multi-Target-Modell aus vier unabhängigen Bestrahlungsexperimenten.

4.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Ziel der klinischen Bestrahlungstherapie ist eine lokale Kontrolle des Tumorwachstums. Die schwerwiegendsten biologischen Effekte auf zellulärer Ebene sind die Hemmung der Proliferation (Zyklusarrest, Seneszenz) und der Zelltod (Apoptoseinduktion) und zum Anderen der Zellzyklusarrest mit Einleitung von Reparaturprozessen.
Die gleichen Effekte der Photonenbestrahlung auf zelluläre Mechanismen lassen sich auch *in vitro* mittels FACS-Analyse nachweisen.

4.5.2.1 Strahleninduzierte Zellzyklusarretierung

Nach Bestrahlung mit Photonen wurden die LLC1-Zellen bezüglich der radiogenen Einflüsse auf die Zellzyklusprogression untersucht. Von Interesse war dabei der G2/M Zellzyklusarrest und der G1 Arrest im Sinne einer zellulären Strahlenantwort auf radiogene DNA-Schäden (vgl. 3.5.1). Dabei zeigten sich dosis- und zeitabhängig unterschiedlich ausgeprägte Effekte auf die Arretierung der Zellen in der G2-Phase, wobei mit steigender Dosis bei gemeinsamer Betrachtung aller Analysezeitpunkte durchschnittlich mehr Zellen in der G2-Phase vorlagen (27 % der unbestrahlten Kontrolle, 31 % nach 2 Gy und 42 % nach 6 Gy). Insbesondere bei den nach frühen Zeitpunkten (6 h und 12 h) nach Bestrahlung analysierten Proben zeigte sich eine deutliche Steigerung des in der G2-Phase vorliegenden Zellanteils im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, wobei der G2-Anteil der mit 6 Gy bestrahlten Zellen höher war als der G2-Anteil der mit 2 Gy bestrahlten Zellen. 6 h nach Bestrahlung befanden sich 37 % der unbestrahlten Zellen, 47 % der mit 2 Gy bestrahlten Zellen und sogar 60 % der mit 6 Gy bestrahlten Zellen in der G2-Phase. Eine ebenso deutliche Erhöhung der G2-Fraktion zeigte sich auch 12 h nach Bestrahlung. Hier lagen 22 % der unbestrahlten Kontrolle, 36 % der mit 2 Gy bestrahlten Zellen und 56 % der mit 6 Gy bestrahlten Zellen in der G2-Phase vor.
Zwischen 18 h und 36 h post rad reduzierte sich der G2-Anteil im Vergleich zu frühen Zeitpunkten deutlich, lag aber nach Bestrahlung mit 6 Gy immer noch deutlich über der unbestrahlten Kontrolle. Im gleichen Zeitraum (+ 18 h post rad) näherten sich die G2-arretierten Anteile der mit 2 Gy bestrahlten Gruppe und der unbestrahlten Kontrolle einander an, wobei sich der G2-Anteil der mit 2 Gy bestrahlten Gruppe (18 %) 48 h post rad nicht maßgeblich von der unbestrahlten Kontrolle (17 %) unterschied. Dies legt für mit 2 Gy bestrahlte LLC1-Zellen ein Ende des G2-Arrests mit Wiedereintritt in die Mitose spätestens 48 h nach Bestrahlung nahe. Der G2-Anteil der mit 6 Gy bestrahlten Gruppe war auch nach 48 h mit 36 % noch deutlich erhöht und kein Ausgang aus dem G2-Arrest erkennbar. Tendenziell zeigte sich zwischen 18 h und 36 h post rad mit 6 Gy eine Steigerung des in der G2-Phase vorlie-

genden Zellanteils im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle *(*vgl *Abb. 14a)*.
Der prozentuale Anteil der in der G1-Phase befindlichen LLC1-Zellen zwischen 6 h und 48 h nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, ließ keine G1-Phasenarretierung nach Bestrahlung erkennen. So lag der prozentuale Anteil der in der G1-Phase befindlichen LLC1-Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy insbesondere zu frühen Analysezeitunkten deutlich unter dem der unbestrahlten Kontrolle. In der unbestrahlten Kontrolle lagen 43 % (6 h post rad), 48 % (12 h post rad), 43 % (18 h post rad), 45 % (24 h post rad), 43 % (30 h post rad), 49 % (36 h post rad) und 55 % (48 h post rad) der LLC1-Zellen in der G1-Phase vor. Der Prozentanteil der nach 6 Gy Bestrahlung in der G1-Phase befindlichen LLC1-Zellen lag zu allen Analysezeitpunkten mit 16 % (6 h post rad), 30 % (12 h post rad), 37 % (18 h post rad), 38 % (24 h post rad), 41 % (30 h post rad), 37 % (36 h post rad) und 42 % (48 h post rad) deutlich niedriger (vgl. *Abb. 14* & *15*).

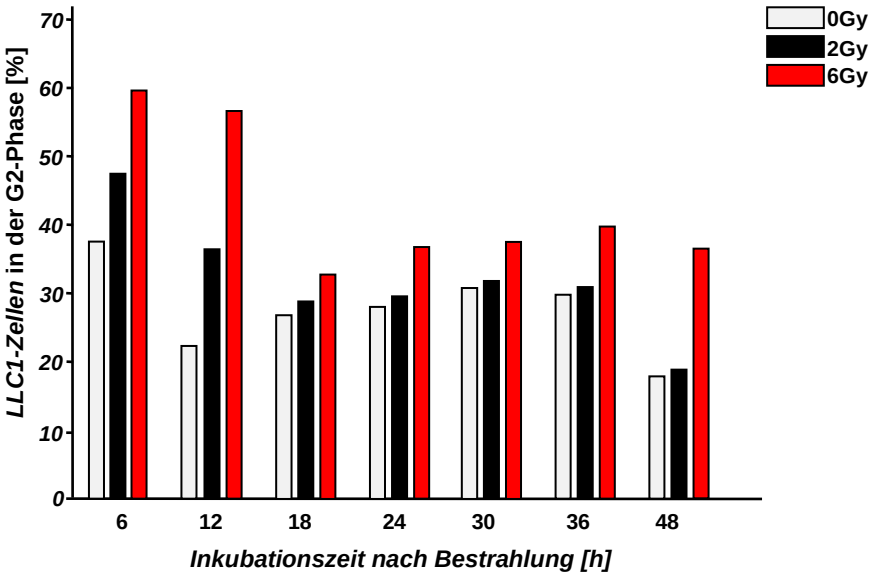


Abbildung 14a: LLC1-Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (Photonen) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe

Prozentualer Anteil in der G2-Phase befindlicher LLC1-Zellen zwischen 6 h und 48 h nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolgruppe. Dabei zeigt sich die maximale Ausprägung des G2-Arrest zu den Zeitpunkten 6 h und 12 h post rad. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigt sich ein Ende des G2-Arrests 18 h post rad. Nach Bestrahlung mit 6 Gy ist ein bleibender G2-Arrest bis 48 h post rad festzustellen.

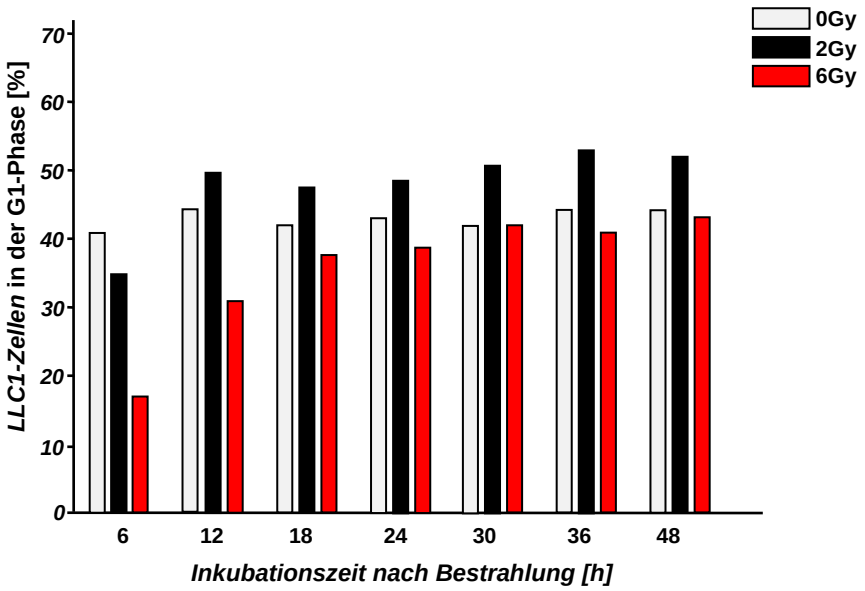


Abbildung 14b: LLC1-Zellen in der G1-Phase nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (Photonen) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe

Prozentualer Anteil in der G1-Phase befindlicher LLC1-Zellen zwischen 6 h und 48 h nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Dabei ist nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy keine G1-Phasenarretierung zwischen 6 h und 48 h nach Bestrahlung feststellbar.

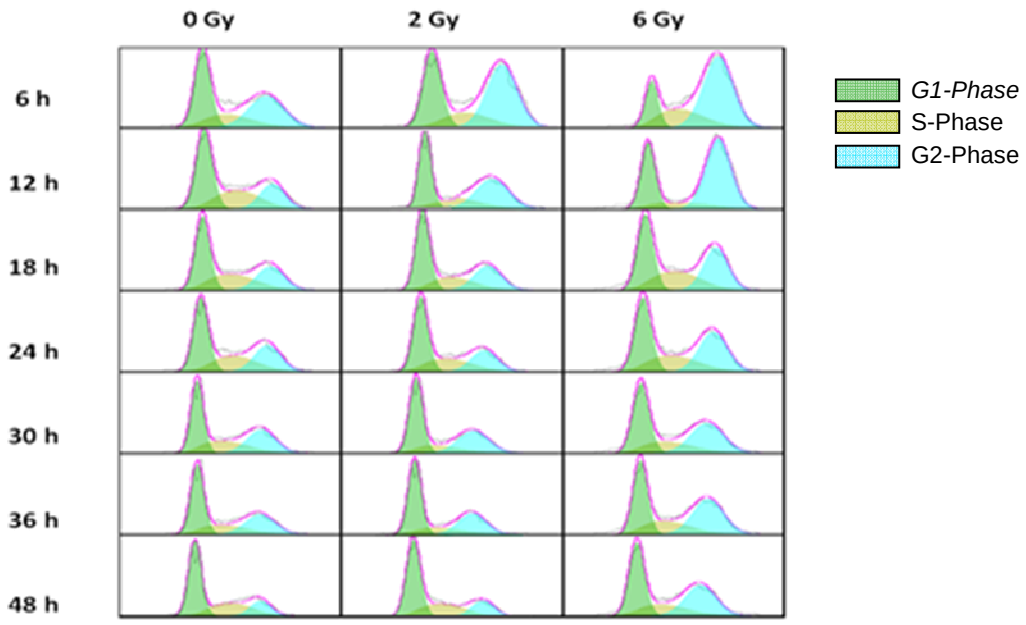


Abbildung 15: Zellzyklusverteilung der LLC1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Photonenbestrahlung mit unterschiedlichen Dosen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse mit jeweils 20.000 Einzelzellen und drei unabhängigen biologischen Experimenten.

Zellzyklusverteilung der LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy zu unterschiedlichen Zeitpunkten post rad. Auch hier zeigt sich ein persistierender G2-Arrest bis 48 h nach Bestrahlung mit 6 Gy. Zwischen 6 h und 48 h post rad zeigt sich keine G1-Arretierung.

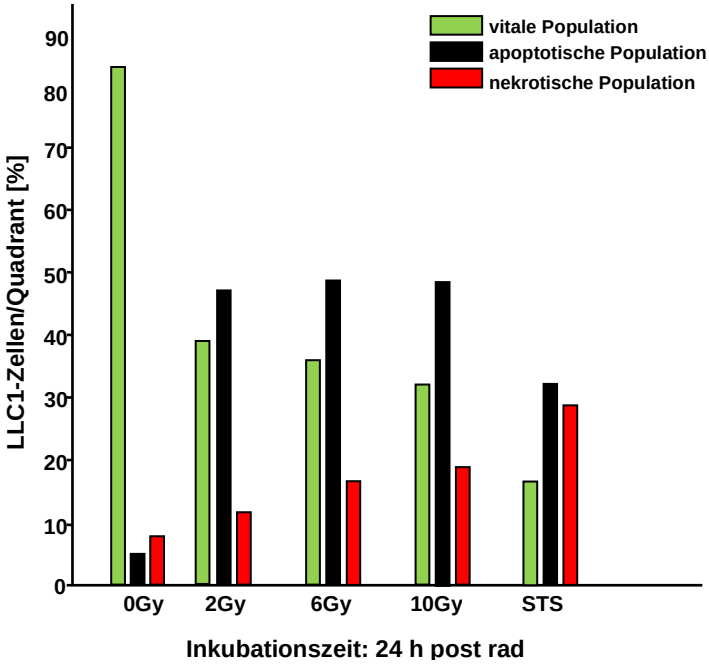
4.5.2.2 Strahleninduzierte Apoptoseinduktion

Der physiologische Mechanismus der Zelle sich selbst zu zerstören wird Apoptose genannt (Kerr et al., 1972). In allen Zellen wird nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung mit ausreichender Schadensdichte und irreparabler Beeinträchtigung des zytologischen Metabolismus die Apoptose induziert (vgl 2.3). Ziel der Apoptose ist die Wahrung der Gewebshomöostase durch Entfernung irreparabel geschädigter Zellen. Apoptotische Zellen zeigen nachweisbare biochemische und morphologische Kriterien (Arends and Wyllie, 1991, Wyllie, 1993). So können frühapoptotische und spätapoptotische/nekrotische Zellen nach einer Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit Annexin-V-FITC und PI (vgl. 3.5.2) anhand unterschiedlicher Fluoreszenzsignale mittels Durchflusszytometrie identifiziert und von vitalen Zellen unterschieden werden (vgl. 3.5.2).

Nach dem *gating* der dot-plots (vgl. *Abb. 17)* zeigte sich die prozentuale Verteilung der LLC1-Zellen nach Bestrahlung unterschiedlicher Dosen von 2 Gy, 6 Gy, 10 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe (vgl. *Abb 16*). Der Einfluss der Bestrahlung auf die Apoptoseinduktion wurde mit einer unbestrahlten Negativkontrolle und mit einer mit Staurosporin behandelten Positivkontrolle verglichen. Staurosporin hemmt direkt die Thyrosinkinase (Nakano et al., 1987) und wirkt stark zytotoxisch auf verschiedene Tumorzelllinien (Tamaoki et al., 1986). In der unbestrahlten Kontrolle waren 84,6 % der LLC1-Zellen vital und nur 12 % frühapoptotisch oder spätapoptotisch/nekrotisch. In der Staurosporin-behandelten Positivkontrolle war der Anteil der vitalen Zellen auf 27,4 % stark reduziert und der Anteil der frühapoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen auf 63,5 % deutlich erhöht (32,5 % frühapoptotisch, 31 % spätapoptotisch/nekrotisch).

Für die mit Photonen bestrahlten LLC1-Zellen lagen die Verteilungswerte dazwischen. Bei einer Dosis von 2 Gy war der Anteil vitaler Zellen mit 39,6 % bereits geringer als der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen mit 59,6 % (47,2 % apoptotische, 12,7 % nekrotisch). Nahezu die gleiche LLC1-

Fraktion war auch nach Bestrahlung mit 6 Gy apoptotisch (47,6 %), wobei nach Applikation dieser Dosis die vitale Fraktion erniedrigt (36,0 %) und die nekrotische Fraktion erhöht (15,7 %) war. Nach Applikation der Maximaldosis von 10 Gy überlebten nur 34,8 % der bestrahlten Zellen und 64,6 % waren frühapoptotisch oder spätapoptotisch/nekrotisch (48,4 % frühapoptotisch, 16,2 % spätapoptotisch/nekrotisch). Nach Auswertung aller Bestrahlungsexperimente zeigte sich eine Zunahme der apoptotischen Fraktion im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, wobei die Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 10 Gy vergleichbare Werte zeigte. Der Anteil frühapoptotischer LLC1-Zellen war zu allen Dosiskonditionen deutlich größer als der Anteil spätapoptotisch/nekrotischer Zellen. Der Anteil spätapoptotisch/nekrotischer Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 10 Gy vergrößert sich mit zunehmender Dosis nur gering und



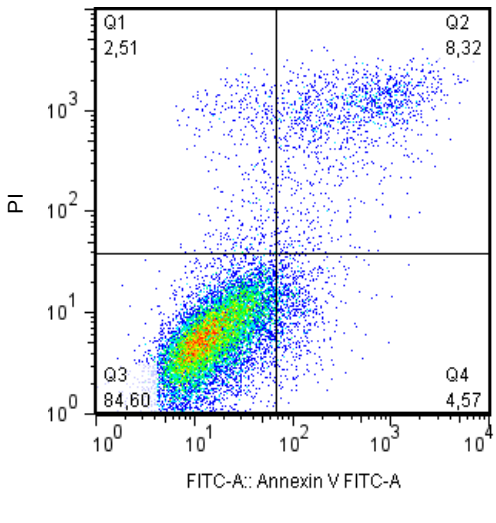
liegt zu allen Konditionen unter dem Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Zellen in der mit Staurosporin behandelten Positivkontrolle (vgl. *Abb. 16*).

Abbildung 16: Apoptoseinduktion der LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung mit unterschiedlichen Dosen im Vergleich zu einer Staurosporin behandelten Positivkontrolle und einer unbestrahlten Negativkontrolle.
Prozentuale Verteilung der LLC1 Zellen zwischen vitalen, frühapoptotischen, spätapoptotisch/nekrotischen Zellen 24h nach Photonenbestrahlung mit Dosen von 2, 6 und 10 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe, sowie Be-

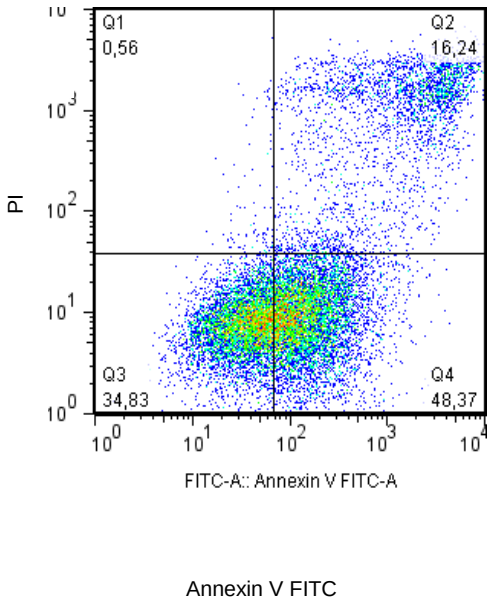
handlung mit Staurosporin (STS), einem stark zytotoxisch wirkendem Alkaloid als Positivkontrolle.

Abbildung 17: FACS dot-plot LLC1-Zellen 24h nach Photonenbestrahlung

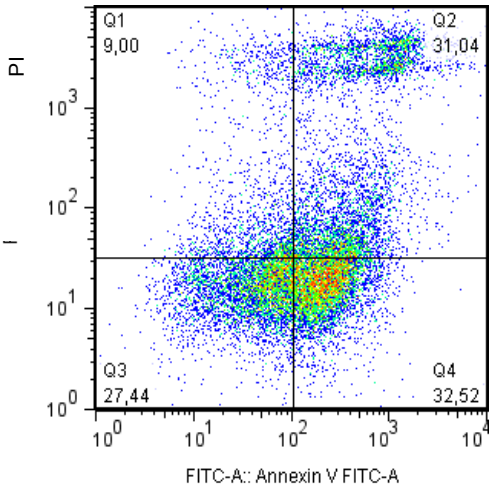
a) Dot-plot mit Quadrantenanalyse der unbestrahlten Kontrolle. Zu dieser Kondition betrug der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtpopulation 84,6 % (Q3), der Anteil frühapoptotischer 4,57 % (Q4) und der Anteil spätapoptotisch/nekrotischer 10,83% (Q1+Q2).



b) Dot-plot nach Exposition gegenüber 10 Gy Photonenstrahlung Zu dieser Kondition betrug der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtpopulation 34,8 % (Q3), der Anteil frühapoptotischer 48,3 % (Q4) und der Anteil spätapoptotisch/nekrotischer 16,8 % (Q1+Q2).



c) Dot-plot der Staurosporin (STS) be-behandelte Positivkontrolle mit Positivierung auf beiden Signalebenen und 27,4 % vitalen (Q3), 32,5 %



frühapoptotischen (Q4) und 40 % spätapoptotisch/nekrotischen (Q1+Q2) LLC1-Zellen.

Annexin V FITC

4.5.3 Doppelstrangbruchreparatur

Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung werden an der DNA Schäden in Form von Basenschäden und Strangbrüchen erzeugt. Die schwerwiegendsten Schäden stellen die Doppelstrangbrüche (DSB) dar, an deren Reparatur spezielle Histone u.a. die phosphorylierte Form des Histons H2AX (γH2AX) beteiligt sind (vgl. 2.4).

Mittels spezifischer Antikörper kann das, sich am DSB anreichernde γH2AX und somit auch der DSB als solcher fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dabei wurden LLC1-Zellen mit 1 Gy bestrahlt und mit einer unbestrahlten Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten post rad verglichen.

In unbestrahlten Kontrollen fanden sich zu allen Abnahmezeitpunkten durchschnittlich 9 γH2AX Foci/Kern und mindestens 80 % der Kerne zeigten zwischen 6 und 12 Foci. Diese DSB der unbestrahlten Kontrolle sind auf physiologisch vorliegende freie DNA Enden während mitotischer Replikationsprozesse zurückzuführen, an denen ebenfalls γH2AX kumuliert. Nach Bestrahlung fand sich zu den frühen Abnahmezeitpunkten nach 10 min, 30 min und 2 h eine deutlich erhöhte Zahl von γH2AX Foci, mit einem Maximum nach 30 min. So konnten 10 min post rad bereits durchschnittlich 20 Foci/Kern detektiert werden und mindestens 80% der Kerne zeigten eine Focuszahl zwischen 13 und 24. Die maximale Focuszahl, also auch die maximale Ausschöpfung der schnellen Reparaturkapazität lag 30 min post rad mit durchschnittlich 26 Foci/Kern vor, wobei mindestens 80 % der Zellen zwischen 20 und 30 Foci zeigten.

Bereits 2 h post rad war das Maximum der schnellen Reparatur bereits überschritten und pro Kern zeigten sich bei mindestens 80 % der Zellen nur noch 12 bis 19 Foci/Kern mit durchschnittlich 14 Foci/Kern. Zu späten Analysezeitpunkten war die Anzahl der Foci mit 9 Foci/Kern nach 6 h und 24 h im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nicht mehr erhöht (vgl. *Abb. 18, 19*).

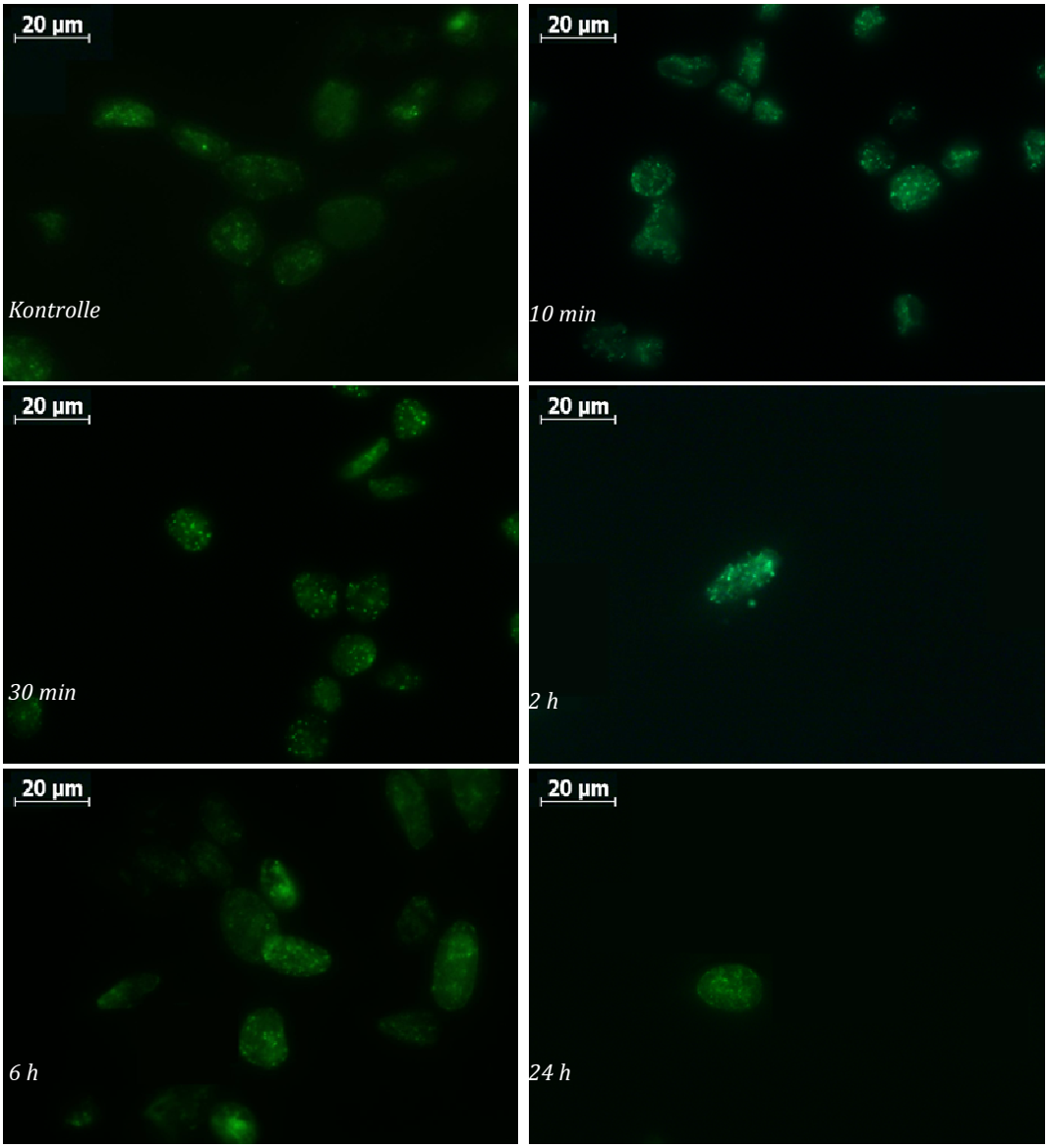


Abbildung 18: γH2AX-Foci nach Photonbestrahlung mit 1 Gy

γH2AX-Fluoreszenzfärbung der LLC1-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy zur Analyse der schnellen Doppelstrangbruch-Reparatur a) unbestrahlte Kontrolle (Ø 9 Foci/Zelle) b) 10 min post rad (Ø 20 Foci/Zelle) c) Signalmaximum nach 30 min post rad (Ø 26 Foci/Zelle) d) 2 h post rad (Ø 14 Foci/Zelle) e) 6 h post rad (Ø 9 Foci/Zelle) keine Signalerhöhung zur unbestrahlten Kontrolle f) 24 h post rad (Ø 9 Foci/Zelle) keine Signalerhöhung zur unbestrahlten Kontrolle.

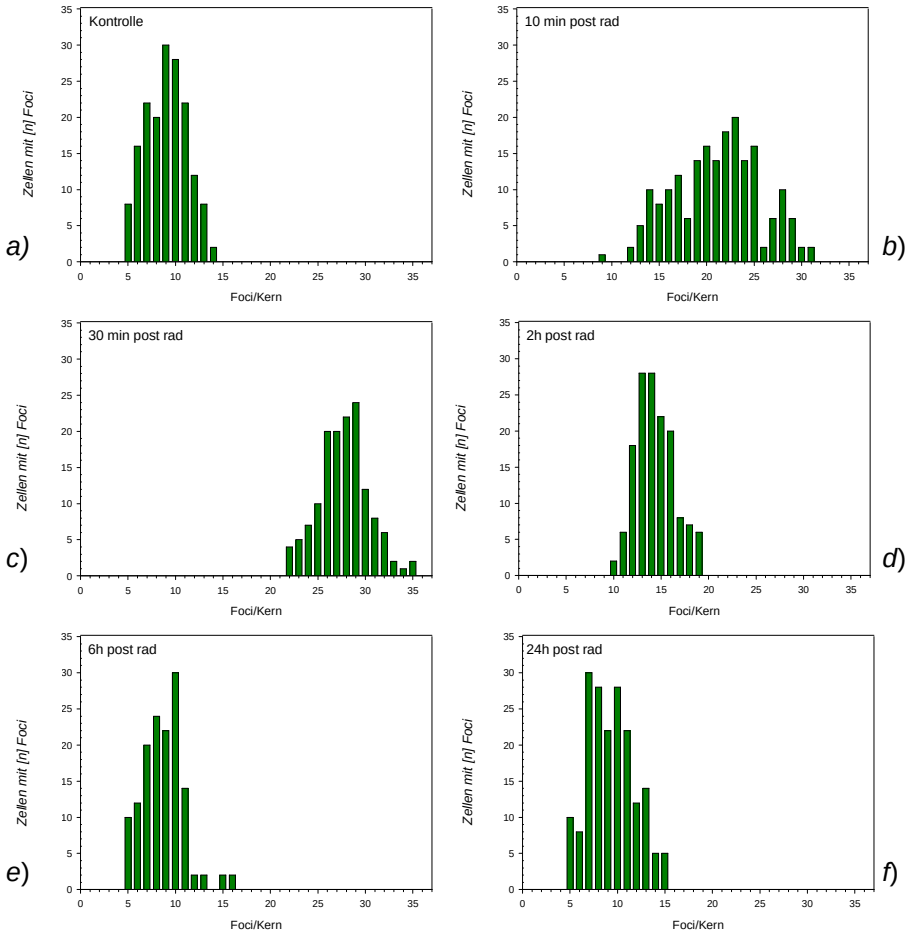


Abbildung 19: γH2AX-Foci in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung mit 1 Gy

Anzahl der γH2AX-Foci/Zellkern (x-Achse) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Photonenbestrahlung mit 1 Gy. Abbildung 18 zeigt die unbestrahlte Kontrolle (a) sowie LLC1-Zellen 10 min (b), 30 min (c), 2 h (d), 6 h (e) und 24 h (f) nach Bestrahlung. Dabei zeigten sich in der unbestrahlten Kontrolle zu allen Analysezeitpunkten Ø 9 Foci/Kern (a), 10 min nach Bestrahlung war ein Anstieg auf Ø 20 Foci/Kern festzustellen (b), bereits 30 min post rad war mit Ø 26 Foci/Kern die maximale Ausprägung der schnellen DNA-DSB-Reparatur erreicht (c), 2 h nach Bestrahlung war bereits ein deutlicher Rückgang der ablaufenden Reparaturmechanismen mit 14 Ø Foci/Kern zu verzeichnen (d), 6 h nach Bestrahlung war die Anzahl der Foci/Kern (Ø 9/Kern) wieder auf das Ausgangsniveau der unbestrahlten Kontrolle abgesunken (e). Auch zum spätesten Analysezeitpunkt 24 h post rad war mit Ø 9 Foci/Kern kein Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle mehr feststellbar (f).

4.5.4 Proteinstatus

4.5.4.1 CDKN1A (p21)

Via Inhibition der Kinaseaktivität aller Cyklin/CDK-Komplexe kann CDKN1A (p21) über p53 den Zellzyklus und die Proliferation verlangsamen oder inhibieren. Wird p21 in einer Zelle überexprimiert, kommt es zu einem G1- und S-Phase Arrest (vgl. 2.3.3). Von besonderem Interesse der strahlenbiologischen Analyse zellulärer Reaktionsmechanismen in LLC1-Zelle war die Frage, ob p21 in LLC1-Zellen p53 abhängig exprimiert wird und ob nach Photonenbestrahlung eine messbare p21-Regulation stattfindet.

Zur p21-Quantifizierung wurde über das ubiquitär exprimierte Glykolyse-Protein GAPDH eine Standardisierung der optisch detektierbaren p21-Signale mitgeführt. Es zeigte sich sowohl in unbestrahlten als auch bestrahlten LLC1-Zellen keine p21-Expression (vgl. *Abb. 20* & *21*). Daher sind die LLC1-Zellen als p21 defiziente Zellen einzustufen. Vergleichend wurden zu beiden Konditionen humanen Adenokarzinomzellen A549 untersucht, dabei zeigte sich für diese Zell-Linie ein deutlich über dem der LLC1-Zellen liegendes p21-Expressionsniveau (vgl. *Abb. 20* & *21*).

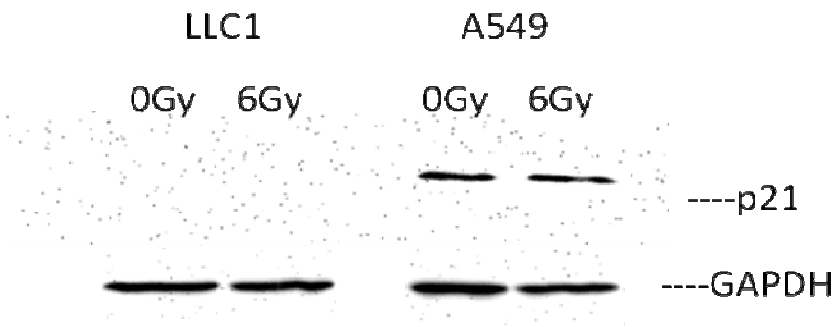


Abbildung 20: p21-Expression in LLC1- und A549-Zellen 3 h nach Bestrahlung

Zeigt die p21-Expression (3 h post rad) in unbestrahlten und mit 6 Gy Photonen bestrahlten murinen LLC1-Zellen und humanen Adenokarzinomzellen (A549) im Vergleich zu GAPDH als Gelladekontrolle (30 µg Gesamtprotein/ lane). In A549-Zellen zeigt sich eine deutliche p21-Expression in der unbestrahlten Kontrolle, sowie einen Anstieg 3 h nach Bestrahlung mit 6 Gy.

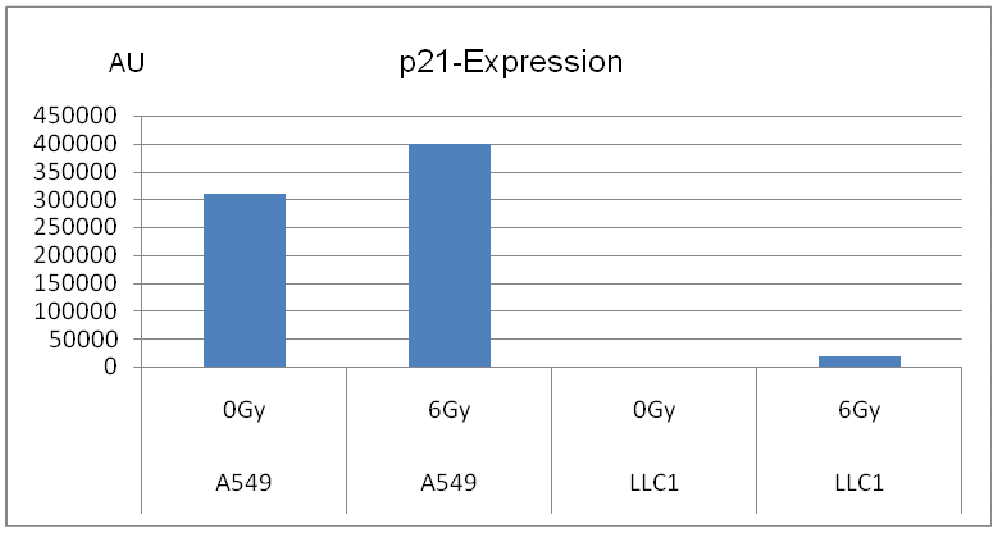


Abbildung 21: p21-Expression in LLC1- und A549-Zellen

p21-Expression nach Korrektur des Hintergrunds und Normierung gegen die Ladekontrolle GAPDH (Arbitrary Units=AU) von LLC1-Zellen im Vergleich zu humanen A549-Zellen 3 h nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy. LLC1-Zellen zeigen

keine p21-Expression. A549-Zellen zeigen eine deutliche Expression und einen p21-Anstieg nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy.

4.5.4.2 p53

Das Tumorsuppressorgen p53 spielt mittels seines transkriptionell aktiven Genprodukts eine zentrale Rolle für die zelluläre Reaktion auf strahleninduzierte DNA-Schäden (vgl. 2.3.1). Das p53-Protein wirkt dabei als Transkriptionsfaktor für Gene, die mit ihren Produkten den Zellzykluarrest, DNA-Reparaturmechanismen und die Apoptoseinduktion direkt beeinflussen (vgl. 2.3). Von besonderem Interesse der strahlenbiologischen Analyse zellulärer Reaktionsmechanismen in LLC1-Zelle war die Frage, ob p53 in LLC1-Zellen exprimiert wird und ob nach Photonenbestrahlung eine messbare p53-Regulation stattfindet.

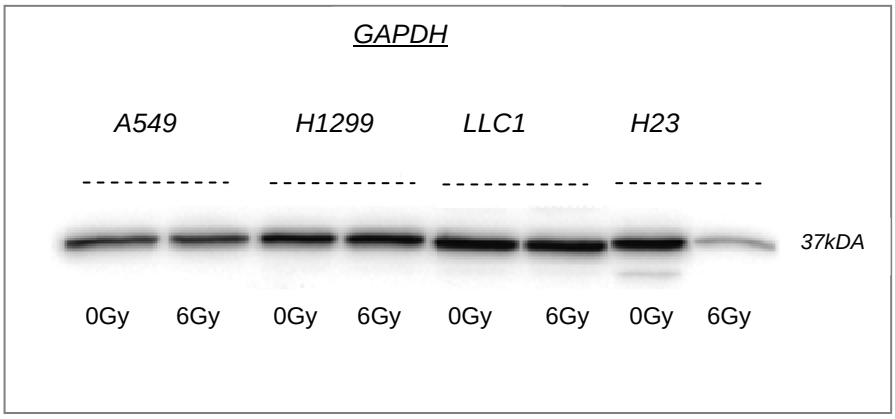
Um Rückschlüsse auf die Aktivierbarkeit von p53 in LLC1- Zellen zu erhalten, wurde die Expression von phospho-p53 Ser15 nach Bestrahlung untersucht. Serine des p53 Tumorsuppressors werden über verschiedene Kinasen phosphoryliert und über diesen Mechanimus p53 aktiviert. Serin 15 wird nach Bestrahlung durch die ATM-und DNA-Kinase und MAPKs phosphoryliert.

Zur Quantifizierung der phosphorylierten p53-Form (P-p53(Ser15)) wurde GAPDH als Ladekontrolle mitgeführt (vgl. *Abb. 22*). Es zeigte sich sowohl in unbestrahlten als auch bestrahlten LLC1-Zellen eine Expression des phosphorylierten Serin 15, die zu beiden Konditionen deutlich über dem der vergleichend analysierten H1299-Zellen (p53-*null*, humane, nicht kleinzellige Bronchialkarzinomzellen) und A549-Zellen (p53 *wildtyp*, humane Adenokarzinomzellen) lag. So war das P-p53(Ser15)-Expressionsniveau auch in unbestrahlten LLC1-Zellen im Vergleich zu defizitären H1299-Zellen um das 6-fache und im Vergleich zu A549-Zellen um das 4-fache erhöht. Ebenso deutlich fielen die Expressionsunterschiede 3 h nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy aus, hier zeigte sich eine 31-fache Erhöhung im Vergleich zu defizitären H1299-Zellen und eine Verdopplung im Vergleich zu A549-Zellen (vgl. *Abb. 23*).

Von strahlenbiologischem Interesse war nicht nur die beschriebene Quantität

des Proteingehaltes in den LLC1-Zellen, sondern auch die p53 Aktivierbarkeit nach Bestrahlung. Die Steigerung der Expressionsrate des phospho-p53 Serin 15 verdeutlicht die Reaktions- und Regulationsfähigkeit der Zelle nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung. 3h nach Bestrahlung der A549-Zellen mit 6 Gy Photonenbestrahlung konnte eine nahezu 8-fach höhere P-p53(Ser15)-Menge als in der unbestrahlten Kontrolle detektiert werden. In der Westernblot-Analyse wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein (30 µg) eingesetzt. Zwar lag in LLC1-Zellen nach 6 Gy Photonbestrahlung eine deutlich höhere Signalstärke als in den A549-Zellen vor (vgl. *Abb. 22&23),* im Vergleich zu unbestrahlten LLC1-Zellen war das Expressionsniveau jedoch nur um das 3,5-fache erhöht (vgl*. Abb. 23*).

a)



b)

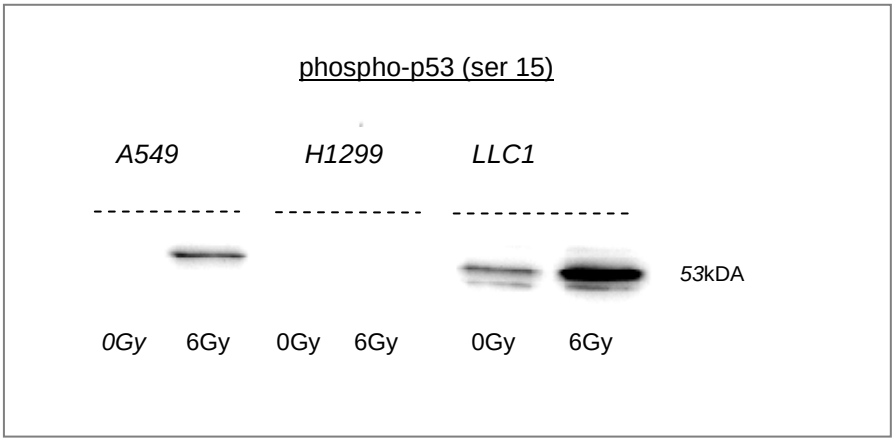


Abbildung 22: Westernblot zur GAPDH- und p53-Expression in LLC1-Zellen3 h nach Photonenbestrahlung

a) zeigt die GAPDH (ubiquitär exprimiertes Protein der Glykolyse)-Expression in humanen Adenokarzinomzellen (A549), humanen nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen (H1299), murinen Adenokarzinomzellen (LLC1) und humanen Adenokarzinomzellen (H23) jeweils 3 h nach Photonenbestrahlung mit 0 Gy und 6 Gy.
b) zeigt die im Vergleich zur p53-null Zell-Linie H1299-Zellen und p53-wildtyp Zelllinie A549 deutlich erhöhte P-p53(Ser15) -Expression von LLC1-Zellen 3 h nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

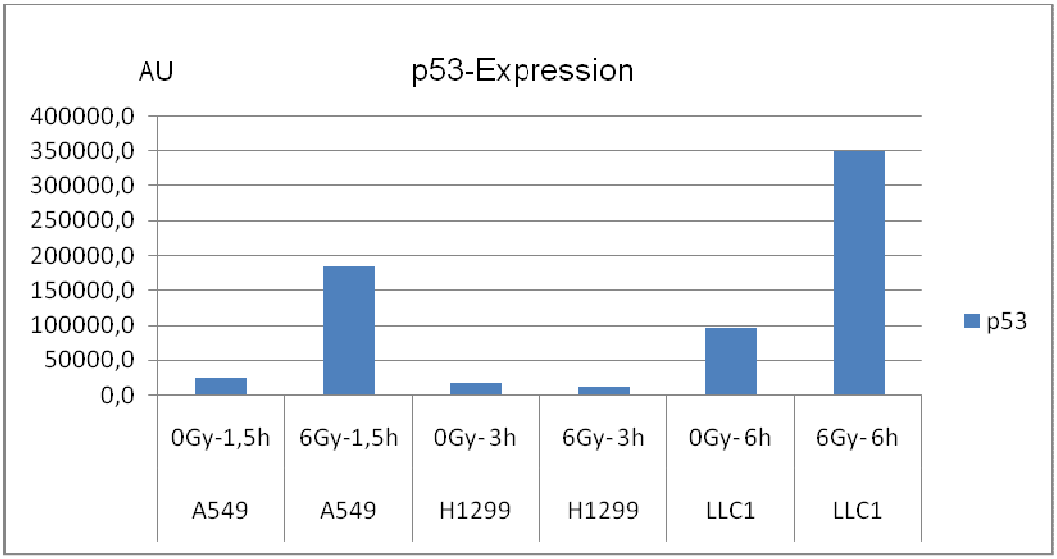


Abbildung 23: p53-Expressionsniveau unterschiedlicher Zellen

p53-Exressionsniveau (Arbitrary Units=AU) von LLC1-Zellen im Vergleich zu p53-defizitären H1299-Zellen und humanen A549-Zellen 3 h nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy jeweils im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. LLC1-Zellen zeigen bestrahlt und unbestrahlt ein höheres p53-Expressionsniveau als H1299- und A549-Zellen, sowie einen starken Anstieg des Expressionsniveaus nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy.

4.5.5 Mutationsanalyse des murinen p53 Gens (Trp53) in LLC1

Bei der Sequenzierung des p53-Gens zeigte sich Sequenz 2 unverändert. In Sequenz 1 (94-115 forward) zeigte sich bei Leserichtung in 5´-3´-Richtung zu Beginn des Synthetisierungsprozesses an Basenposition 120 eine heterozygote Mutation mit parallelem Vorliegen zweier Nukleinbasen. In der Wildtyp-p53 Sequenz liegt an dieser Position das Basen-Triplett Guanin-Adenin-Adenin, das für Glutaminsäure kodiert. Durch eine heterozygote Mutation wird in einem Strang die Base Guanin durch Uracil (Thymin) substituiert. Das so generierte Basen-Triplett Uracil-Adenin-Adenin (UAA) (vgl. *Abb. 24*) kodiert für ein STOP-Codon (vgl. 5.2.7 & *Abb. 32*), das die Translation des zugehörigen p53-Proteins an dieser Stelle unterbricht.
In der zu Sequenz 1 gegenläufigen Sequenz 3 (901- 921 revers) konnte die heterozygote Mutation ebenfalls nachgewiesen werden (vgl. *Abb. 25*). Durch diese Mutation ist eine suffiziente Proteinbiosynthese des p53-Proteins in LLC1-Zellen nicht möglich und eine Funktionalität des Proteins nicht gegeben.

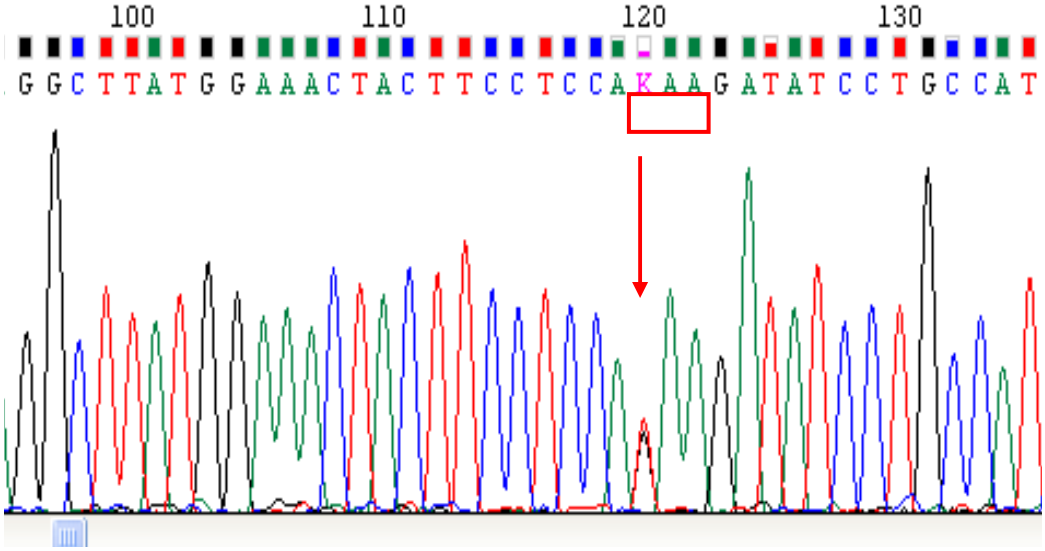


Abbildung 24: Trp 53 Basensequenz 1 aus LLC1 Zellen (fwd sequence) mit Leserichtung 5´-3´

Die gezeigte Basensequenz 1 weist an Basenposition 120 (Pfeil) eine heterozygote Mutation mit parallelem Vorliegen zweier Nucleinbasen, Guanin (schwarz) und Thymin/Uracil (rot) auf (K). Dabei generiert sich das Basen-Triplett Thymin/Uracil-Adenin- Adenin, wobei UAA für ein STOP-Codon codiert das die Translation des zugehörigen p53-Proteins an dieser Stelle unterbricht.

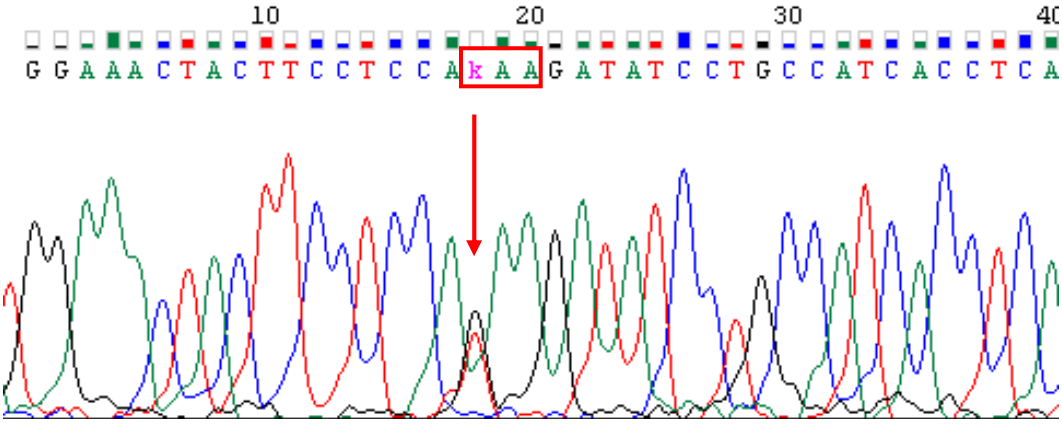


Abbildung 25: Trp 53 Basensequenz 3 aus LLC1 Zellen mit Leserichtung 3`5`

Die gezeigte Basensequenz 3 (gegenläufig zu Sequenz 1) zeigt an Basenposition 18 (Pfeil) dieselbe heterozygote Mutation mit parallelem Vorliegen zweier Nucleinbasen, Guanin (schwarz) und Thymin/Uracil (rot) auf (K). Dabei wird ein

STOP-Codon kodiert und bei der Translation kein vollständiges p53-Protein synthetisiert.

4.5.6 Änderung der Genexpression nach Bestrahlung

Um die Regulationsmechanismen nach Photonenbestrahlung auf mRNA-Ebene zu analysieren, wurden wichtige Gene zur Steuerung der DNA-Reparatur (vgl. 2.3.1), der Apoptoseinduktion (vgl. 2.3.2) und der Zellzyklusarretierung (vgl. 2.3.3) mittels quantitativer Real-Time RT-PCR untersucht.

4.5.6.1 Genetische Modulatoren des Zellzyklusarrests in LLC1-Zellen

Die Zellzyklusarretierung nach Bestrahlung wird hauptverantwortlich durch die Gene GADD45 und CDKN1A(P21) reguliert. Dabei hemmt GADD45 sowohl den G1/S- als auch den G2/M-Übergang von Zellen mit geschädigter DNA. Zusätzlich wird die Initialisierung und Aufrechterhaltung des G1/S-Arrests nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung durch das CDKN1A(P21)-Genprodukt (p21) gesteuert.

Das relative Genexpressionsniveau (rEN) von **CDKN1A(P21)** in LLC1-Zellen zeigte zwischen 2 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy Photonen keine signifikante Regulationstendenz. Dabei lagen die rEN zwischen minimal +0,2 nach 2 h und maximal + 0,8 nach 18 h. Auch nach Bestrahlung mit 6 Gy Photonen war keine signifikante Regulation festzustellen (vgl. *Abb. 26*). Zu allen Analysezeitpunkten zeigte sich für die CDKN1A(P21)-Expression lediglich eine Schwankung um das Grundniveau unbestrahlter Zellen.

Das **GADD45** Expressionsniveau war in mit Photonen bestrahlten LLC1-Zellen zwischen 2 h und 18 h post rad DOWN-reguliert. So zeigten sich 2 h (rEN -0,4), 8 h (rEN -0,4) und 18 h (rEN -0,5) nach Bestrahlung mit 2 Gy erniedrigte Expressionsniveaus. Auch nach Betsrahlung mit der Maximaldosis 6 Gy zeigte sich 2 h und 18 h postrad mit rENs von -0,3 (2 h) und -0,7 (18 h) eine DOWN-Regulation des GADD45 Expresionsniveaus (vgl. *Abb. 26*).

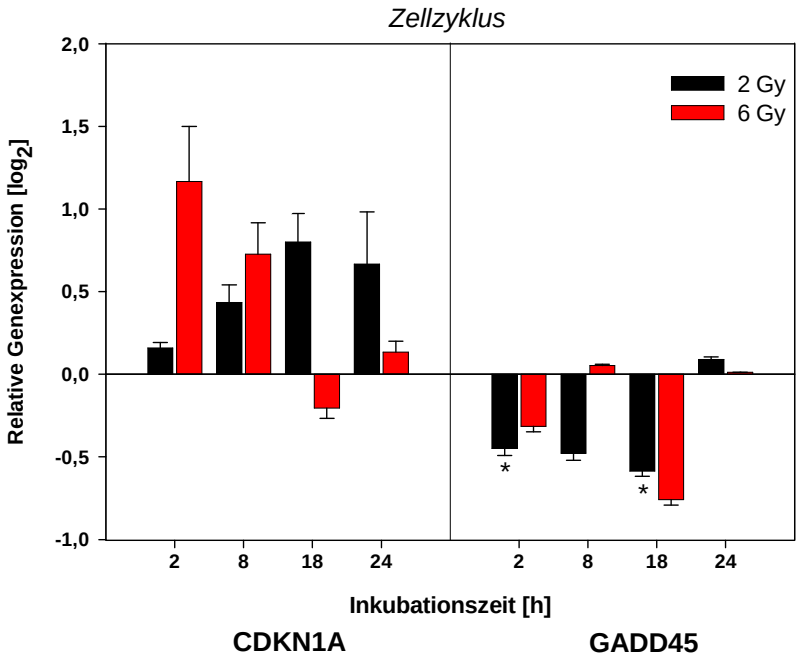


Abbildung 26: Zellzyklus-Regulation in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung

Relatives Expressionsniveau der Zellzyklus regulierenden Gene CDKN1A(P21) und GADD45 zu verschiedenen Analysezeitpunkten (2 h, 8 h, 18 h und 24 h) nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy Gesamtdosis. Die Abbildung zeigt die Expressionsniveaus relativ zur unbestrahlten Kontrollgruppe in logarithmischer Darstellung zur Basis 2 (log_2). Das bedeutet eine relative Genexpression (rEN) von 0 bezeichnet ein unverändertes, eine rEN von -0.5 ein halbiertes und eine rEN von +1 ein verdoppeltes Expressionsniveaus des Zielgens relativ zur unbestrahlten Kontrolle.

Das CDKN1A(P21)-Expressionsniveau in LLC1-Zellen zeigt nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Regulationstendenz, d.h. es zeigt sich gegenüber der Expression unbestrahlter Zellen lediglich eine Schwankung um das Grundniveau. Das GADD45-Expressionsniveau in LLC1-Zellen sank nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy und zeigte sich gegenüber den Referenzgenen zwischen 2 h und 18 h post rad tendenziell DOWN-reguliert.

4.5.6.2 Genetische Modulatoren der DNA-Reparatur in LLC1-Zellen

Die bestrahlungsabhängige Induktion DNA-Reparatur-relevanter Gene wurde anhand der Expression von RRM2b und ERCC1 untersucht. Das RRM2B-Genprodukt stellt - nach Exposition gegenüber zellulären Stressoren - die für DNA-Synthese und DNA–Reparatur unentbehrliche Desoxyribonukleoside zur Verfügung. Das ERCC1-Genprodukt ist an der Nukleotid-Exzissions-Reparatur beteiligt (vgl. 2.3.1).

RRM2b zeigte nach Photonenbestrahlung keine signifikante Regulationstendenz des Genexpressionsniveaus im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei zeigten sich sowohl nach Bestrahlung mit 2 Gy (rENs von maximal -0,1 2 h post rad und minimal -0,7 24 h post rad) als auch nach Bestrahlung mit 6 Gy Photonen (rENs von -0,4 2 h post rad, -0,6 18 h post rad und -0,7 24 h post rad) lediglich Schwankungen um das Grundniveau (vgl. *Abb. 27*).

Auch das zweite reparaturrelevante Gen **ERCC1** zeigte gegenüber den Referenzgenen keine signifikante Regulationstendenz. Nach Bestrahlung mit hohen Dosen von 6 Gy lagen für ERCC1 dabei die rENs zwischen - 0,5 (8 h und 24 h post rad) und + 0,7 (8 h und 24 h post rad). Nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen von 2 Gy zeigte sich ebenfalls keine signifikante Regulation des Expressionsniveaus. Dabei lagen die rENs zwischen – 0,2 (2 h post rad) und + 0,5 (24 h post rad) (vgl. *Abb. 27*).

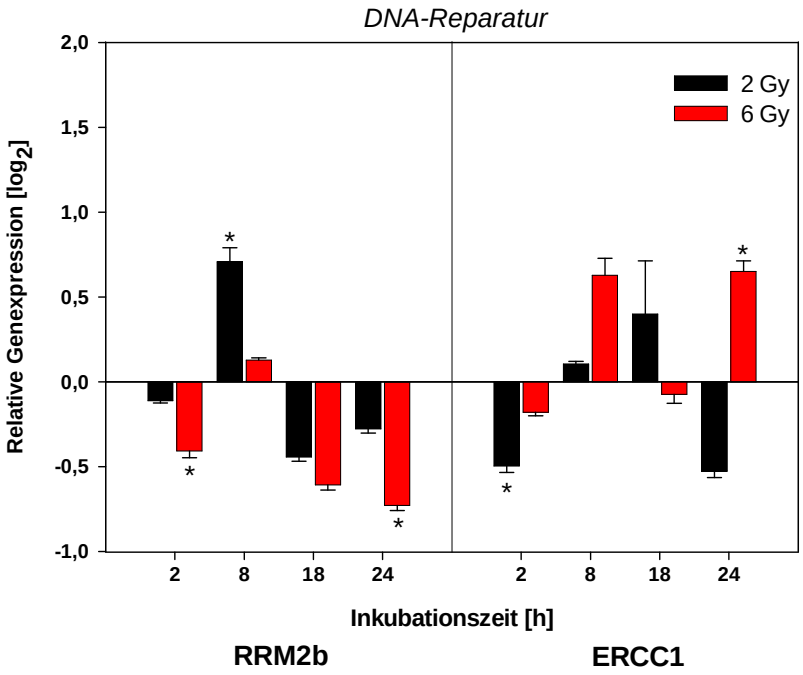


Abbildung 27: Expression DNA-Reparatur-assoziierter Gene in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung

Relatives Expressionsniveau der an der DNA-Reparatur beteiligten Gene RRM2b und ERCC1.. Die Abbildung zeigt die Expressionsniveaus relativ zur unbestrahlten Referenzgruppe in logarithmischer Darstellung zur Basis 2 (log_2). Eine relative Genexpression (rEN) von 0 bezeichnet ein unverändertes, eine rEN von -0,5 ein halbiertes und eine rEN von +1 ein verdoppeltes Expressionsniveau.

4.5.6.3 Genetische Modulatoren der Apoptoseinduktion in LLC1-Zellen

Die Apoptoseinduktion erfolgt über verschiedene Regulatoren der BCL-2 Genfamilie, hierbei sind insbesondere die transkriptionelle Regulation von B-Cell-Lymphoma-2-Protein (BCL-2) und BCL-X-Activating-Protein (BAX) ausschlaggebend. BAX ist ein proapoptotisches Protein, das die mitochondrial vermittelte Apoptose einleiten kann. Hingegen zeigt eine BCL-2 Überexpression eine apoptoseprotektive Wirkung. Zur p53-unabhängigen Apoptoseregulation wurde zusätzlich die Expression von antiapoptotischem BIRC5, einem Mitglied der IAP-Familie (Inhibitor of Apoptosis) untersucht.

Das relative Expressionsniveau von proapoptotischem **BAX** in LLC1-Zellen lag nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy zwischen minimal -0,1 2 h post rad und maximal +0,3 8 h post rad. BAX zeigte also im gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 2 h und 24 h post rad keine signifikante Regulationstendenz. Auch nach Photonenbestrahlung mit der Maximaldosis 6 Gy ließ sich in LLC1-Zellen zwischen 2 h und 24 h post rad keine signifikante Regulationstendenz feststellen, hier lagen die rEN zwischen minimal -0,2 18 h post rad und maximal +0,25 24 h post rad (vgl. *Abb. 28*).

Hingegen zeigte sich für das antiapoptotische **BCL2** sowohl in mit 2 Gy als auch mit 6 Gy Photonen bestrahlten LLC1-Zellen ein (signifikant) DOWN-reguliertes rEN. Dabei waren die gemessenen Expressionsunterschiede zwischen den mit 2 Gy bestrahlten und den mit 6 Gy bestrahlten LLC1-Zellen gering. So fand 2 h post rad und 24 h post rad, mit rENs von -0,7 eine DOWN-Regulation nach der Bestrahlung mit 2 Gy statt. Auch nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy zeigten sich zu den Analysezeitpunkten 2 h (rEN -0,7) und 24 h (rEN -0,5) post rad erniedrigte Expressionsniveaus (vgl. *Abb. 28*).

Das p53-unabhängige antiapoptotische **BIRC5** wird in LLC1-Zellen nach Induktion von DNA-Schäden durch Photonenbestrahlung DOWN-reguliert. Dabei wurden sowohl 2 h (rEN -0,6) als auch 8 h (rEN -0,8) nach Bestrahlung mit 2 Gy erniedrigte rEN festgestellt, wobei 8 h post rad das Expressionsniveau im Vergleich zu den Kontrollgenen nahezu halbiert war. Auch 2h und 24

h nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy war mit rENs von -0,5 und -0,3 eine DOWN-Regulation messbar. Wie beim BCL2 waren auch hier die Expressionsunterschiede zwischen mit 2 Gy und mit 6 Gy bestrahlten LLC1-Zellen gering (vgl. *Abb. 28*).

Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA-Proben auszugleichen, wurde die Expression der untersuchten Zielgene mit ubiquitär exprimierten Referenzgenen normalisiert. Dazu wurden die Houskeeping-Gene GUSB (β-Glucuronidase), ACTB (β-Actin) und B2M (β-2-Mikroglobulin) verwendet, die nach Bestrahlung ein relativ stabiles Expressionsniveau zeigen.

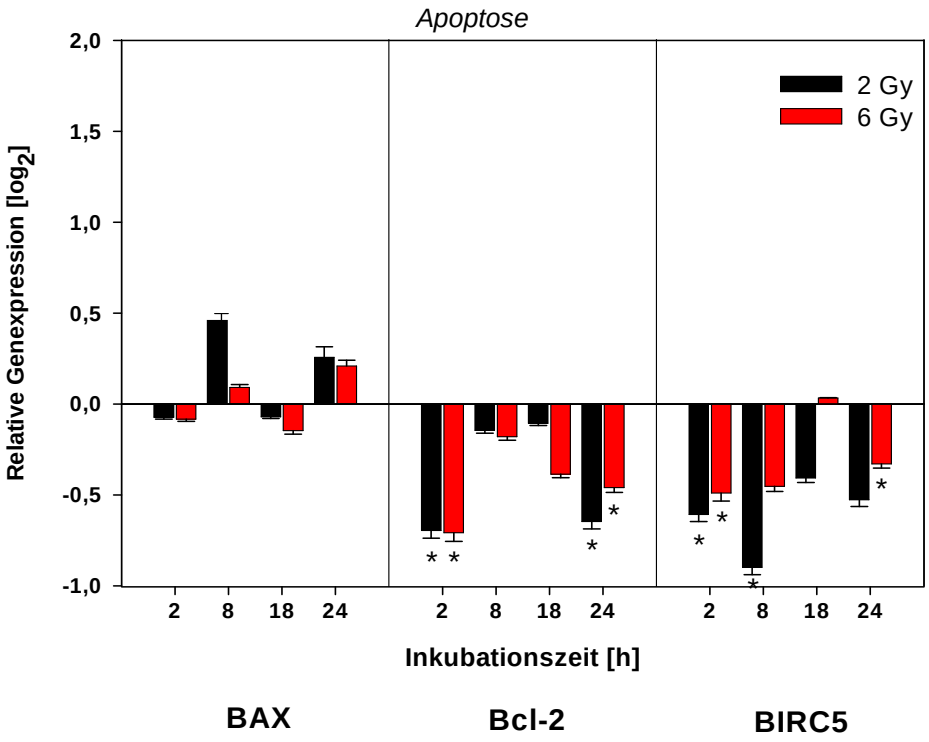


Abbildung 28: Apoptose-Regulation in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung

Relatives Expressionsniveau der Apoptose regulierenden Gene BAX, BCL2 und BIRC5 zu verschiedenen Analysezeitpunkten (2 h, 8 h, 18 h und 24 h) nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Abbildung zeigt die relativen Expressionsniveaus nach Normalisierung in logarithmischer Darstellung zur Basis 2 (log_2). Das bedeutet eine relative Genexpression (rEN) von 0 bezeichnet ein unverändertes, eine rEN von -0,5 ein halbiertes und eine rEN von +1 ein verdoppeltes Expressionsniveau im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Das proapoptische Gen BAX zeigt im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle keine signifikante Regulation. Die Expression der antiapoptotischen Gene BCL2 und BIRC5 sind im Untersuchungszeitraum zwischen 2 h und 24 h nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy **BCL2** *rt, d.h. BCL2 und BIRC5 zeigen relativ zur unbestrahlten Kontrolle niedrigere Genexpressionsniveaus.*

5. Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Kultivierungsbedingungen der LLC1-Zellen in Hinblick auf optimale Wachstumsbedingungen *in vitro* etabliert. Nach pathologischer und molekularpathologischer Analyse folgte im Hauptteil der Arbeit die strahlenbiologische Charakterisierung der LLC1-Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen strahlenbiologischen Erkenntnisse sind als essentielle Voraussetzung für weiterführende *in vivo*- und *in-vitro* Experimente mit dicht ionisierender Partikelstrahlung zu werten.

5.1 Grundlegende Charakterisierung der LLC1-Zellen

Die Charakterisierung der LLC1-Zellen umfasste die Detektion eines für die Kultivierung optimalen Wachstumsmilieus (vgl. 5.1.1), eine grundlegende mikroskopisch und immunhistochemisch basierte morphologische Charakterisierung (5.2) sowie eine genetische Betrachtung mittels Karyotypisierung (vgl. 5.1.3).

5.1.1 Kulturmilieu und Wachstumsbedingungen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass LLC1-Zellen hohe Anforderungen an Qualität und Kontinuität ihrer Kultivierung stellen und sehr sensibel auf Veränderungen ihres Wachstumsmilieus reagieren. Zur erfolgreichen, längerfristigen Kultivierung und insbesondere zur Vorbereitung der LLC1-Zellen auf strahlenexperimentelle Analyseverfahren und Reproduzierbarkeit deren Ergebnisse sind optimale Umgebungsbedingungen erforderlich. Dazu tragen die Zusammensetzung des Wachstumsmediums sowie die Wahl der Kulturgefäße und Beschichtung der Wachstumsflächen genauso bei wie die richtige Aussaatdichte bei der Weiterkultivierung oder der Versuchsvorbereitung unter Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit und Plattierungseffizienz. Die genauen Konditionen zu einzelnen beteiligten Faktoren sind ausführlich in Teil 4.2 dieser Arbeit beschrieben. Die Orientierung an diesen aufwendig ermittelten Rahmenbedingungen der Kultivierung von LLC1-Zellen bildet die Grundlage weiterführender strahlenbiologischer Analyseverfahren, reduziert deutlich den Einfluss einer kultivierungsbedingten

zellulären Beeinträchtigung als Störgröße für eigentliche strahlenbiologische Analyseverfahren und verbessert so entscheidend deren Aussagekraft und Reproduzierbarkeit.

5.2 Mikroskopische und immunhistochemische Charakterisierung

5.2.1 Morphologie der LLC1-Zellen

Im Verlauf der durchgeführten Experimente zur Ermittlung der optimalen Kulturverhältnisse für die LLC1-Zellen zeigte sich *in vitro* das Vorliegen zweier unterschiedlicher LLC1 Phänotypen. Zum einen existierten langgestreckte, schmale, spindelförmige Zellen, die nur in adhärentem Zustand, d.h. fest mit der Wachstumsoberfläche verbunden vorlagen. Zum anderen fanden sich frei im Wachstumsmedium flotierende Zellen, die sich in Form und Größe von der adhärenten Fraktion unterschieden (vgl. *Abb. 9*). Die LLC1-Zellen dieser frei flotierenden Fraktion waren abgerundet, kugelig und etwas kleiner als die adhärenten Zellen. Zwischen diesen phänotypisch unterschiedlichen LLC1-Zellen schien auch eine Transformation möglich zu sein, so dass bei reiner Aussaat von adhärenten Zellen nach einer Wachstumszeit von 20 h auch wieder frei flotierende Zellen im Medium vorlagen. Das gleiche Phänomen zeigte sich auch nach reiner Aussaat der flotierenden Zellen, bei der nach 20 h Wachstumszeit ebenfalls wieder adhärente Zellen vorlagen. Literaturangaben zum Vorliegen adhärenter und flotierender Zellen und deren Morphologie bestätigen diese Beobachtung (Henry et al., 1983, van Lamsweerde et al., 1983, Young et al., 1985).

Das Wissen um die, zwischen den beschriebenen Phänotypen deutlich variierende Ausprägung der Adhäsionsfähigkeit ist für die Durchführung von *in-vitro* Experimenten mit LLC1-Zellen von nicht unerheblicher Bedeutung, da durch den -mit zunehmender Besiedlungsdichte der Wachstumsfläche steigenden- Übergang der adhärenten zur flotierenden Fraktion niemals eine vollständig konfluente Besiedlung der Wachstumsfläche erzielt werden konnte. Unabhängig der Genese könnte dieses Ausbleiben eines konfluenten Besiedlungszustandes die beschriebene Problematik bei Ermittlung der Plattierungseffizienz und deren großen experimentellen Streubereich erklären

(vgl. 4.2.3).

Es scheint möglich, dass es sich bei beiden LLC1Phänotypen um denselben Genotyp handelt und somit, trotz unterschiedlichen morphologischen Erscheinungsbildes, nur eine Population vorliegt. Unter dieser Annahme wären die unterschiedlichen Zell-Morphologien zum einen auf rein sedimentative Prozesse nach Aussaat der frei flotierenden Zellen, zum anderen auf eine postmitotische Ablösung der adhärenten Zellen zurückzuführen. Diese Vorstellung wäre auch hinreichend für die Erklärung einer größeren frei flotierenden Fraktion bei höheren Konzentrationen (10 %) von FCS im Wachstumsmedium, da bei Bereitstellung von Wachstumsfaktoren (FCS) die Zellteilungsrate beschleunigt wird und mehr Mitosen stattfinden.

Die oben angesprochene phänotypische Variabilität könnte aber auch als Vorliegen zweier unterschiedlicher LLC1-Populationen/Subklone gewertet werden, die spontan oder als Folge erhöhten kultivierungsbedingten Selektionsdruckes, insbesondere nach lang andauernder Kultivierung entstanden sind. Diese Bildung von LLC1-Subklonen während langer Kultivierungsdauer (Young et al., 1985) oder nach gezielter Klonierung (Henry et al., 1983) wurde bereits früh nach der Etablierung des Lewis-Lung-Modells in der Literatur beschrieben.

5.2.2 Karyotypisierung der LLC1-Zellen

Im Karyogramm der LLC1-Zellen zeigten sich kleine, akrozentrische Chromosomen wobei das Größenverhältnis zwischen kleinstem und größtem Chromosom innerhalb derselben Metaphase durchschnittlich um 3:1 anzusiedeln war. Das kleinste in allen Metaphasen gemessene Chromosom war 0,7 µm lang, das größte gemessene hatte eine Länge von 10 µm. In allen Metaphasen wurden mit durchschnittlich 85 Chromosomen/Metaphase viele Chromosomen gezählt, wobei die ermittelten Chromosomenzahlen einer großen Varianz zwischen den einzelnen Metaphasen unterlagen. Wird von einem in der oben genannten Literatur beschriebenen diploiden Chromosomensatz mit 20 Chromosomenpaaren bei Mäusen ausgegangen (Sachs, 1954, OHNO et al., 1957, OHNO et al., 1959a, OHNO et al., 1959b, FORD and WOOLLAM, 1963, Weiner et al., 1964), lagen hier in allen Fällen polyploide Chromosomensätze

vor, wobei rein tetraploide Chromosomensätze in 28% der untersuchten Metaphasen vorlagen und den größten einheitlichen Anteil bildeten. Durch die Vielzahl der Chromosomen und die minimalen Größenunterschiede zwischen ihnen ist eine Unterscheidung und Sortierung anhand der Chromosomengröße nicht suffizient. Die großen Chromosomen lassen bedingt eine morphologische Charakterisierung durch deren Bänderung zu, bei mittelgroßen und kleinen Chromosomen ist eine morphologische Differenzierung lichtmikroskopisch nicht möglich (vgl. *Abb. 12*)

Die für die LLC1-Karyogramme ermittelten Werte der Chromosomengröße (FORD and WOOLLAM, 1963), die chromosomalen Größenverhältnisse (FORD and WOOLLAM, 1963, Weiner et al., 1964) und die Chromosomenmorphologie (OHNO et al., 1957, Weiner et al., 1964) sind mit den, aus der Literatur ermittelten Beschreibungen für nicht neoplastisch veränderte C57B-Maus-Zellen aus Milz, Thymus und Knochenmark vergleichbar.

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik lässt sich zusammenfassend feststellen, dass mittels lichtmikroskopischer Analyse lediglich eine quantitative Analyse der chromosomalen Struktur der LLC1-Zellen möglich ist. Die qualitative Analyse insbesondere im Hinblick auf strukturelle Chromosomenaberrationen im Vergleich zu nicht neoplastisch veränderten C57B-Maus-Zellen macht jedoch moderne zytogenetische Analyseverfahren erforderlich. Hierfür bietet sich u.a. die Multiplex-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (mFISH) an. Durch die m-FISH können zytogenetisch relevante Genabschnitte und genetische Aberrationen präzise mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden identifiziert und verglichen werden. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens an LLC1-Zellen wurde mit Vorversuchen zur Sondenauswahl bereits gezeigt (vgl. *Abb. 29*). Schon diese Vorversuche bestätigten die bereits durch herkömmliche Karyotypisierungsverfahren gewonnenen Ergebnisse. So lagen auch bei der m-FISH Analyse viele Chromosomen/Metaphase vor die sich hinsichtlich ihrer Form und Größe sehr ähnlich waren. In den m-FISH Versuchen für die LLC1-Zellen ließen sich 80 Chromosomen/Metaphase nachweisen (vgl. *Abb. 29*). Dieser Wert entspräche einem tetraploiden Chromosomensatz in den LLC1-Zellen, bei Annahme eines

diploiden Chromosomensatzes mit 40 Chromosomen in physiologischen C57B-Maus-Zellen.

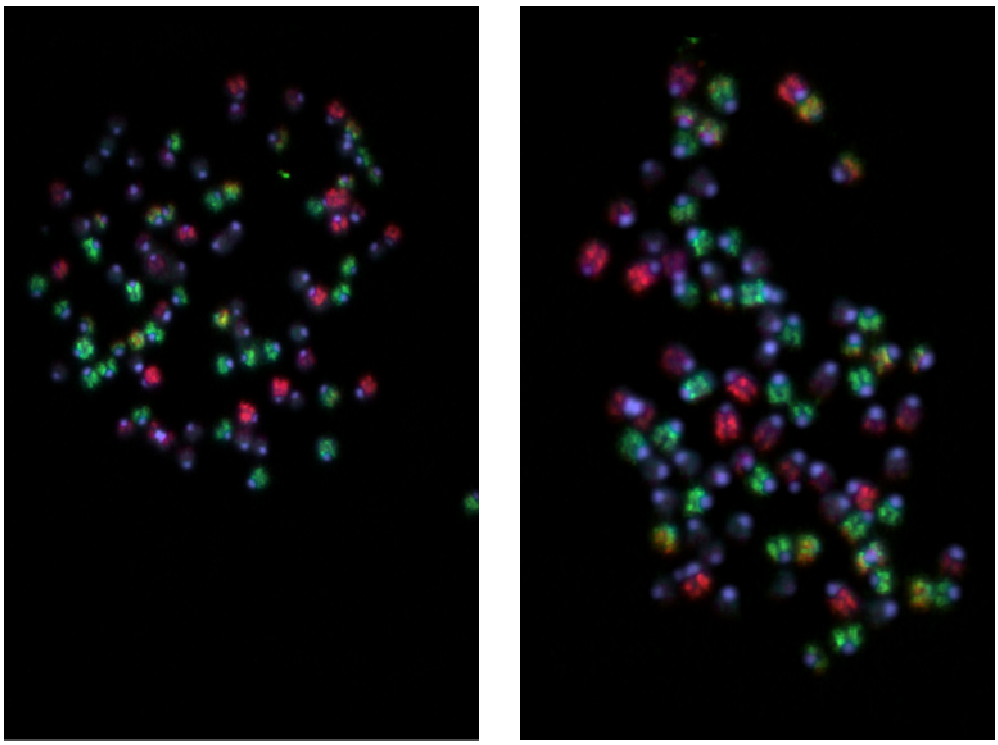


Abbildung 29: Vorversuch zur m-FISH Analyse der LLC1-Zellen

Ziel der m-FISH ist eine allelspezifische Markierung mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden, die sowohl eine bessere Unterscheidung der einzelnen Chromosomen innerhalb einer Metaphase ermöglichen, als auch eine gezielte Analyse ausgewählter Genabschnitte und genetischer Aberrationen zulässt. links/rechts: jeweils 40 Chromosomenpaare im Sinne eines tetraploiden Chromosomensatzes.

5.3 Strahlenbiologische Analyse

Die strahlenbiologische Charakterisierung der LLC1-Zellen umfasste die Erstellung von Dosis-Effekt-Kurven zur Einschätzung zellulärer Strahlensensitivität und Reparaturkapazitäten (vgl. 5.3.1), die Analyse von Reparaturmechanismen nach Induktion von DNA-DSB durch ionisierende Strahlung (vgl. 5.3.2), die Untersuchung der Apoptoseindukton und Zellzyklusarretierung nach Bestrahlung (vgl. 5.3.3), die RT-PCR gestützte Analyse der bestrahlungsabhängigen Induzierbarkeit und des Expressionsniveaus strahlenbiologisch relevanter Gene (vgl. 5.3.6) sowie die Prüfung des p21-Status (vgl.

5.3.4), des p53-Status (vgl. 5.3.5) und eine Mutationsanalyse der p53 Gensequenz (vgl. 5.3.7) in LLC1-Zellen.

5.3.1 Beurteilung der Dosis-Effekt-Kurve

Die für die LLC1-Zellen erstellte Dosis-Effekt-Kurve lässt Aussagen über die Strahlensensibilität und Reparaturkapazität der Zellen nach Bestrahlung mit Photonen zu und macht diese strahlenbiologisch mit anderen Zellen vergleichbar. Die LLC1-Zellen wurden mit unterschiedlich hohen Photonendosen zwischen 0,5 Gy und 10 Gy bestrahlt (vgl. *Abb. 13*).
Die durch das Single-Hit-Multi-Target-Modell generierten Werte D_0, D_q und n bilden die Eckpfeiler der strahlenbiologischen Charakterisierung. D_0 wird aus der Steigung des linearen Anteils der DEK gewonnen und bezeichnet die 37 %-Inaktivierungsdosis als Ausdruck der Strahlensensitivität einer Zelle. Die D_0 liegt für Säuger-Zellen zwischen 0,75 Gy und 3 Gy (Sauer, 2010). Dabei bedeuten niedrige D_0-Werte eine hohe Strahlensensitivität und hohe D_0-Werte eine geringe Strahlensensitivität. Der für die LLC1-Zellen ermittelte D_0-Wert von 1,678 Gy charakterisiert diese Zell-Linie als strahlensensitiv.
Als Hauptmaß der Reparaturkapazität einer Zelle dient der D_q-Wert, der aus der Extrapolationsgeraden des linearen Kurvenanteils und dem 100 %-Überleben gewonnen wird. Je größer der D_q-Wert, desto ausgeprägter ist die Reparaturkapazität einer Zelle nach Induktion von DNA-Schäden. In Säugerzellen variieren D_q-Werte zwischen 0,1 Gy und 5 Gy. Der D_q-Wert der LLC1-Zellen beträgt 1,491 Gy und legt eine mäßig bis schlecht ausgeprägte Reparaturkapazität dieser Zell-Linie nahe.
Als weiteres Maß der Reparaturfähigkeit kann die Extrapolationszahl n herangezogen werden, auch diese Zahl unterliegt in Säuger-Zellen großen zellspezifischen Schwankungen (Sauer, 2010) und liegt zwischen 2 und 10. Je kleiner die Extrapolationszahl, desto geringer ist die Ausprägung zellulärer Reparaturmechanismen, da als heuristisches Prinzip und zur konstitutiven Vorstellung mehrere empfindliche Targets innerhalb der Zelle angenommen werden können. Die für die LLC1-Zellen ermittelte Extrapolationszahl 2,432 unterstreicht die Annahme mäßig bis schwach ausgeprägter zellulärer Reparaturmechanismen dieser Zell-Linie.

Die anhand des linear-quadratischen-Modells errechneten Werte α und β sowie deren Quotient, lassen ebenfalls Aussagen über die Reparaturkapazität der untersuchten Zellen zu. Wird der lineare α-Term der DEK als irreparabler DNA-Schaden und der quadratische β-Term als reparabler DNA-Schaden einer untersuchten Zelllinie gedeutet, so legen hohe α/ β-Werte eine schlecht ausgeprägte und niedrige α/ β-Werte eine gut ausgeprägte Reparaturkapazität nahe. In Säugerzellen variieren die α/ β-Werte innerhalb eines sehr breiten Bereichs zwischen 0,5 Gy bei renalen Zellen und 25 Gy bei malignen plattenepithelialen Zellen (Sauer, 2010). In der klinischen Anwendung der Radiatio werden Gewebe mit α/ β-Werten zwischen 5 Gy und 20 Gy als früh reagierend und Gewebe mit α/ β-Werten zwischen 0,1 Gy und 5 Gy als spät reagierend klassifiziert (Kauffman et al., 2009, Sauer, 2010). Der Übergang zwischen beiden Gewebetypen ist fließend. Da der α/ β-Wert der LLC1-Zellen bei 4,82 Gy liegt, wären die LLC1-Zellen daher rein formal eher zu den spät reagierenden Zellsystemen zu rechnen, gleichwohl ihr α/ β-Wert nahe am Maximum spät reagierender Gewebe liegt. Wird jedoch der graphische Kurvenverlauf der LLC1-DEK mit typischen Merkmalen früh reagierender Zellsysteme wie geringe Krümmung und schmale Erholungsschulter in die Betrachtung mit einbezogen, scheint die formale Einstufung anhand des α/ β-Wertes als spät reagierende Zell-Linie fraglich. Nicht nur der Kurvenverlauf, sondern auch die aus dem Single-Hit-Multi-Target-Modell ermittelten Werte sind als Gegenargument zu einem rein spätreagierenden Zellsystem anzusehen. Zusammenfassend sind die LLC1-Zellen als strahlensensible Zellen mit mäßig bis schlecht ausgeprägter Reparaturkapazität einzustufen, die strahlenbiologisch eher einem frühreagierenden Zellsystem entsprechen.

5.3.2 DNA-DSB bezogene Reparaturmechanismen (γH2AX)

Die Bildung von γ-H2AX Foci ist auf eine Phosphorylierung des Histons H2AX und dessen anschließende Anlagerung an Doppelstrangbrüche (DSB) zurückzuführen, dabei setzt die Bildung eines γH2AX-Focus mindestens einen DNA-Doppelstrangbruch voraus (Rogakou et al., 1999, Rothkamm and Löbrich, 2003). Dem phosporylierten Histon H2AX kommt bei der Organisation anderer Reparaturproteine am DSB eine entscheidende Rolle zu und gewährleistet so einen effektiven Ablauf von Reparaturprozessen (vgl. 2.4). Die Bildung von γH2AX gehört als Hauptbestandteil der schnellen DNA-Schadensantwort zu den zellulären Sofortmechanismen, die bereits 3 min nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung einsetzen (Rogakou et al., 1998, Rogakou et al., 2000, Foster and Downs, 2005).

In den an LLC1-Zellen durchgeführten Bestrahlungsexperimenten mit 1 Gy Photonen ließ sich eine Induktion der schnellen DSB-Reparatur nachweisen (vgl. *Abb. 18, 19*). Bereits 10 min nach Bestrahlung konnten durchschnittlich 20 Foci/Zellkern nachgewiesen werden. 30 min post rad war mit der Detektion von durchschnittlich 26 Foci/Zellkern das Maximum der schnellen DNA-Reparatur erreicht. Bereits 2 h post rad war die Anzahl der γH2AX-Signale mit durchschnittlich 14 Foci/Kern bereits deutlich rückläufig, bis 6 h und 24 h post rad war im Vergleich zur Kontrolle kein erhöhter Wert mehr festzustellen. Diese in LLC1-Zellen ermittelten Foci-Anzahl und der Zeitpunkt der maximalen Schadensantwort nach Bestrahlung mit 1 Gy Photonen werden durch in der Literatur für andere Säugerzellen (VA13, HeLa, IMR90, CHO, SF268, Fibroblasten) beschriebene Werte eines Induktionsmaximums zwischen 10 min und 30 min post rad (Schweinfurth, 2007, Rogakou et al., 1998, MacPhail et al., 2003) und einem zellspezifisch variablen Vorliegen von 20-40 Foci/Zellkern nach Bestrahlung mit 1 Gy Photonen (Rogakou et al., 1999, Schweinfurth, 2007) bestätigt. Die Überschreitung einer Dosis-Schwelle von 20 mGy Photonenstrahlung (Rothkamm and Löbrich, 2003) als Voraussetzung der Induktion schneller Reparaturmechanismen - und somit der An-

wendbarkeit der γH2AX-Methode zum Nachweis strahleninduzierter DSBs- war hier durch die Applikation von 1 Gy gegeben. Essentiell für die Einschätzung des Umfanges der schnellen Strahlenantwort der LLC1-Zellen war die Ermittlung der γH2AX-Focus Zahl in der unbestrahlten Kontrolle. Die hier ermittelte Anzahl an γH2AX-Signalen betrug zu allen Analysezeitpunkten 9 Foci/Kern. Dieser Wert erscheint im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Focus Zahlen für Säugerzellen (V79, A549) zwar relativ hoch (MacPhail et al., 2003, Arenz, 2007), ist jedoch gut mit der ebenfalls in der Literatur beschriebenen hohen Anzahl von γH2AX-Foci in maligne transformierten Zervix- (Hela, Caski, MS751, SW756, SiHa) und Melanom-Zellen (LOX, YUGEN, YUSAC) (Banáth et al., 2004, Warters et al., 2005) vereinbar. Generell kann also eine unterschiedlich hohe Anzahl detektierbarer γH2AX-Signale/Zellkern in verschiedenen unbestrahlten Zell-Linien angenommen werden.

Der in 4.2.5 ausführlich beschriebene, stetige Übergang zwischen adhärenten und frei flotierenden Zellen führt dazu, dass die LLC1-Zellen nur einen annähernd konfluenten Zustand auf den Objektträgern erreichen. Dabei finden in diesem „maximal subkonfluenten“ Zustand weiterhin Mitosen statt, wobei aber nur die frei flotierende Population zuzunehmen schein. Diese, auch im späten Besiedlungsstadium stattfindenden Mitosen mit dabei physiologischerweise vorliegenden DSB könnten eine Erklärung für die hohe Anzahl von γH2AX-Signalen in der unbestrahlten Kontrolle sein. Auch das asynchrone Wachstum der LLC1-Zellen vor Fixierung, mit Vorliegen des doppelten DNA-Gehaltes führt zu einer hohen Zahl physiolgischer DSBs und somit zu einer erhöhten γH2AX-Focus-Zahl.

Darüber hinaus können Effekte allgegenwärtiger extrinsischer Stressoren (Sokolov et al., 2007) der Kultivierung und des Transports zur Bestrahlungseinrichtung das Vorliegen hoher γH2AX-Focus Zahlen in unbestrahlten LLC1 Kontrollen erklären.

Die mikroskopisch visuelle Auswertung bringt dabei mehrere Probleme mit sich. So können zwar solitär gelegene DSB mit ausreichendem Abstand zueinander gut voneinander differenziert werden, da aber die phosphorylierte Form des Histons bis zu einer Entfernung von 2 Mega-Basen-Paaren (Mbp)

von der eigentlichen Stelle des DNA-DSB vorliegt (Fricke, 2008), können verschiedene γH2AX-Foci bei Unterschreitung dieses Mindestabstandes nicht mehr voneinander unterschieden werden. Durch die zweidimensionale fluoreszenzmikroskopische Auswertung konnten auch in unterschiedlichen Kernschichten übereinanderliegende γH2AX-Foci kaum voneinander unterschieden werden, was vor allem bei Auswertung der mit hohen Dosen bestrahlten Proben mit hoher Foci-Zahl/Zellkern ein Problem darstellte. Diese beiden Hauptprobleme bei visueller, personenabhängiger Ermittlung der γH2AX-Focus-Zahl führten bereits zu diversen Versuchen zur Anwendung einer softwaregestützten, quantitativen und qualitativen Auswertungsroutine der γH2AX-Signale in bestrahlten Zellen (Han et al., 2006, Wykes et al., 2006, Costes et al., 2006).
Trotz der beschriebenen Probleme bei der Auszählung der γH2AX-Signale, stellt diese Methode ein zuverlässiges Instrument zur Induktions-Analyse der schnellen DSB-Reparatur und deren zeitlicher Kinetik in bestrahlten Zellen dar.

5.3.3 Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest

Nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung werden Zellen bei ausreichend schweren radiogenen Schäden nekrotisch oder reagieren bei subletalen Strahlenschäden mit einer Vielzahl zellulärer Regulationsprozesse (vgl. 2.3), zu denen auch die Apoptoseinduktion und die Hemmung der Zellzyklusprogression an verschiedenen Stellen des Phasenüberganges gehören. Im Experiment ist dabei innerhalb der ersten 24 h post rad mit Nekrose oder Zellzyklusarrest und zu späteren Zeitpunkten post rad mit Apoptoseinduktion zu rechnen (Stephens et al., 1991, Meyn et al., 1993, Tauchi and Sawada, 1994, Abend and van Beuningen, 1998).
In LLC1-Zellen scheinen zellzyklusrelevante, p53 unabhängige Regulationsabläufe der G2-Arretierung (vgl. 5.3.6.1) intakt zu sein, da insbesondere zwischen 6 h und 12 h nach Bestrahlung eine Erhöhung der in der G2-Phase arretierten LLC1-Zellen festzustellen war (vgl. *Abb. 14a & 15*). Diese Arrestmaxima zu frühen Analysezeitpunkten ließen sich sowohl nach Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 6 Gy nachweisen und sind gut mit in der für einige Säuger-

zellen (HSC93, CV-1, BCL) in der Literatur postulierten Annahmen einer, vom Umfang des DNA-Schadens unabhängigen Einleitung der G2-Arretierung (Dornreiter, 2006) vereinbar.

Ausmaß und Dynamik dieser strahleninduzierten Zellzyklusarretierung sind jedoch, abhängig vom Umfang dosisspezifischer radiogener Schadensereignisse, variabel. So zeigten sich auch in den analysierten LLC1-Zellen deutliche Unterschiede im Verlauf der Schadensreaktion nach Photonenbestrahlung unterschiedlicher Dosen. Eine Photonenbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 2 Gy induzierte eine temporäre Zellzyklusarretierung mit Erhöhung der G2-Fraktion insbesondere 6 h und 12 h nach Bestrahlung. Ab 18 h post rad fand eine Annäherung der G2-Fraktion zwischen unbestrahlter und bestrahlter Gruppe statt, dabei ist von einem sukzessiv einsetzenden Ausgang der Zellen aus dem G2-Phasenarrest auszugehen. 48 h nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy zeigte sich ein im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu unverändertes Zellzyklusprofil.

Nach Exposition gegenüber einer höheren Gesamtdosis von 6 Gy Photonen war jedoch auch zum spätesten Analysezeitpunkt 48 h nach Bestrahlung noch eine Verschiebung innerhalb des Zellzyklusprofils mit erhöhter G2-Fraktion feststellbar. Hier war also noch kein Ende des G2-Zyklusarrests, wie nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen, zu beobachten.

Dieses Persistieren des G2-Arrests in Zellen, die hohen Dosen ionisierender Strahlung exponiert waren, ist durchaus nicht ungewöhnlich wobei schwer geschädigte Zellen zeitlich unbegrenzt im G2-Arrest verbleiben können (Gudkov and Komarova, 2003). Dieser G2-Arrest hat in Abhängigkeit von der betroffenen Zellart unterschiedliche Auswirkungen. So kann zum einen die Induktion der Apoptose aus dem Arrest heraus unterbunden oder erschwert sein, zum anderen ist es Zellen aber auch möglich aus diesem Arrest heraus das apoptotische Programm zu aktivieren (Bache et al., 1999, Dornreiter, 2006, Arenz, 2007). Insbesondere die unterbundene Apoptoseinduktion im Rahmen einer zeitlich unbegrenzten G2-Arretierung ist als klinisch relevante Reaktion verschiedener maligner Neoplasien auf chemotherapeutische Behandlung zu werten (Roninson, 2003).

Ob nun auch in den LLC1-Zellen eine G2-Arrest gekoppelte Apoptoseinhibiti-

on oder erschwerte Apoptoseinduktion vorliegt, kann anhand der FACS-analytisch generierten Zellzyklusprofile und Verteilungsverhältnisse zwischen vitalen und apoptotischen Zellen (vgl. 4.5.2.1 & 4.5.2.2) nicht abschließend beurteilt werden. Dafür spräche aber sowohl das Vorliegen einer großen apoptotischen Fraktion 24 h (zu diesem Zeitpunkt war der G2-Arrest bereits beendet) nach Bestrahlung mit 2 Gy, als auch die geringen Unterschiede in der Verteilung zwischen vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlich hohen Dosen (6 Gy und 10 Gy). Unter der Annahme einer erschwerten Apoptoseinduktion während einer G2-Arretierung (LLC1-Zellen befanden sich 48 h post rad noch im G2-Arrest) wäre die gleichbleibende Fraktion apoptotischer Zellen auch nach Bestrahlung mit hohen Dosen von 6 Gy und 10 Gy zu erklären.

Der prozentuale Anteil der in der G1-Phase befindlichen LLC1-Zellen zwischen 6 h und 48 h nach Photonenbestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, ließ keine G1-Phasenarretierung nach Bestrahlung erkennen. Dieses Ausbleiben einer G1-Arretierung auch nach Bestrahlung mit einer Maximaldosis von 6 Gy, legt eine Störung regulatorischer Mechanismen der G1-S-Progression nahe. Die Hemmung dieser Progression und somit die Einleitung einer G1-Phasenarretierung erfolgt, p53 abhängig, überwiegend durch das zellzyklusregulatorisch aktive Gen p21 und dessen Genprodukt. Bei Ausbleiben einer G1-Arretierung nach Photonenbestrahlung stellt sich daher primär die Frage nach Vorliegen und Funktionalität des p21 in LLC1-Zellen bzw. der p53 Funktionsfähigkeit (vgl. *Abb. 30*).

5.3.4 p21 Status

Via Inhibition der Kinaseaktivität aller Cyklin/CDK-Komplexe kann p21 den Zellzyklus und die Proliferation verlangsamen oder inhibieren. Wird p21 in einer Zelle überexprimiert, kommt es zu einem G1- und S-Phase Arrest (vgl. 2.3.3). Von besonderem Interesse war die Frage ob in LLC1-Zellen eine fehlende p21-Expression oder eine p21-Funktionseinschränkung ursächlich für diese fehlende Progressionshemmung am G1-S-Übergang ist.

LLC1-Zellen zeigten sowohl in unbestrahlten als auch mit 6 Gy Photonen bestrahlten Populationen keine p21-Expression (vgl. *Abb. 20* & *21*). Daher sind

die LLC1-Zellen als p21 defiziente Zellen einzustufen. Diese fehlende p21 Expression erklärt das Ausbleiben einer G1-Arretierung auch nach Bestrahlung mit hohen Dosen Photonen (vgl. *Abb. 30*), wirft aber gleichzeitig die Frage nach der Ursache dieser fehlenden Expression auf. Da die p21-Expression primär p53 abhängig ist (Pouget and Mather, 2001) bestand vorrangiger Klärungsbedarf bezüglich fehlender p53-Expression oder einer p53-Funktionseinschränkung.

5.3.5 p53 Status

Das Tumorsuppressorgen p53 spielt mittels seines transkriptionell aktiven Genprodukts eine zentrale Rolle für die zelluläre Reaktion auf strahleninduzierte DNA-Schäden. Das p53-Protein wirkt dabei als Transkriptionsfaktor für Gene, die mit ihren Produkten den Zellzykluarrest (p21), DNA-Reparaturmechanismen und die Apoptoseinduktion direkt beeinflussen (vgl. 2.3). Obwohl p53 als einer der Hauptregulatoren der zellulären Strahlenantwort angesehen wird, führt ein p53 Verlust nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer Strahlenresistenz (Dahm-Daphi, 2000).

In LLC1-Zellen war sowohl in unbestrahltem als auch in bestrahltem Zustand ein Phosphorylierung von p53 an Serin 15 mittels Westernblot nachzuweisen, deren Signalstärke in unbestrahlten Zellen deutlich über dem anderer, parallel analysierter neoplastischer Zellen lag. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in p53 zu einer konstitutiven Phosphorylierung an Serin 15 führt (Melnikova 2003). Die schon in unbestrahlten Zellen nachgewiesene Phosphorylierung an Serin 15 wurde nach Bestrahlung mit 6 Gy deutlich gesteigert, was eine reaktiv stattfindende Strahlenantwort der LLC1-Zellen verdeutlicht. Nach Induktion von DNA-Schäden kommt es zur Aktivierung der Kinasen ATM, ATR und DNA-abhängiger Proteinkinase. Diese Kinasen aktivieren p53 durch Phosphorylierung im N-terminalen Bereich, wobei Serin 15, Serin 20 und Threonin 18 hier von besonderem Interesse sind. Durch die Phosphorylierung an Serin 15 kommt es zur verminderten Interaktion von p53 mit Mdm2, was letztlich zur Akkumulation von p53 führt.

In LLC1-Zellen war sowohl in unbestrahltem als auch in bestrahltem Zustand die an Serin 15 phosphorylierte Form von p53 mittels Westernblot nachzu-

weisen, die deutlich über dem anderer, parallel analysierter neoplastischer Zellen lag. Darüber hinaus zeigte sich nach Bestrahlung mit Photonen eine deutliche Zunahme des an Serin 15 phosphorylierten p53; dies verdeutlicht eine reaktiv stattfindende Strahlenantwort der LLC1-Zellen. Anhand dieser rein quantitatven Expressionsanalyse kann jedoch nur eine eingeschränkte Aussage über den funktionellen Status des p53 in LLC1-Zellen, insbesondere in Hinblick auf eventuell vorliegende Funktionseinschränkungen oder Mutationen getroffen werden. Auch lassen Ergebnisse PCR und FACS basierter Analysen p53-abhängiger Regulationsmechanismen wie Genexpression, Apoptoseinduktion und Zellzyklusarretierung nur indirekte Aussagen über den funktionalen Zustand des p53-Gens in LLC1-Zellen zu.

5.3.6 Gen-Expressionsniveau nach Photonenbestrahlung

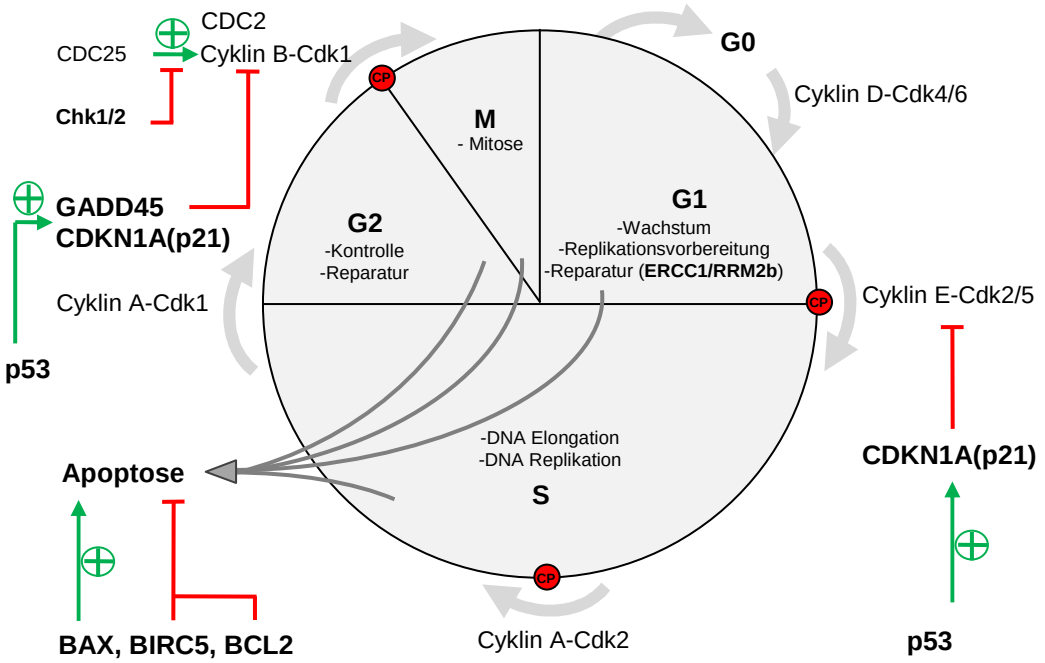


Abbildung 30: Zellzyklus, Apoptose und genetische Modulatoren

Der Zellzyklus dient als Modellvorstellung und untergliedert zelluläre Wachstumsprozesse in vier Hauptabschnitte. In der G1-Phase finden die Vorbereitungen für die Replikation der DNA, sowie ERCC1/RRM2b gesteuerte Reparaturmechanismen statt; in der S-Phase wird das Genom dupliziert, in der G2-Phase wird die Integrität des Genoms kontrolliert und evtl. entstandene DNA-Schäden einer Reparatur zugeführt, bevor in der M-Phase das Genom gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Die Progression zwischen den Zellzyklusphasen wird durch cyklinabhängige Kinasen (Cdk) reguliert, dabei werden auch mehrere Checkpoints (CP) durchlaufen. An diesen CPs kann bei beeinträchtigter genomischer Integrität eine Zyklusarretierung eingeleitet werden, die von unterschiedlichen regulatorischen Genen (GADD45, CDKN1A(P21), Checkpoint-Kinasen Chk1/, Protein-Phosphatasen (CDC25) oder p53 beeinflusst wird. Aus allen Zellzyklusphasen heraus kann zu jeder Zeit die Induktion der Apoptose, oder nach der M-Phase der Übertritt in die G0-Phase (Ruhephase) erfolgen. Die

Apoptoseinduktion unterliegt dabei proapoptotischen (BAX) oder antiapoptotischen (BCL2, BIRC5), genetischen Steuermechanismen.

5.3.6.1 Genregulatoren der Zellzyklusprogression

Der G1-Arrest wird ausschließlich von p53 moduliert, d.h. Zellen mit defektem, mutiertem oder fehlendem p53 sind nicht in der Lage einen G1-Arrest einzuleiten (Kastan et al., 1992, Kuerbitz et al., 1992). Die p53 abhängige Einleitung des G1-Arrests erfolgt hauptsächlich über Transkription des CDKN1A(P21), das für einen potenten cyklinabhängigen Kinaseinhibitor (Inhibition von Cyklin E-CDK2/ Cyklin E-CDK5) kodiert (Harper et al., 1993). P21 ist über Bindung und Inhibition des Cyclin B/cdc2 Komplexes auch an der Modulation des G2-Arrests beteiligt (vgl. *Abb.30*).

Obwohl die Einleitung einer G2-Arretierung vorrangig ATM/ATR gesteuert erfolgt (Barton, 2010), nimmt p53 über transkriptionelle Aktivierung von p21 (Pouget and Mather, 2001) und GADD45 (Hermeking et al., 1997) sowie cdc2, Cyklin B Transkriptionshemmung (Winters et al., 1998, Innocente et al., 1999, Harper et al., 1993) indirekt Einfluss auf die Dauer einer G2-Arretierung (Michalovitz et al., 1990, Agarwal et al., 1995, Stewart et al., 1995, Gao et al., 2005). Aufgrund der ATM/ATR Modulation ist aber auch die Einleitung einer G2-Arretierung in Zellen mit defektem, mutiertem oder fehlenden p53 möglich (Barton, 2010).

Das relative Genexpressionsniveau von **CDKN1A(P21)** in LLC1-Zellen zeigte zwischen 2 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy Photonen und 6 Gy Photonen keine signifikante Regulationstendenz (vgl. *Abb. 26*). Zu allen Analysezeitpunkten zeigten sich für das CDKN1A(P21)-Expressionsniveau lediglich Schwankungen um das Grundniveau. *(*vgl. *Abb. 26)*. Diese fehlende Induzierbarkeit erklärt das Fehlen einer G1-Arretierung in LLC1-Zellen nach Photonenbestrahlung. Da die CDKN1A(P21) Transkription ausschließlich p53-abhängig erfolgt (Levine, 1997) werfen diese Ergebnisse bei positivem p53 Proteinstatus (vgl. 4.5.4.2) und negativem p21 Proteinstatus (vgl. 4.5.4.1) gleichzeitig die Frage nach der Funktionalität und dem Mutationsstatus des p53 in LLC1-Zellen auf.

Die Transkription des zweiten untersuchten Zellzyklus-regulierenden Gens

GADD45 erfolgt sowohl p53 abhängig (Levine, 1997), als auch p53 unabhängig (Gao, 2005), d.h. auch bei fehlendem p53 ist in LLC1-Zellen eine Induzierbarkeit des Gens durch Photonenbestrahlung möglich. Das GADD45 Genprodukt verhindert die Komplexbildung zwischen cdc2 und CyklinB (Jin et al., 2000) trägt so zur Aufrechterhaltung einer G2-Arretierung mit Wachstumsarrest bei. Das GADD45 Expressionsniveau war in mit 2 Gy und 6 Gy Photonen bestrahlten LLC1-Zellen zwischen 2 h und 18 h post rad (signifikant) DOWN-reguliert (vgl. *Abb. 26*). Eine induktive Rolle des GADD45 für regulatorische Prozesse des G2/M-Arrests scheint daher für LLC1-Zellen unwahrscheinlich. Bemerkenswert ist aber eine signifikante DOWN-Regulation 18 h nach Bestrahlung mit 2 Gy, die mit einem zum gleichen Zeitpunkt in der FACS-Analyse feststellbaren Ende des G2/M-Arrests in Verbindung zu stehen scheint. Eine indirekte Steuerung des G2/M-Arrests über dessen Beendigung kann also für die mit 2 Gy bestrahlten LLC1-Zellen nicht ausgeschlossen werden.

5.3.6.2 Genregulatoren der Apoptose

Die Apoptoseinduktion erfolgt über verschiedene Apoptoseregulatoren der BCL-2 Genfamilie, hierbei sind insbesondere die transkriptionelle Regulation von BCL-2 (B-Cell-Lymphoma-2-Protein) und BAX (BCL-X-Activating-Protein) ausschlaggebend. BAX ist ein proapoptotisches Protein, das bei überschüssigem Vorliegen apoptoseinduktive Wirkung zeigt. Hingegen zeigt eine BCL-2 Überexpression eine apoptoseprotektive Wirkung. Ebenfalls antiapoptotische Wirkung ist für BIRC5, einem Mitglied der *Inhibitor of Apoptosis*-Familie, nachgewiesen (vgl. *Abb. 28 & 2.3.2*).

Das proapoptotische, p53 abhängige **BAX** zeigte im Analysezeitraum zwischen 2 h und 24 h nach Photonenbestrahlung keine signifikante Regulationstendenz, war also nicht durch ionisierende Strahlung induzierbar (vgl. *Abb. 28*). Für LLC1-Zellen scheint daher eine maßgebliche Rolle des BAX zur Apoptoseinduktion auf Basis genregulatorischer oder transkriptioneller Mechanismen unwahrscheinlich. Eine Beteiligung an apoptoseinduktiven Prozessen kann aber anhand einer PCR-gestützten Genexpressionsanalyse, aus unten aufgeführten Gründen, nicht ausgeschlossen werden.

Für das antiapoptotische, p53 unabhängige **BCL2** zeigte sich sowohl nach Photonebestrahlung mit 2 Gy als auch mit 6 Gy zu allen Analysezeitpunkten bis 24 h post rad eine (signifikante) DOWN-Regulation (vgl. *Abb. 28*). Dabei waren die Expressionsunterschiede zwischen den mit hohen Dosen bestrahlten und den mit niedrigen Dosen bestrahlten LLC1-Zellen gering. Diese DOWN-Regulation nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung macht in LLC1-Zellen eine Hemmung der Apoptoseinduktion unwahrscheinlich, was konsequenterweise zu einer Verschiebung des regulatorischen Gleichgewichts hin zu proapoptotischen Mechanismen führt.

Auch das zweite p53 unabhängige, antiapoptotisch wirksame Gen **BIRC5** war nach Photonenbestrahlung in LLC1-Zellen zu allen Analysezeitpunkten bis 24 h post rad (signifikant) DOWN-reguliert (vgl. *Abb. 28*), wobei die Expressionsunterschiede zwischen den mit hohen Dosen und den mit niedrigen Dosen bestrahlten LLC1-Zellen gering waren. Diese DOWN-Regulation macht für dieses Gen ebenfalls eine Hemmung der Apoptoseinduktion nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung unwahrscheinlich. Maßgebliche p53 unabhängige BCL2 Steuermechanismen sind dabei durch die Promoter NF-kappa (Chen et al., 2000), CREB (Meller et al., 2005), E2F (Lind et al., 1999) und AP-2 alpha (Decary et al., 2002) geregelt. BIRC 5 wird ebenfalls überwiegend p53 unabhängig über STAT3 (Glienke et al., 2010), NF-kappa (Tracey et al. 2005) und IRF-1 (Pizzoferrato et al. 2004) Promotereinheiten reguliert. Durch die konkordante DOWN-Regulation apoptosehemmender, p53 unabhängig regulierter Gene wie BCL2 (s.o.) oder BIRC 5 (Tamm et al., 1998) und somit auch deren Genprodukte, ist in LLC1-Zellen eine Einleitung der Apoptose nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung über Ausbleiben apoptoseinhibierender Regulationsmechanismen anzunehmen. Hingegen scheinen direkt apoptoseinduktive, p53 abhängige Prozesse via BAX in LLC1-Zellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.3.6.3 Genregulatoren der DNA-Reparatur

Bei der Regulation der DNA-Reparatur spielen unterschiedliche Mechanismen wie die transkriptionelle Geninduktion, Methylierung von Genen, Proteintranslokation und die posttranslationale Modifizierung eine wichtige Rolle. Die bestrahlungsabhängige Induktion DNA-reparaturrelevanter Gene wurde anhand der Expression von RRM2b (p53R2) und ERCC1 untersucht. Das RRM2B (p53R2)-Genprodukt stellt als Untereinheit der Ribonukleotidreduktase (RR) nach Exposition gegenüber zellulären Stressoren, für DNA-Synthese und DNA–Reparatur unentbehrliche Desoxyribonukleotide (dNTP) zur Verfügung. p53R2 ist dabei eine von drei Untereinheiten der nukleären RR (vgl. *Abb 27*). Zur Bereitstellung von dNTP bilden dabei diese Subunits funktionale Komplexe, bei deren Bildung die hRRM1-Subunit hauptbeteiligt zu sein scheint (Guittet et al., 2001, Xue et al., 2003, Zhou et al., 2003) und die Bindungspartner p53R2 und hRRM2 um freie hRRM1-Bindungsplätze konkurrieren. Über die Funktion bei zellulären Reparaturprozessen hinaus wird für p53R2 auch eine Beteiligung an apoptoseinhibierenden Prozessen (Bourdon et al., 2007) angenommen.

RRM2b (p53R2) zeigte nach Photonenbestrahlung keine signifikante Regulationstendenz des Genexpressionsniveaus im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei zeigten sich sowohl nach Bestrahlung mit 2 Gy als auch nach Bestrahlung mit 6 Gy Photonen lediglich Schwankungen um das Grundniveau (vgl. *Abb. 27*). Eine Hauptrolle des p53R2 bei Reparaturprozessen in LLC1-Zellen scheint aufgrund dieser fehlenden Regulation eher unwahrscheinlich.

Wird nun die in der Literatur beschriebene tragende Rolle des p53R2 bei der DNA-Reparatur zugrundegelegt (Xu et al., 2008, Xue et al., 2003, Zhou et al., 2003), hätte diese fehlende Regulation von p53R2 in LLC1-Zellen auch einen negativen Einfluss auf zelluläre Reparaturmechanismen bei strahleninduzierten DNA-Schäden. Die Persistenz genomischer Defekte im Verlaufe weiterer mitotischer Prozesse könnte eine hohe Mutationsfrequenz und genomische Instabilität mit beschleunigter Tumorprogression und gesteigertem Metasta-

sierungspotential resultieren (Tanaka et al., 2000, Xue et al., 2003, Ashcroft and Vousden, 1999, Xu et al., 2008). Die für die LLC1-Zellen beschriebenen variablen Phänotypen (vgl. 2.1 & 4.2.5) und die bei längerer Kultivierungsdauer auftretenden Subklonarten (vgl. 2.1) könnten daher als Manifestation genomischer Instabilität, mitbedingt durch mutationsbedingte RRM2b (p53R2) Fehlregulation gedeutet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass RRM2b (p53R2) p53 abhängig an der G2-Phasen-Arretierung (Tanaka et al., 2000), Apoptoseprotektion (Bourdon et al., 2007) und Bereitstellung von Ribonukleotiden zur DNA-Synthese und - Reparatur (Bourdon et al., 2007, Xue et al., 2003, Zhou et al., 2003, Xu et al., 2008) beteiligt zu sein scheint. Eine voll funktionsfähige und suffiziente Regulation setzt jedoch das Vorhandensein von nicht mutiertem Wildtyp p53 (wt p53) voraus (Tanaka et al., 2000). Funktionelle Veränderungen von p53 haben somit zwangsläufig auch eine Funktionsstörung p53 abhängiger Signaltransduktionswege und Regulationsmechanismen zur Folge. Durch eine, für den betroffenen Organismus kaum positiv selektive Strahlenantwort in Form einer Fehlregulation des reparaturrelevanten p53R2 stellt sich bei positivem p53-Ser. 15-Status (vgl. 4.5.4.2) die Frage nach einem in LLC1-Zellen -hinsichtlich der Steuerung von Reparaturmechanismen- potentiell funktionsveränderten p53.

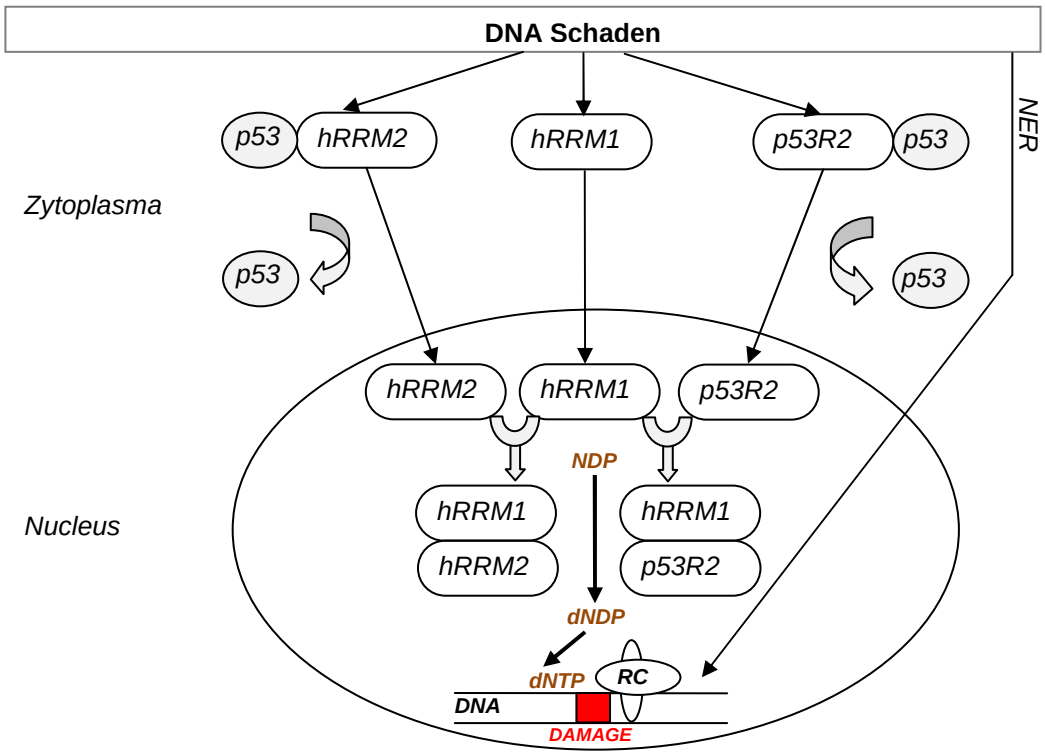


Abbildung 31: Ribonukleotidreduktase und DNA-Reparatur (Xue et al., 2003)

Nach Induktion von DNA-Schäden durch zelluläre Stressoren wird die Nukleotid-Exzissions-Reparatur (NER) initiiert und durch einen aus mindestens 16 unterschiedlichen Proteinen bestehenden (Olaussen et al., 2007) Reparaturkomplex (RC), mittels bereitgestellter phosphorylierter Desoxyribonukleotid-Diphosphate (dNTP) durchgeführt. Ausgangsstoff dieser dNTPs sind unphosphorylierte Desoxyribonukleotid-Diphosphate (dNDP), die durch Reduktion von Ribonukleotid-Diphosphaten (NDP) gewonnen werden. Dieser für die „Rohstoffgewinnung" der DNA-Reparatur entscheidende Reduktionsschritt wird von unterschiedlichen Subeinheiten der Ribonucleotid-Reduktase (hRRM1, hRRM2 und p53R2) gewährleistet, die nach Exposition gegenüber zellulären Stressoren, unter Abspaltung von p53 vom Zytoplasma in den Nucleus translozieren und dort aktive Komplexe (hRRM1+ hRRM2 und hRRM1+p53R2) bilden (Xue et al., 2003, Zhou et al., 2003).

Das **ERCC1**-Genprodukt ist dominanter Träger der Nukleotid-Exzissions-Reparatur und mitbeteiligt an der Inter-strand-crosslink-repair und Rekombinationsreparatur von DNA-Schäden (vgl. 2.3.1). Es wird vermutet, dass diese Art von DNA-Reparaturmechanismen auch an der Reparatur von Cluster-Schäden, die durch Partikelstrahlung entstanden sind, benötigt werden könnte. Hingegen wird bei Exposition gegenüber Photonenbestrahlung eine geringe ERCC1 Regulation als Schadensantwort erwartet. Dabei ist ERCC1 physiologischerweise schnell durch zellulären Stress induzierbar (Olaussen et al., 2007, Reed et al., 2000, Liu et al., 2005). Die gewonnenen Ergebnisse dienen daher hauptsächlich als Referenzpunkt für spätere Experimente mit Partikelstrahlung.

Auch das zweite reparaturrelevante Gen **ERCC1** zeigte gegenüber den Referenzgenen weder nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen Photonen von 2 Gy noch nach Bestrahlung mit hohen Dosen Photonen mit 6 Gy eine signifikante Regulationstendenz (vgl. *Abb. 27*).

Wird nun für ERCC1 die in der Literatur beschriebene tragende Rolle bei verschiedenen zellulären Reparaturmechanismen zu Grunde gelegt, so zöge diese fehlende Regulation von p53R2 in LLC1-Zellen eine ineffektive Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden nach sich. Ebenso wie das oben beschriebene RRM2b(p53R2) sind ERCC1-Expressionsniveaus und ERCC1 modulierte Reparaturprozesse p53 abhängig (Seetharam, 2010), wobei diese Regulation das Vorhandensein von nicht mutiertem Wildtyp p53 (wt p53) voraussetzt (Tanaka et al., 2000). Eine Fehlregulation der p53 abhängigen ERCC1/RRM2b Signaltransduktionswege und Regulationsmechanismen lässt bei Nachweis der p53 Phosphorylierung im Westernblot (vgl. 5.3.5) auf eine funktionelle p53-Veränderung schließen.

5.3.7 Mutationsanalyse des murinen p53 Gens (Trp53) in LLC1

Eine voll funktionsfähige und suffiziente Regulation der zellulären Strahlenantwort setzt das Vorhandensein von nicht mutiertem Wildtyp p53 (wt p53) voraus (Tanaka et al., 2000). Funktionelle Veränderungen von p53 haben somit zwangsläufig auch eine Funktionsstörung p53-abhängiger Signaltransduktionswege und Regulationsmechanismen zur Folge.

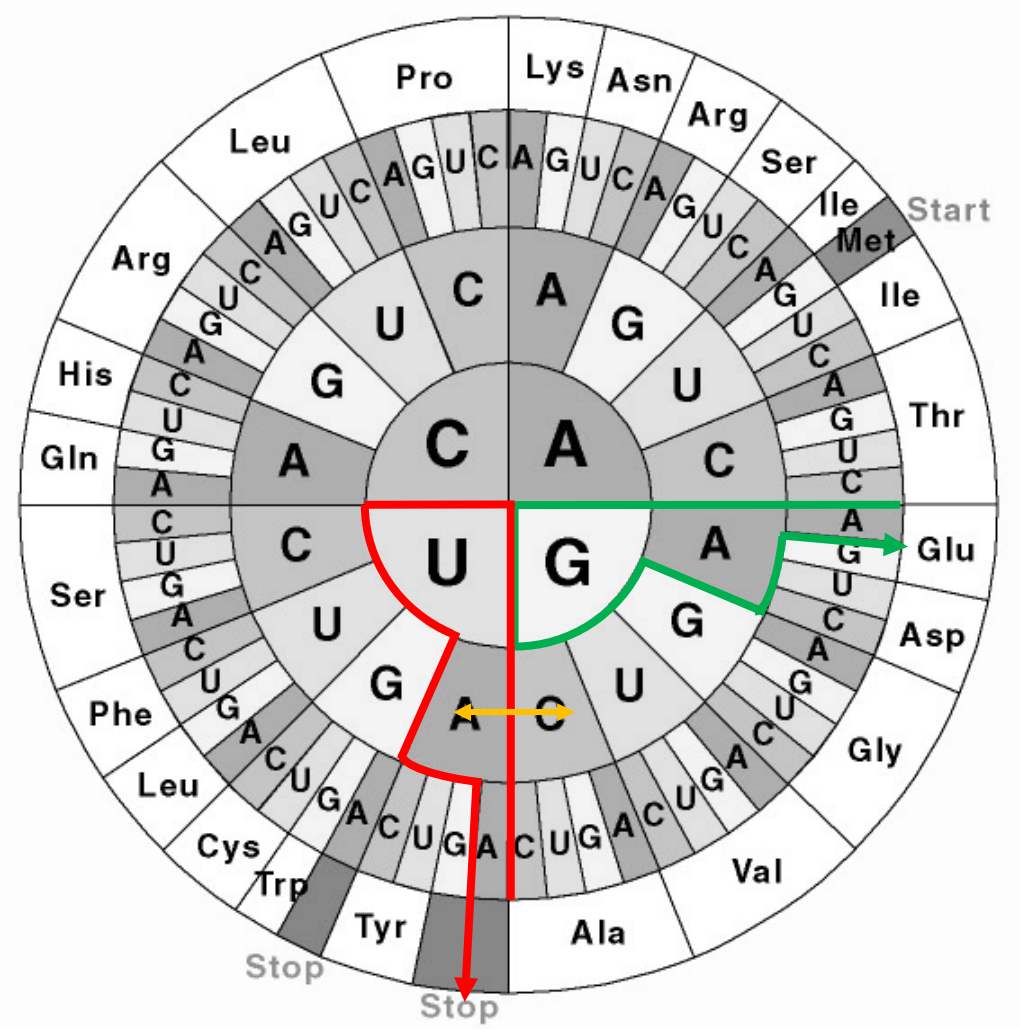
Die zusammenfassende Analyse aller durchgeführten Versuche, insbesondere die Fehlregulation und das Fehlen p53-abhängiger Prozesse der Strahlenantwort, der Proteinbiosynthese und der Genexpression warfen daher die Frage nach dem funktionellen p53-Status in LLC1-Zellen auf.

Dabei deuteten ein fehlender G1-Arrest (vgl. 4.5.2.1), fehlende p21-Expression (vgl. 4.5.4.1) und fehlende Induzierbarkeit p53-abhängiger Gene wie CDKN1A (vgl. 4.5.6.1), RRM2b/ERCC1 (vgl. 4.5.6.2) und BAX (vgl. 4.5.6.3) auf mRNA-Ebene, bei gelelektrophoretisch nachweisbarer Phosphorylierung von p53 an Serin 15 (vgl. 4.5.4.2), auf eine beeinträchtigte p53-Funktionsfähigkeit hin. Um den funktionellen Status des p53 in LLC1-Zellen zu analysieren wurde eine p53-Mutationsanalyse in Form einer Sequenzierung (vgl. 4.5.5) durchgeführt.

Bei der Sequenzierung des p53-Gens zeigte sich in Sequenz 1 (94-115 forward) an Basenposition 120 eine heterozygote Mutation mit parallelem Vorliegen zweier Nucleinbasen (vgl. Abb. 24). In der wt-p53 Sequenz liegt an dieser Position das Basen-Triplett Guanin-Adenin-Adenin, das für Glutaminsäure codiert. Durch eine heterozygote Mutation in LLC1-Zellen liegt an dieser Stelle gleichzeitig die Base Uracil (Thymin) vor, so dass sich das Basen-Triplett Uracil-Adenin-Adenin (UAA) generiert (vgl. Abb. 24). Dieses Triplett (UAA) kodiert für ein STOP-Codon (Abb. 33) das die Translation des zugehörigen p53-Proteins an dieser Stelle unterbricht. In der zu Sequenz 1 gegenläufigen Sequenz 3 (901- 921 reverse) zeigt sich an Basenposition 18 ebenfalls die heterozygote Mutation von GAA zu UAA (vgl. Abb. 25).

Durch diese Mutation ist eine suffiziente Proteinbiosynthese des p53-

Proteins in LLC1-Zellen nicht möglich und eine Funktionalität des Proteins nicht gegeben. Diese fehlerhafte Proteinstruktur des p53 erklärt sowohl den fehlenden G1-Arrest und fehlende p21-Expression (vgl. 4.5.4.1) als auch die



fehlende Induzierbarkeit p53-abhängiger Gene wie CDKN1A, RRM2b, ERCC1 und BAX auf mRNA-Ebene

Abbildung 32: Code-Sonne mit stop-codon UAA (modifiziert nach Crick)

In LLC1-Zellen liegt eine Mutation innerhalb der p53-Gensequenz vor. In der wt-p53 Sequenz liegt an dieser Position das Basen-Triplett Guanin-Adenin-Adenin, das für Glutaminsäure codiert (grün). Durch eine heterozygote Mutation in LLC1-Zellen (oranger Pfeil) liegt an dieser Stelle gleichzeitig die Base Uracil (Thymin) vor, so dass sich das Basen-Triplett Uracil-Adenin-Adenin (UAA) generiert (rot). Dieses Triplett (UAA) kodiert für ein STOP-Codon (vgl. 5.3.7).

Eine Mutation des p53 ist für maligne Neoplasien durchaus nicht ungewöhnlich, so liegen in 50-60% humaner Neoplasien p53 Mutationen vor (Hollstein et al., 1991, Dornreiter, 2006).

Trotz des p53 Funktionsverlustes sind zellzyklusregulatorische p53-unabhängige Mechanismen wie G2/M-Arretierung oder G2/M-Progression, unter Berücksichtigung der FACS- gestützten Erstellung von Zellzyklusprofilen und PCR-basierter Analyse arrestrelevanter Gene in LLC1-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit intakt. Dafür sprechen die DOWN-Regulation apoptoseinhibierender p53 unabhängiger Gene wie BCL2/BIRC5 und der FACS-analytische Nachweis der Apoptoseinduktion 24 h nach Photonenbestrahlung auf der einen Seite, sowie die Aufrechterhaltung eines ausgeprägten G2-Phasen-Arrests nach Exposition gegenüber Photonenstrahlung von 2 Gy und 6 Gy auf der anderen Seite.

6. Zusammenfassung

Hauptbestandteil der Arbeit war die strahlenbiologische Charakterisierung muriner LLC1-Zellen *in vitro*. Dabei handelt es sich um in Kultur überführte Einzelzellen eines bei *in vivo* Experimenten weit verbreiteten Tumormodells der Maus. Die soliden, entdifferenzierten Tumorzellverbände *in vivo* entsprachen einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, auch die in Kultur überführten Einzelzellen konnten aufgrund von Kernpleomorphie, Hyperchromasie, atypischen Mitosen und verschobener Kern-Plasma-Relation als maligne eingestuft werden. In Kultur zeigten die LLC1-Zellen unter optimalen Bedingungen ein schnelles, stabiles Wachstumsverhalten- mit einer Verdopplungszeit von 16 h- auch über lange Kultivierungszeiträume hinweg, reagierten aber Wachstumsmedium, Aussaatdichte sowie Art und Beschichtung der Wachstumsfläche betreffend, ausgesprochen sensibel auf Veränderungen des Kultur-Milieus. Dabei prägten sie divergente Phänotypen aus, die sich vor allem hinsichtlich ihrer Morphologie, Adhäsionsfähigkeit und Plattierungseffizienz voneinander unterschieden. Genotypisch wies der Großteil der Zellen tetraploide Chromosomensätze mit 80 Einzelchromosomen auf. Die exakte Orientierung an den ermittelten optimalen Kulturbedingungen war, durch Reduktion von Störfaktoren einer kultivierungsbedingten zellulären Beeinträchtigung, Grundlage der Aussagekraft und Reproduzierbarkeit weiterführender strahlenbiologischer Analyseverfahren.

Anhand mathematisch (Single-Hit-Multi-Target-Modell & Linearquadratisches Modell) ermittelter Kenngrößen aus generierten DEKs ließen sich die LLC1-Zellen als strahlensensible Zellen mit mäßig bis schlecht ausgeprägter Reparaturkapazität einstufen, die strahlenbiologisch eher einem frühreagierenden Zellsystem entsprechen. Trotz einer generell eher schwach ausgeprägten Reparaturkapazität waren die Mechanismen der schnellen DNA-DSB Reparatur intakt und entsprachen sowohl zeitkinetisch als auch dimensional denen anderer bereits in der Literatur beschriebener maligner Zellen.

In der Genexpressionsanalyse zeigte sich für LLC1-Zellen keine suffiziente Genregulation p53 abhängiger Gene nach Photonenbestrahlung. Die repara-

turrelevanten Gene RRM2b und ERCC1, das apoptoserelevante BAX und das zellzyklusregulierende CDKN1A waren durch Photonenbestrahlung nicht induzierbar.

Gene mit p53 unabhängigen Regulationsmechanismen wie das zellzyklusregulierende Gen GADD45 und die apoptoserelevanten Gene BCL2 und BIRC5 waren induzierbar und führten in LLC1-Zellen zu G2-Arretierung und Apoptoseinduktion nach Photonenbestrahlung. Dabei erfolgte die Verschiebung des zellulären Gleichgewichts hin zu proapototischen Mechanismen nach Photonenbestrahlung nicht durch Überexpression des, in LLC1-Zellen nicht strahleninduzierbaren, proapoptotischen Gens BAX, sondern primär durch Unterexpression antiapoptotischer Gene wie BCL2/BIRC5 mit konsequenterweise fehlender Hemmung der Apoptoseinduktion.

Nach Exposition gegenüber hohen Dosen (6 Gy) leiten LLC1-Zellen einen GADD45 vermittelten, lang andauernden, potentiell zeitlich unbegrenzten G2-Arrest ein. Hingegen war nach Bestrahlung mit geringeren Dosen von 2 Gy ein Ende des G2-Arrests zwischen 18 h und 24 h post rad festzustellen. Eine G1-Arretierung erfolgt in LLC1-Zellen auch nach Exposition gegenüber 6 Gy Photonen nicht.

Im quantitativen screening mittels Westernblot zeigte sich in LLC-Zellen eine p21 Defizienz als Ursache der fehlenden G1-Arretierung, eine Phosphorylierung von p53 an Serin 15 war hingegen nachweisbar und zeigte einen strahleninduzierten Anstieg auf Proteinebene.

Die daraufhin durchgeführte p53 Mutationsanalyse mittels Gensequenzierung zeigte in Sequenz 1 (94-115 forward) an Basenposition 120 eine heterozygote Mutation zum STOP-Codon UAA. Durch diese Mutation ist eine suffiziente Proteinbiosynthese des p53-Proteins in LLC1-Zellen nicht möglich und eine Funktionalität des Proteins nicht gegeben.

Diese fehlerhafte Proteinstruktur des p53 erklärt sowohl den fehlenden G1-Arrest, die p21-Defizienz als auch die fehlende Induzierbarkeit p53-abhängiger Gene wie CDKN1A, RRM2b, ERCC1 und BAX auf mRNA-Ebene, bei gleichzeitig gelelektrophoretisch nachweisbarem p53.

7. Summary

Major component of the study was the radiobiological characterization of murine LLC1 cells *in vitro*. These cells are culture transferred single cells emanated from a widely used *in vivo* mouse tumor model. The solid, undifferentiated tumor clusters *in vivo* corresponded to a non-small cell lung cancer, the culture transferred individual cells were classified as malignant due to nuclear pleomorphism, hyperchromasia, atypical mitoses and moved nuclear-cytoplasmic ratio. If obtained under optimal conditions in culture the LLC1-cells showed a fast, stable growth pattern - with a doubling time of 16 hours- even over long culture periods, but reacted very sensitively to changes in the cell culture environment, such as composition of the growth medium, seeding density or type and coating of the growth surface. In this respect, they expressed divergent phenotypes, which differed mainly in terms of their morphology, adhesion capability and efficiency of plating. In genotypic terms the majority of the cells showed a tetraploid chromosome set with 80 single chromosomes. Ensuring optimal culture conditions reduced the confounding effect of culture associated cellular impairment and guaranteed the validity and reproducibility of further radiobiological analysis.

Mathematically determined (based on Single-Hit-Multi-Target-Model & Linear-Quadratic-Model) characteristics of generated DEKs, suggested high radiation sensitivity, moderate to poor pronounced repair capacity. Considered radiobiological the LLC1-cells corresponded to an early responsive cell model most likely. Despite a generally rather weak distinctive capacity of repair the mechanisms of rapid DNA DSB repair suggested to be intact and conform to repair-kinetics and –dimension of malignant cells already described in the literature.

For LLC1 cells the gene expression analysis showed no sufficient regulation of p53 dependent genes after photon irradiation. The repair genes ERCC1 and RRM2b, the apoptosis related gene BAX and the cell cycle regulatory gene CDKN1A were not induced by irradiation with photons.

Genes with p53-independent regulatory mechanisms such as cell cycle regulating gene GADD45 and apoptosis related genes BCL2 and BIRC5 were irra-

diation induced and resulted in G2 arrest and induction of apoptosis after photon irradiation in LLC1 cells. The shift of the cellular balance towards pro-apoptotic mechanisms for photon irradiation is not due to overexpression of the pro-apoptotic BAX gene, which could not be induced by exposing to ionizing radiation in LLC1-cells, but mainly by underexpression of anti-apoptotic genes such as BCL2/BIRC5, with consequently missing inhibition of apoptosis.

We observed significant increase in G2-population initially after photon irradiation, both with 2 Gy and 6 Gy. After exposure to high doses (6 Gy), a long-running, potentially terminal G2 arrest was initiated, whereas after irradiation with low doses (2 Gy) a decreasing G2-population could be observed 18 h to 24 h post rad. No G1-arrest occurred in LLC1 cells even after exposure to 6 Gy photons.

Quantitative screening by Western blot showed a p21 deficiency causing the lack of G1 arrest in LLC1-cells, a phosphorylation of p53 on serine 15 was detectable, and showed a radiation induced increase on protein level.

The subsequently performed p53 gene sequencing shows a heterozygous mutation to UAA STOP codon in sequence 1 (94-115 forward) on base position 120. This mutation prevents a sufficient protein synthesis in LLC1-cells which is why a functionality of the protein is not given.

This defective protein structure of p53 explains the lack of G1 arrest, the p21-deficiency as well as the lack of inducibility of p53-dependent genes such as CDKN1A, RRM2b, ERCC1 and BAX at the mRNA level, while p53 is electrophoretically detectable.

8. Literaturverzeichnis

ABEND, M. & VAN BEUNINGEN, D. 1998. [Significance of apoptotic processes in radiotherapy. II]. *Strahlenther Onkol,* 174**,** 212-6.

ABRAHAM, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev,* 15**,** 2177-96.

AGARWAL, M. L., AGARWAL, A., TAYLOR, W. R. & STARK, G. R. 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 92**,** 8493-7.

AL RASHID, S. T., DELLAIRE, G., CUDDIHY, A., JALALI, F., VAID, M., COACKLEY, C., FOLKARD, M., XU, Y., CHEN, B. P., CHEN, D. J., LILGE, L., PRISE, K. M., BAZETT JONES, D. P. & BRISTOW, R. G. 2005. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks *in vivo*. *Cancer Res,* 65**,** 10810-21.

ALBRECHTSEN, N., DORNREITER, I., GROSSE, F., KIM, E., WIESMÜLLER, L. & DEPPERT, W. 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene,* 18**,** 7706-17.

ALTAF, M., SAKSOUK, N. & CÔTÉ, J. 2007. Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat Res,* 618**,** 81-90.

ALTMANN, GERBER & OKADA 1970. Cells. Radiation Chemistry, Vol.1 Academic Press, New York.

ARENDS, M. J. & WYLLIE, A. H. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol,* 32**,** 223-54.

ARENZ, A. 2007. *Entwicklung und Validierung eines Bioassays zum Nachweis induzierter Genaktivität für den Einsatz auf der Internationalen Raumstation* [Online].

ASHCROFT, M. & VOUSDEN, K. H. 1999. Regulation of p53 stability. *Oncogene,* 18**,** 7637-43.

BACHE, M., DUNST, J., WÜRL, P., FRÖDE, D., MEYE, A., SCHMIDT, H., RATH, F. W. & TAUBERT, H. 1999. G2/M checkpoint is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res,* 19**,** 1827-32.

BANÁTH, J. P., MACPHAIL, S. H. & OLIVE, P. L. 2004. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res,* 64**,** 7144-9.

BARTON, O. 2010 Checkpointkontrolle und Reparatur Heterochromatin-assoziierter DNA-Doppelstrangbrüche in bestrahlten G2-Phase Zellen [Internet]

BARAK, Y., JUVEN, T., HAFFNER, R. & OREN, M. 1993. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J,* 12**,** 461-8.

BASSING, C. H., CHUA, K. F., SEKIGUCHI, J., SUH, H., WHITLOW, S. R., FLEMING, J. C., MONROE, B. C., CICCONE, D. N., YAN, C., VLASAKOVA, K., LIVINGSTON, D. M., FERGUSON, D. O., SCULLY, R. & ALT, F. W. 2002. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 99**,** 8173-8.

BENNETT, M., MACDONALD, K., CHAN, S. W., LUZIO, J. P., SIMARI, R. & WEISSBERG, P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science,* 282**,** 290-3.

BERNHARD, E. J., MUSCHEL, R. J., BAKANAUSKAS, V. J. & MCKENNA, W. G. 1996. Reducing the radiation-induced G2 delay causes HeLa cells to undergo apoptosis instead of mitotic death. *Int J Radiat Biol,* 69**,** 575-84.

BERTRAM, J. S. & JANIK, P. 1980. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett,* 11**,** 63-73.

BOURDON, A., MINAI, L., SERRE, V., JAIS, J. P., SARZI, E., AUBERT, S., CHRÉTIEN, D., DE LONLAY, P., PAQUIS-FLUCKLINGER, V., ARAKAWA, H., NAKAMURA, Y., MUNNICH, A. & RÖTIG, A. 2007. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet,* 39**,** 776-80.

CELESTE, A., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., KRUHLAK, M. J., PILCH, D. R., STAUDT, D. W., LEE, A., BONNER, R. F., BONNER, W. M. & NUSSENZWEIG, A. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol,* 5**,** 675-9.

CHAN, T. A., HWANG, P. M., HERMEKING, H., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 2000. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev,* 14**,** 1584-8.

CHAO, D. T. & KORSMEYER, S. J. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol,* 16**,** 395-419.

CHEN, C., EDELSTEIN L.C., GELINAS, C. 2000. The Rel/NF-kB Family Directly Activates Expression of the ‚Apoptosis Inhibitor Bcl-xL. *Mol Cell Biol*, 20, 2687–2695.

CHINERY, R., BROCKMAN, J. A., PEELER, M. O., SHYR, Y., BEAUCHAMP, R. D. & COFFEY, R. J. 1997. Antioxidants enhance the cytotoxicity of

chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nat Med,* 3**,** 1233-41.

CHIPUK, J. E. & GREEN, D. R. 2003. p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol,* 23**,** 355-61.

CHIPUK, J. E., KUWANA, T., BOUCHIER-HAYES, L., DROIN, N. M., NEWMEYER, D. D., SCHULER, M. & GREEN, D. R. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science,* 303**,** 1010-4.

CLIFFORD, B., BELJIN, M., STARK, G. R. & TAYLOR, W. R. 2003. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res,* 63**,** 4074-81.

COLLECCHI, P., BALDINI, E., GIANNESSI, P., NACCARATO, A. G., PASSONI, A., GARDIN, G., RONCELLA, M., EVANGELISTA, G., BEVILACQUA, G. & CONTE, P. F. 1998. Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumour regression and biological markers. *Eur J Cancer,* 34**,** 1701-4.

COSTES, S. V., BOISSIÈRE, A., RAVANI, S., ROMANO, R., PARVIN, B. & BARCELLOS-HOFF, M. H. 2006. Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat Res,* 165**,** 505-15.

CRITCHLOW, S. E. & JACKSON, S. P. 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci,* 23**,** 394-8.

DAHM-DAPHI, J., 2000. P53: biology and role for cellular radiosensitivity. Strahlenther Onkol 2000; 176: 278-285

D'ORAZI, G., CECCHINELLI, B., BRUNO, T., MANNI, I., HIGASHIMOTO, Y., SAITO, S., GOSTISSA, M., COEN, S., MARCHETTI, A., DEL SAL, G., PIAGGIO, G., FANCIULLI, M., APPELLA, E. & SODDU, S. 2002. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol,* 4**,** 11-9.

DECARY, S., DECESSE, J.T., OGRYZKO, V., REED, J.C., NAGUIBNEVA, I., HAREL-BELLAN, A., CREMISI, C.E., 2002. The Retinoblastoma Protein Binds the Promoter of the Survival Gene *bcl-2* and Regulates Its Transcription in Epithelial Cells through Transcription Factor AP-2. *Mol Cell Biol*., 22, 7877–7888.

DEL BUFALO, D., BIROCCIO, A., LEONETTI, C. & ZUPI, G. 1997. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J,* 11**,** 947-53.

DORNREITER, I. 2006. schriftenreihe_rs679. *Der Zusammenhang von strahleninduziertem Zelltod (Apoptose) und dem protektiven G2/M*

Arrest in menschlichen Zellen. Schriftreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz: Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.

EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem,* 68**,** 383-424.

EL-DEIRY, W. S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol,* 8**,** 345-57.

EL-DEIRY, W. S., TOKINO, T., VELCULESCU, V. E., LEVY, D. B., PARSONS, R., TRENT, J. M., LIN, D., MERCER, W. E., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell,* 75**,** 817-25.

ERHARD, S., PASCHER, E., GREVE, B., WEDEMEYER, N., KIENAST, J., WILLICH, N. & GÖHDE, W. 2005. Schriftreihe Reaktorsicherheit_rs651. *Ermittlung der Strahlenempfindlichkeit bei Patienten nach konditionierender Bestrahlung zur Vorbereitung einer Knochenmarks- bzw. Stammzellentransplantation.* Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz: Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.

FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer,* 127**,** 2893-917.

FERNÁNDEZ, Y., ESPAÑA, L., MAÑAS, S., FABRA, A. & SIERRA, A. 2000. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ,* 7**,** 350-9.

FIDLER, I. J. 1978. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res,* 38**,** 2651-60.

FIDLER, I. J. & KRIPKE, M. L. 1977. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science,* 197**,** 893-5.

FORD, E. H. & WOOLLAM, D. H. 1963. A STUDY OF THE MITOTIC CHROMOSOMES OF MICE OF THE STRONG A LINE. *Exp Cell Res,* 32**,** 320-6.

FOSTER, E. R. & DOWNS, J. A. 2005. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J,* 272**,** 3231-40.

FRANKEN, N. A., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. & VAN BREE, C. 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc,* 1**,** 2315-9.

FRICKE, A. 2008. *Untersuchungen zur Chromatinstruktur und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in menschlichen Zellen mittels ionisierender Strahlung* [Online].

GAENKO, G. P., KOZLOV, A. M., SAPRYKINA, N. S., DOROTNIKOVA, E. B., KHAIDUKOV, S. V. & MOLOTKOVSKII, Y. G. 2002. Phenotypic characteristics of lewis lung carcinoma cells. *Bull Exp Biol Med,* 134**,** 382-4.

GAO, C. & TSUCHIDA, N. 1999. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res,* 90**,** 180-7.

GAO, H., JIN, S., SONG, Y., FU, M., WANG, M., LIU, Z., WU, M. & ZHAN, Q. 2005. B23 regulates GADD45a nuclear translocation and contributes to GADD45a-induced cell cycle G2-M arrest. *J Biol Chem,* 280**,** 10988-96.

GARTENHAUS, R. B., WANG, P. & HOFFMANN, P. 1996. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 93**,** 265-8.

GEISSE, C. 2010. Forschungszentrum Jülich, Geschäftsbereich Sicherheit und Strahlenschutz (S), "Glossar Strahlenschutz".

GIACCIA, A. J. & KASTAN, M. B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev,* 12**,** 2973-83.

GINSBERG, D., MECHTA, F., YANIV, M. & OREN, M. 1991. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 88**,** 9979-83.

GLIENKE, W., MAUTE, L., WICHT, J., BERGMANN L. 2010. Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. *Cancer Invest.* 28, 166-71.

GLINSKY, G. V. 1997. Apoptosis in metastatic cancer cells. *Crit Rev Oncol Hematol,* 25**,** 175-86.

GLINSKY, G. V. & GLINSKY, V. V. 1996. Apoptosis amd metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death. *Cancer Lett,* 101**,** 43-51.

GONTIJO, A. M., GREEN, C. M. & ALMOUZNI, G. 2003. Repairing DNA damage in chromatin. *Biochimie,* 85**,** 1133-47.

GUDKOV, A. V. & KOMAROVA, E. A. 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer,* 3**,** 117-29.

GUILLOUF, C., ROSSELLI, F., KRISHNARAJU, K., MOUSTACCHI, E., HOFFMAN, B. & LIEBERMANN, D. A. 1995. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene,* 10**,** 2263-70.

GUITTET, O., HÅKANSSON, P., VOEVODSKAYA, N., FRIDD, S., GRÄSLUND, A., ARAKAWA, H., NAKAMURA, Y. & THELANDER, L. 2001. Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase *in vitro* with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. *J Biol Chem,* 276**,** 40647-51.

HALDAR, S., NEGRINI, M., MONNE, M., SABBIONI, S. & CROCE, C. M. 1994. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res,* 54**,** 2095-7.

HAN, J., HENDZEL, M. J. & ALLALUNIS-TURNER, J. 2006. Quantitative analysis reveals asynchronous and more than DSB-associated histone H2AX phosphorylation after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res,* 165**,** 283-92.

HARPER, J. W., ADAMI, G. R., WEI, N., KEYOMARSI, K. & ELLEDGE, S. J. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell,* 75**,** 805-16.

HARRIS, C. C. & HOLLSTEIN, M. 1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med,* 329**,** 1318-27.

HAUPT, Y., MAYA, R., KAZAZ, A. & OREN, M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature,* 387**,** 296-9.

HENRY, N., VAN LAMSWEERDE, A. L. & VAES, G. 1983. Collagen degradation by metastatic variants of Lewis lung carcinoma: cooperation between tumor cells and macrophages. *Cancer Res,* 43**,** 5321-7.

HERMEKING, H., LENGAUER, C., POLYAK, K., HE, T. C., ZHANG, L., THIAGALINGAM, S., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell,* 1**,** 3-11.

HOCKENBERY, D., NUÑEZ, G., MILLIMAN, C., SCHREIBER, R. D. & KORSMEYER, S. J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature,* 348**,** 334-6.

HOCKENBERY, D. M., ZUTTER, M., HICKEY, W., NAHM, M. & KORSMEYER, S. J. 1991. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 88**,** 6961-5.

HOFMANN, T. G., MÖLLER, A., SIRMA, H., ZENTGRAF, H., TAYA, Y., DRÖGE, W., WILL, H. & SCHMITZ, M. L. 2002. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol,* 4**,** 1-10.

HOLLANDER, M. C., ALAMO, I., JACKMAN, J., WANG, M. G., MCBRIDE, O. W. & FORNACE, A. J. 1993. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J Biol Chem,* 268**,** 24385-93.

HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. & HARRIS, C. C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science,* 253**,** 49-53.

HONDA, R., TANAKA, H. & YASUDA, H. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett,* 420**,** 25-7.

INBAL, B., COHEN, O., POLAK-CHARCON, S., KOPOLOVIC, J., VADAI, E., EISENBACH, L. & KIMCHI, A. 1997. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature,* 390**,** 180-4.

INNOCENTE, S. A., ABRAHAMSON, J. L., COGSWELL, J. P. & LEE, J. M. 1999. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 96**,** 2147-52.

JANUS, F., ALBRECHTSEN, N., KNIPPSCHILD, U., WIESMÜLLER, L., GROSSE, F. & DEPPERT, W. 1999. Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol,* 19**,** 2155-68.

JIN, S., ANTINORE, M., LUNG, F., DONG, X., ZHAO, H., FAN, F., COLCHAGIE, A., BLANCK, P., 2000 The GADD45 Inhibition of Cdc2 Kinase Correlates with GADD45-mediated Growth Suppression. *The Journal of Biological Chemistry, 275, 16602-16608.*

JENNER, T. J., CUNNIFFE, S. M., STEVENS, D. L. & O'NEILL, P. 1998. Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation. *Radiat Res,* 150**,** 593-9.

JENNER, T. J., FULFORD, J. & O'NEILL, P. 2001. Contribution of base lesions to radiation-induced clustered DNA damage: implication for models of radiation response. *Radiat Res,* 156**,** 590-3.

KANAAR, R., HOEIJMAKERS, J. H. & VAN GENT, D. C. 1998. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol,* 8**,** 483-9.

KASTAN, M. B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. & CRAIG, R. W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res,* 51**,** 6304-11.

KASTAN, M. B., ZHAN, Q., EL-DEIRY, W. S., CARRIER, F., JACKS, T., WALSH, W. V., PLUNKETT, B. S., VOGELSTEIN, B. & FORNACE, A. J. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell,* 71**,** 587-97.

KAUFFMAN, G. W., MOSER, E. & SAUER, R. 2009. Strahlenbiologie. *Radiologie pp 45-47.*

KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer,* 26**,** 239-57.

KO, L. J. & PRIVES, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev,* 10**,** 1054-72.

KOKONTIS, J. M., WAGNER, A. J., O'LEARY, M., LIAO, S. & HAY, N. 2001. A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene,* 20**,** 659-68.

KOSHIKAWA, N., IYOZUMI, A., GASSMANN, M. & TAKENAGA, K. 2003. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene,* 22**,** 6717-24.

KOSHIKAWA, N., MAEJIMA, C., MIYAZAKI, K., NAKAGAWARA, A. & TAKENAGA, K. 2006. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene,* 25**,** 917-28.

KOSHIKAWA, N., TAKENAGA, K., TAGAWA, M. & SAKIYAMA, S. 2000. Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells. *Cancer Res,* 60**,** 2936-41.

KRAFT, G. 2000. Tumor Therapy with Heavy Charged Particles. *Progress in Particle and Nuclear Physics 45 (S2) pp 473-544*.

KRIEGER, H. (ed.) 2009a. *Grundlagen zur Strahlenbiologie der Zelle,* Grundlagen der Strahlenphysik und des Strahlenschutzes, pp 366-432.

KRIEGER, H. (ed.) 2009b. *Ionisierung und Energieübertragung,* Grundlagen der Strahlenphysik und des Strahlenschutzes, pp 298-303.

KRIEGER, H. (ed.) 2009c. *Strahlenschutzbegriffe und Dosisgrößen,* Grundlagen der Strahlenphysik und des Strahlenschutzes, pp 308-315.

KUBBUTAT, M. H., JONES, S. N. & VOUSDEN, K. H. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature,* 387**,** 299-303.

KUERBITZ, S. J., PLUNKETT, B. S., WALSH, W. V. & KASTAN, M. B. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 89**,** 7491-5.

LEE, S., ELENBAAS, B., LEVINE, A. & GRIFFITH, J. 1995. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell,* 81**,** 1013-20.

LEHMANN, B. D., MCCUBREY, J. A., JEFFERSON, H. S., PAINE, M. S., CHAPPELL, W. H. & TERRIAN, D. M. 2007. A dominant role for p53-dependent cellular senescence in radiosensitization of human prostate cancer cells. *Cell Cycle,* 6**,** 595-605.

LEVINE, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell,* 88**,** 323-31.

LEVINE, A. J., MOMAND, J. & FINLAY, C. A. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature,* 351**,** 453-6.

LIND, E.F., WAYNE, J., WANG, Q.Z., STAEVA, T., STOLZER, A., PETRIE, H.T., 1999. Cell Cycle and Cell Death Functions Complexes Reveal the Potential for Integrated. *J Immunol* 1999;162;5374-5379

LIU, D., O'DAY, S. J., YANG, D., BOASBERG, P., MILFORD, R., KRISTEDJA, T., GROSHEN, S. & WEBER, J. 2005. Impact of gene polymorphisms on clinical outcome for stage IV melanoma patients treated with biochemotherapy: an exploratory study. *Clin Cancer Res,* 11**,** 1237-46.

LOWE, S. W. & LIN, A. W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis,* 21**,** 485-95.

MACPHAIL, S. H., BANÁTH, J. P., YU, T. Y., CHU, E. H., LAMBUR, H. & OLIVE, P. L. 2003. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol,* 79**,** 351-8.

MALTZMAN, W. & CZYZYK, L. 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol,* 4**,** 1689-94.

MAYO, J. G. 1972. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother Rep 2,* 3**,** 325-30.

MAYO, J. G., LASTER, W. R., ANDREWS, C. M. & SCHABEL, F. M. 1972. Success and failure in the treatment of solid tumors. 3. "Cure" of metastatic Lewis lung carcinoma with methyl-CCNU (NSC-95442) and surgery-chemotherapy. *Cancer Chemother Rep,* 56**,** 183-95.

MCCONKEY, D. J., GREENE, G. & PETTAWAY, C. A. 1996. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res,* 56**,** 5594-9.

MCKENNA, W. G., ILIAKIS, G., WEISS, M. C., BERNHARD, E. J. & MUSCHEL, R. J. 1991. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res,* 125**,** 283-7.

MELLER, R., MINAMI, M., CAMERON, J., IMPEY, S., CHEN, D., LAN, J.Q., HENSHALL, D., SIMON, R.P., 2005. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,* 25, 234–246*.*

MELNIKOVA, VO., Mutant p53 is constitutively phosphorylated at Serine 15 in UV-induced mouse skin tumors: involvement of ERK1/2 MAP kinase, *Oncogene* (2003) 22, 5958–5966.

MEYN, R. E., STEPHENS, L. C., ANG, K. K., HUNTER, N. R., BROCK, W. A., MILAS, L. & PETERS, L. J. 1993. Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int J Radiat Biol,* 64**,** 583-91.

MICHALOVITZ, D., HALEVY, O. & OREN, M. 1990. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell,* 62**,** 671-80.

MIYASHITA, T., HARIGAI, M., HANADA, M. & REED, J. C. 1994. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res,* 54**,** 3131-5.

MIYASHITA, T. & REED, J. C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell,* 80**,** 293-9.

MUNRO, T. R. 1970. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res,* 42**,** 451-70.

NAGASAWA, H., KENG, P., HARLEY, R., DAHLBERG, W. & LITTLE, J. B. 1994. Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol,* 66**,** 373-9.

NAKANO, H., KOBAYASHI, E., TAKAHASHI, I., TAMAOKI, T., KUZUU, Y. & IBA, H. 1987. Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60. *J Antibiot (Tokyo),* 40**,** 706-8.

NAUJOKAT, C., SEZER, O., ZINKE, H., LECLERE, A., HAUPTMANN, S. & POSSINGER, K. 2000. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur J Haematol,* 65**,** 221-36.

NEWMAN, H. C., PRISE, K. M. & MICHAEL, B. D. 2000. The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int J Radiat Biol,* 76**,** 1085-93.

OHNO, S., KAPLAN, W. D. & KINOSITA, R. 1957. Heterochromatic regions and nucleolus organizers in chromosomes of the mouse, Mus musculus. *Exp Cell Res,* 13**,** 358-64.

OHNO, S., KAPLAN, W. D. & KINOSITA, R. 1959a. On the end-to-end association of the X and Y chromosomes of Mus musculus. *Exp Cell Res,* 18**,** 282-90.

OHNO, S., KOVACS, E. T. & KINOSITA, R. 1959b. On the X-chromosomes of mouse mammary carcinoma cells. *Exp Cell Res,* 16**,** 462-5.

OLAUSSEN, K. A., MOUNTZIOS, G. & SORIA, J. C. 2007. ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Pulm Med,* 13**,** 284-9.

OLTVAI, Z. N., MILLIMAN, C. L. & KORSMEYER, S. J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell,* 74**,** 609-19.

OVEJERA, A., JOHNSON, R. K. & GOLDIN, A. 1975. Growth Characteristics and Chemotherapeutic Response of Intavenously Implanted Lewis Lung Carcinoma. *Cancer Chemother Rep,* vol 5**,** 111-125.

PALAYOOR, S. T., MACKLIS, R. M., BUMP, E. A. & COLEMAN, C. N. 1995. Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat Res,* 141**,** 235-43.

PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J. & PISANI, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin,* 55**,** 74-108.

PAULL, T. T., ROGAKOU, E. P., YAMAZAKI, V., KIRCHGESSNER, C. U., GELLERT, M. & BONNER, W. M. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol,* 10**,** 886-95.

PEAK, M. J., WANG, L., HILL, C. K. & PEAK, J. G. 1991. Comparison of repair of DNA double-strand breaks caused by neutron or gamma radiation in cultured human cells. *Int J Radiat Biol,* 60**,** 891-8.

PEARSON, M., CARBONE, R., SEBASTIANI, C., CIOCE, M., FAGIOLI, M., SAITO, S., HIGASHIMOTO, Y., APPELLA, E., MINUCCI, S., PANDOLFI, P. P. & PELICCI, P. G. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature,* 406**,** 207-10.

PENG, C. Y., GRAVES, P. R., THOMA, R. S., WU, Z., SHAW, A. S. & PIWNICA-WORMS, H. 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science,* 277**,** 1501-5.

PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. & DEMPFLE, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res,* 30**,** e36.

PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett,* 26**,** 509-15.

PIZZOFERRATO, E., LIU, Y., GAMBOTTO, A. 2004. Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 promotes human breast cancer cell

death and results in reduced expression of survivin. *Cancer Research*, vol. 64, pp. 8381–8388.

POMP, J., WIKE, J. L., OUWERKERK, I. J., HOOGSTRATEN, C., DAVELAAR, J., SCHRIER, P. I., LEER, J. W., THAMES, H. D. & BROCK, W. A. 1996. Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiother Oncol,* 40**,** 121-5.

POUGET, J. P. & MATHER, S. J. 2001. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med,* 28**,** 541-61.

PRASHER, J. M., LALAI, A. S., HEIJMANS-ANTONISSEN, C., PLOEMACHER, R. E., HOEIJMAKERS, J. H., TOUW, I. P. & NIEDERNHOFER, L. J. 2005. Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J,* 24**,** 861-71.

PUCK, T. T. & MARCUS, P. I. 1956. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med,* 103**,** 653-66.

RAHN, J. J., ADAIR, G. M. & NAIRN, R. S. 2010. Multiple roles of ERCC1-XPF in mammalian interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen,* 51**,** 567-81.

RAKOZY, C., GRIGNON, D. J., SARKAR, F. H., SAKR, W. A., LITTRUP, P. & FORMAN, J. 1998. Expression of bcl-2, p53, and p21 in benign and malignant prostatic tissue before and after radiation therapy. *Mod Pathol,* 11**,** 892-9.

REED, E., DABHOLKAR, M., THORNTON, K., THOMPSON, C., YU, J. J. & BOSTICK-BRUTON, F. 2000. Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues. *Oncol Rep,* 7**,** 1123-8.

REISER, M., KUHN, F. & DEBUS, J. (eds.) 2006. *Physikalische Grundlagen,* Duale Reihe Radiologie, 2. korrigierte Auflage 2006, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 2.

ROGAKOU, E. P., BOON, C., REDON, C. & BONNER, W. M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol,* 146**,** 905-16.

ROGAKOU, E. P., NIEVES-NEIRA, W., BOON, C., POMMIER, Y. & BONNER, W. M. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem,* 275**,** 9390-5.

ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S. & BONNER, W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem,* 273**,** 5858-68.

RONINSON, I. B. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res,* 63**,** 2705-15.

ROTHE, G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie pp27-70.

ROTHKAMM, K. & LÖBRICH, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 100**,** 5057-62.

SACHS, L. 1954. THE POSSIBILITIES OF CROSSING-OVER BETWEEN THE SEX CHROMOSOMES OF THE HOUSE MOUSE. Department of Experimental Biology, Weizmann Institute of Science,Rehovoth, Israel.

SANDRI, M. I., ISAACS, R. J., ONGKEKO, W. M., HARRIS, A. L., HICKSON, I. D., BROGGINI, M. & VIKHANSKAYA, F. 1996. p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res,* 24**,** 4464-70.

SAUER, R. 2010. Strahlentherapie und Onkologie. *Strahlenbiologie pp119-121.*

SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol,* 7**,** 3.

SCHWEINFURTH, Y. E. 2007. Prozessierung und Reparatur von komplexen DNA-Schäden mikroskopische Analyse und Quantifizierung des phosphorylierten Histons H2AX und des Tumorsuppressors p53 [Online].

Seetharam, 2010, Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells. *Cancer Res*, 30, 2531-2538

SENGUPTA, S. & HARRIS, C. C. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 6**,** 44-55.

SHTIVELMAN, E. 1997. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene,* 14**,** 2167-73.

SKLADANOWSKI, A. & LARSEN, A. K. 1997. Expression of wild-type p53 increases etoposide cytotoxicity in M1 myeloid leukemia cells by facilitated G2 to M transition: implications for gene therapy. *Cancer Res,* 57**,** 818-23.

SOKOLOV, M. V., DICKEY, J. S., BONNER, W. M. & SEDELNIKOVA, O. A. 2007. gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle,* 6**,** 2210-2.

SONG, H., HOLLSTEIN, M. & XU, Y. 2007. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol,* 9**,** 573-80.

STEPHENS, L. C., ANG, K. K., SCHULTHEISS, T. E., MILAS, L. & MEYN, R. E. 1991. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res,* 127**,** 308-16.

STEWART, N., HICKS, G. G., PARASKEVAS, F. & MOWAT, M. 1995. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene,* 10**,** 109-15.

STOREY, B. T., PITTMAN, H. K., CHRISTIAN, J. F., HAISCH, C. E. & VERBANAC, K. M. 2004. Characterization of Lewis lung clonal variants in a model of syngeneic pulmonary murine metastases. *Clin Exp Metastasis,* 21**,** 265-73.

STRASSER, A., HUANG, D. C. & VAUX, D. L. 1997. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta,* 1333**,** F151-78.

SUGIURA, K. & STOCK, C. C. 1955. Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer Res,* 15**,** 38-51.

TAKAOKA, A., ADACHI, M., OKUDA, H., SATO, S., YAWATA, A., HINODA, Y., TAKAYAMA, S., REED, J. C. & IMAI, K. 1997. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene,* 14**,** 2971-7.

TAKASU, M., TADA, Y., WANG, J. O., TAGAWA, M. & TAKENAGA, K. 1999. Resistance to apoptosis induced by microenvironmental stresses is correlated with metastatic potential in Lewis lung carcinoma. *Clin Exp Metastasis,* 17**,** 409-16.

TAKENAGA, K. 1986. Modification of the metastatic potential of tumor cells by drugs. *Cancer Metastasis Rev,* 5**,** 67-75.

TAKENAGA, K., NAKAMURA, Y., ENDO, H. & SAKIYAMA, S. 1994. Involvement of S100-related calcium-binding protein pEL98 (or mts1) in cell motility and tumor cell invasion. *Jpn J Cancer Res,* 85**,** 831-9.

TAKENAGA, K., NAKAMURA, Y. & SAKIYAMA, S. 1997. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene,* 14**,** 331-7.

TAMAOKI, T., NOMOTO, H., TAKAHASHI, I., KATO, Y., MORIMOTO, M. & TOMITA, F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun,* 135**,** 397-402.

TAMM, I., WANG, Y., SAUSVILLE, E., SCUDIERO, D. A., VIGNA, N., OLTERSDORF, T. & REED, J. C. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res,* 58**,** 5315-20.

TANAKA, H., ARAKAWA, H., YAMAGUCHI, T., SHIRAISHI, K., FUKUDA, S., MATSUI, K., TAKEI, Y. & NAKAMURA, Y. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature,* 404**,** 42-9.

TAUCHI, H. & SAWADA, S. 1994. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukaemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure. *Int J Radiat Biol,* 65**,** 449-55.

TAYLOR, W. R. & STARK, G. R. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene,* 20**,** 1803-15.

THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science,* 281**,** 1312-6.

TRACEY, L., PEREZ-ROSADO, A., ARTIGA, M.J., CAMACHO, F.I., RODRIGUEZ, A., MARTINEZ, N. 2005. Expression of the NF-κB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *The Journal of Pathology,* 206, 123–134.

VAN ATTIKUM, H. & GASSER, S. M. 2005. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol,* 6**,** 757-65.

VAN LAMSWEERDE, A. L., HENRY, N. & VAES, G. 1983. Metastatic heterogeneity of cells from Lewis lung carcinoma. *Cancer Res,* 43**,** 5314-20.

VILLUENDAS, R., PIRIS, M. A., ORRADRE, J. L., MOLLEJO, M., RODRIGUEZ, R. & MORENTE, M. 1991. Different bcl-2 protein expression in high-grade B-cell lymphomas derived from lymph node or mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol,* 139**,** 989-93.

VOGELSTEIN, B., LANE, D. & LEVINE, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature,* 408**,** 307-10.

WANG, Q., ZAMBETTI, G. P. & SUTTLE, D. P. 1997. Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol,* 17**,** 389-97.

WANNEMACHER, M., DEBUS, J. & WENZ, F. 2006. *Strahlentherapie, Kap. 2 Strahlenbiologische Grundlagen, pp 11-48*, Springer.

WARTERS, R. L., ADAMSON, P. J., POND, C. D. & LEACHMAN, S. A. 2005. Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol,* 124**,** 807-17.

WEINER, F., BEDO, A. & ABRAHAM, A. 1964. KARYOGRAM OF THE INBRED MOUSE STRAIN C57B1/Gif. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny,* Vol. 59, No. 4**,** 103-105.

WINTERS, Z. E., ONGKEKO, W. M., HARRIS, A. L. & NORBURY, C. J. 1998. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene,* 17**,** 673-84.

WONG, C. W., LEE, A., SHIENTAG, L., YU, J., DONG, Y., KAO, G., AL-MEHDI, A. B., BERNHARD, E. J. & MUSCHEL, R. J. 2001. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res,* 61**,** 333-8.

WU, X., BAYLE, J. H., OLSON, D. & LEVINE, A. J. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev,* 7**,** 1126-32.

WYKES, S. M., PIASENTIN, E., JOINER, M. C., WILSON, G. D. & MARPLES, B. 2006. Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat Res,* 165**,** 516-24.

WYLLIE, A. H. 1993. Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer,* 67**,** 205-8.

XU, X., PAGE, J. L., SURTEES, J. A., LIU, H., LAGEDROST, S., LU, Y., BRONSON, R., ALANI, E., NIKITIN, A. Y. & WEISS, R. S. 2008. Broad overexpression of ribonucleotide reductase genes in mice specifically induces lung neoplasms. *Cancer Res,* 68**,** 2652-60.

XUE, L., ZHOU, B., LIU, X., QIU, W., JIN, Z. & YEN, Y. 2003. Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits. *Cancer Res,* 63**,** 980-6.

Y. SCHWEINFURTH, B. JAKOB, J. RUDOLPH & TAUCHER-SCHOLZ, G. 2006. TP53 Foci Formation at Sites of Radiation-Induced DNA-Damage. GSI Darmstadt.

YIN, X. M., OLTVAI, Z. N. & KORSMEYER, S. J. 1995. Heterodimerization with Bax is required for Bcl-2 to repress cell death. *Curr Top Microbiol Immunol,* 194**,** 331-8.

YOUNG, M. R., NEWBY, M. & MEUNIER, J. 1985. Relationships between morphology, dissemination, migration, and prostaglandin E2 secretion by cloned variants of Lewis lung carcinoma. *Cancer Res,* 45**,** 3918-23.

ZHAO, R., GISH, K., MURPHY, M., YIN, Y., NOTTERMAN, D., HOFFMAN, W. H., TOM, E., MACK, D. H. & LEVINE, A. J. 2000. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev,* 14**,** 981-93.

ZHOU, B., LIU, X., MO, X., XUE, L., DARWISH, D., QIU, W., SHIH, J., HWU, E. B., LUH, F. & YEN, Y. 2003. The human ribonucleotide reductase subunit hRRM2 complements p53R2 in response to UV-induced DNA repair in cells with mutant p53. *Cancer Res,* 63**,** 6583-94.

ANHANG

Material und Bezugsquellen (Artikel und Hersteller)

Bestrahlung

Bestrahlungsgerät Elekta Supernova, Elekta Oncology Systems LTD., Crawley, GB

Geräte für die Zellkultur

Inkubator Hera Cell, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Elektrische Pipettierhilfe Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Hämacytometer/Neubauer-Kammer, Brand GMBH + CO KG, Wertheim

Deckgläser für Hämacytometer, optisch plan geschliffen, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig

Lichtmikroskop TMS, Nikon Corp., Tokyo, Japan

Pipetten Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Schüttler Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Sterilbank Hera Safe, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Wasseraufbereitungsanlage, Milli-Q Water Purification System, Millipore Corporation, Bedford, USA

Wasserbad Köttermann GmbH & Co.KG Labortechnik, Hannover

Zentrifuge Fresco 21, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

12 well Platte, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Deckgläser Otto E. Kobe KG, Marburg, Deutschland

Falcon 15 ml, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Falcon 50 ml, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Kryoröhrchen Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Pasteurpipetten Otto E. Kobe KG, Marburg, Deutschland

Petrischale 3, 5 cm Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Petrischale 3, 5 & 10 cm, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Pipettenspitzen, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipetten 1, 5, 10 & 25 ml, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturflasche T25 SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturflasche T75 SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Medien und Zusätze für die Zellkultur

Accutase, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

Trypsin-EDTA, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

DMSO (Dimethyl sulfoxide), Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

PBS (Selbsterzeugnis) (1 l):

80 g NaCl, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2 g KCl, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

11,36 g Na_2HPO_4, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

2 g KH_2PO_4, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

dH_20 (auf 1 l)

Penicillin/Streptomycin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

Poly-D-Lysine, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, USA

Poly-L-Lysine, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, USA

RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

Trypsin-EDTA, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

FACS-Analyse

FACS Gerät BD LSRII, Becton Dickinson GmbH,Franklin Lakes, USA

FACS DiVa Software, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA

FlowJo, Version 7.5.3, Three Stars Inc., Ashland, USA

Ethanol, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Apoptose Kit 019K4006, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)

PI staining buffer:

50 µg/ml RNase A, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

0,1 % Triton X 0, 1%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

20 µg/ml Propidiumiodid, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Geräte für die Histologie

Digitales pH-Meter Hanna HI 8314, Hanna Instruments GmbH, Kehl, Deutschland

Digitalkamera Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Germany

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Germany

Filter 1 FITC 420-515 nm, Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Germany

Filter 2 FITC 500-590 nm, Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Germany

Filter 3 DAPI 380-420 nm, Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Germany

Software Axiovision R4.6., Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Germany

Grafiksoftware Sigmaplot 11, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Excel Microsoft Corporation, Redmond, USA

Verbrauchsmaterial für die Histologie

Deckgläser 24 x 50 mm, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig

Kanülen, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Super Frost® Plus Objektträger R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen

Chemikalien und Lösungen für Histologie

Aceton, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

BSA, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

Ethanol 70 % vergällt mit Ethylmethylketon, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Ethanol 96 % vergällt mit Ethylmethylketon, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Ethanol 99,6 %, Ethylalkohol, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Formaldehyd 2,5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Methanol, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

DAPI, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Dako Pen Dako Cytomation GmbH, Hamburg

Fluorescent Mounting Medium Dako Cytomation GmbH, Hamburg

Triton X-100 0,25 % und 0,5 %, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Antikörper für die Histologie

Primärer Antikörper

Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, monoclonal antibody, Cat. #05-636 Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts USA

Sekundärer Antikörper

PK-PF-488-AK-M1 goat-anti-mouse IgG, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany

Geräte für Biochemie (PCR)

Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

PCR Gerät Bio-Rad iQ5 Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Spectrophotometer Smart Spect plus Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Thermocycler PTC 100, MJ Research, Waltham, USA

Vortexer Heidolph, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Verbrauchsmaterialien für die Biochemie (PCR)

96-well Platte, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Safe-lock Tubes, farblos, 1,5 ml Eppendorf, Hamburg

Safe-lock Tubes, farblos, 2,0 ml Eppendorf, Hamburg

Zellschaber, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Lösungen für die Biochemie (PCR)

Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

iScript cDNA Synthesis Kit Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

RNA 6000 Nano Kit Agilent Technologies, Palo Alto, USA.

Rneasy mini Kit Quiagen GmbH Germany, Hilden, Germany

ß-Mercaptoethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Primer-Bezeichnung Primersequenz (5`- 3`)

Targetgene

CDKN1A(P21) mus (P21)	fwd TTGCACTCTGGTGTCTGAGC
	rev TCTGCGCTTGGAGTGATAGA
GADD45a mus (GADD45)	fwd GAAGACCGAAAGGATGGACA
	rev GCAGGCACAGTACCACGTTA
RRM2b mus (P53r2)	fwd CGGTTCGTCATCTTTCCAAT
	rev TTGTTCCAGTGAGGGAGGTC
BAX mus (BAX)	fwd TGTTTGCTGATGGCAACTTC
	rev GATCAGCTCGGGCACTTTAG
BCL2 mus (BCL2)	fwd AGTACCTGAACCGGCATCTG

	rev GCTGAGCAGGGTCTTCAGAG
Birc 5 mus (Survivin)	fwd CATCGCCACCTTCAAGAACT
	rev AAAACACTGGGCCAAATCAG
ERCC1 mus (ERCC)	fwd CCACAACCTCCATCCAGACT
	rev CTGCTGGGGATCTTTCACAT
Haushaltsgene	
ACTB mus (BAktin)	fwd GATCTGGCACCACACCTTCT
	rev GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
B2M mus	fwd GAGCCCAAGACCGTCTACTG
	rev GCTATTTCTTTCTGCGTGCAT
Gusb mus	fwd TCCAAGGGGTCAATAAGCAC
	rev GGGATAGTGGCTGGTACGAA

Alle Primer bezogen über Invitrogen (life technologies), Carlsbad, USA

Geräte für die Proteinanalyse

ChemiDoc XRS Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

PeQLab Semi dry blotter, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany

Spectrophotometer Dynatech Mrx Dynatech Laboratories, Massachusetts, USA

Trafo PeQLab poer 250, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany

Verbrauchsmaterial für die Proteinanalyse

21 G Kanülen, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Blottingpapier 1,2 mm dick Otto E. Kobe KG, Marburg, Deutschland

Gelladetips, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Membran Amersham, General Electric Corp., Fairfield, USA

Chemikalien und Lösungen für die Proteinanalyse

10 % Ammoniumpersulfat (APS):

100 mg APS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

1 ml dH_2O

10 %iges SDS :

10 g SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

100 ml dH_2O

5x Probenpuffer (Sample Buffer) (10 ml):

3,47 ml dH_2O

1,33 ml 0,5M Tris (pH 6,8), Acros Organics, New Jersey, USA

2,13 ml Glycerol, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2,13 ml 10 %iges SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

1,07 ml 1 % Bromphenolblau, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

+ 1 Teil ß-Mercaptoethanol (ß-ME), Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Blockpuffer:

5 g Milchpulver, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

100 ml TBST, Acros Organics, New Jersey, USA

Laufpuffer 10x (Lämmli) pH 8,3 (1l)

30,3 g Tris base, Acros Organics, New Jersey, USA

144,0 g Glycin, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

10,0 g SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

dH_2O (auf 1l)

NP-40 Lysepuffer (50 ml):

0,4383 g NaCl Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2,5 ml Tris pH 8,0 1M, Acros Organics, New Jersey, USA

500 µl Nonidet P40 (Endkonzentration: 1%), Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Page ruler plus prestained protein ladder SM1811, Fermentas, Maryland, USA

Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

PMSF ALX-270-184 Alexis Biochemicals, Läufelfingen, Switzerland

Protease-Inhibitor Cocktail Set 3, Calbiochem Nr. 539134, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Sammelgelpuffer (Stacking Gel Buffer): Tris HCl pH: 6,8 0,5M (100ml)

6,1 g Tris base, Acros Organics, New Jersey, USA

80 ml dH_2O

ca. 5 ml 37 %HCl (bis pH: 6,8), Merck KGaA, Darmstadt, Germany

dH_2O (auf 100 ml)

Solution A

200 ml 0,1M TRIS-HCl (pH 8,6), Acros Organics, New Jersey, USA

50 mg Luminol Sigma A4685, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

Solution B

11 mg para-Hydroxycoumarinsäure Sigma C9008, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

10 ml DMSO, Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

H_2O_2 (35 %), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

TBS 10 x:

12,1 g Tris base, Acros Organics, New Jersey, USA

43,8 g NaCl, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

400 ml dH_2O

ca. 7,5 ml 37 %HCL (bis pH 7,2-7,4), Merck KGaA, Darmstadt, Germany

dH_2O (auf 500 ml)

TBST 1x (Dilute and Wash Buffer):

100 ml TBS 10 x, Acros Organics, New Jersey, USA

900 ml dH_2O

1 ml Tween 20, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Transferpuffer pH: 8,3

3,03 g Tris base, Acros Organics, New Jersey, USA

14,4 g Glycin, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

200 ml Methanol, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

1 ml 10 %iges SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

dH_2O (auf 1 l)

Trenngelpuffer (Resolving Gel Buffer) : Tris HCL pH:8.8 1,5 M (500 ml)

90,89 g Tris base, Acros Organics, New Jersey, USA

450 ml dH_2O

ca. 4,5 ml 37 % HCl (bis pH 8,8), Merck KGaA, Darmstadt, Germany

dH_2O (auf 500 ml)

Tris pH 8,0 1M (500 ml):

60,57 g Tris base, Acros Organics, New Jersey, USA

450 ml dH_20

ca 18 ml 37 % HCL (bis pH 8,0), Merck KGaA, Darmstadt, Germany

dH_2O (auf 500 ml)

Antikörper für die Proteinanalyse

Primäre Antikörper

TP p53 (S15) rabbit Ab (#9284S) Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

14C10 Rabbit m Ab (GAPDH) Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

Sekundärer Antikörper

Goat anti-Mouse IgG HRP conjugate, Cat. #AP308P, Millipore
Goat anti-Rabbit IgG HRP conjugate, Cat. #AP132P, Millipore

Chromosomenbandanalyse

Carnoy`s:

Colcemid Karyomax (15210057) Invitrogen Corp., Carlsbad, USA

Eisessig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Essigsäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Färbelösung

Sörensen Puffer (38,8ml Lösung A+ 61,2 ml Lösung B pH 7,0):

Lösung A:

9,1g KH2PO4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

dH_2O (auf 1 l)

Lösung B:

11,8g Na2PO4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

dH_2O (auf 1 l)

Giemsa-Lösung Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ikaros software, Meta Systems Group Inc., Waltham, USA

KCl, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Methanol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Na Citrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Fabian Bernhard Eberle
Anschrift: Soldanellenweg 26, 87527 Sonthofen
Telefon: 0176/23347405
E-Mail: fabian_bernhard_eberle@hotmail.com
Geburtsdatum: 06.09.1980
Geburtsortort: Immenstadt i.A.
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulische Ausbildung

1987-1991 Grundschule West, Sonthofen-Rieden
1991-2000 Gymnasium Sonthofen, Sonthofen-Rieden
2000 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst

2000-2003 Reserveoffiziersausbildung bei 4./GebLogBtl 8, Füssen

Akademische Ausbildung

2003-2004 Studium der Sportwissenschaften (SpoÖk), TU München
2004-2010 Studium der Humanmedizin, Philipps Universität Marburg
2010 Erteilung der Approbation als Arzt

VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Arenz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Engenhart-Cabilic, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Grundmann, Grzeschik, Hertl, Hoffmann, Holst, Jaques, Klose, Kohlmann, König, Krieg, Kroll, Krones, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maier, Mandrek,Martin, Meier, Mennel, Moll, Mueller, Mutters, Neumüller, Oertel, Plant, Renz, Richter, Rißе, Röhm, Röper, Rose, Schäfer, Tibesku, Vogelmeier, Wagner,Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

Meine akademischen Lehrer in Siegen waren die Damen und Herren:

Braun, Burghard, Dölken, Franz, Gassmann, Gehrke, Grond, Grübener, Marczynska-Franczak, Richter, Schäfer, Schuster, Willecke, Weyand

Meine akademischen Lehrer in München waren die Damen und Herren:

Beickert, Bühren, Jakob, Kunz, Maier, Militz, Ruhl, Schreiner, Schwab, Wagner, Weidenhöfer, Weidinger, Weisser

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Engenhart-Cabilic für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der umfangreichen Laborausstattung die fachliche Betreuung und fordernde Förderung bei meiner medizinischen Ausbildung.

Frau Dr. rer. nat. Arenz danke ich ganz besonders für ihre umfassende Unterstützung und Betreuung, die vorbehaltlose Weitergabe ihres umfangreichen Fachwissens, ihre stets gute Laune und ihren Enthusiasmus der selbst Physiker besänftigen konnte und immer zu einer angenehmen und in besonderem Maße motivierenden Arbeitsathmosphäre beigetragen hat. Ohne ihre Supervision und ihren Beistand wäre dieses Promotionsvorhaben mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht so zügig zu seinem Abschluss gebracht worden. Frau Preising danke ich mindestens ebenso herzlich für die wichtige Hilfe bei der Anfertigung der Westernblots.

Dank an Frau PD Dr. Fritz, Frau Kornmann und Frau Sack für die stets gewährte, unkomplizierte Unterstützung, an Prof. Dr. Rose, Dr. Kamlah, Oana und Frau Dahlem für die Begleitung meiner ersten Schritte im Labor, die Bereitstellung der Tumorschnitte und das schöne Bild auf dem Laborbuch.

Mein ganz besonderer persönlicher Dank gilt meinen Eltern die mich zu jeder Zeit unterstützt haben, viel Geduld mit mir hatten und durch die Bereitstellung des Allgäuer Refugiums und ihre immer freundlichen Worte nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit -zu deren Durchsicht sie sich anschließend gezwungen sahen- beigetragen haben. A herzlichs Vergelts Gott!

Meiner lieben Sina bin ich ebenfalls in Dankbarkeit verbunden, ihre Tür stand mir während meines hessischen Nomadendaseins immer offen, durch ihr wunderbares Lachen und ihre Fröhlichkeit wurde mein Gemütszustand meist gebessert und aus dem Skiurlaub im Silbertal habe ich große Motivation für den Endspurt gezogen und der Bergkristall macht sich auch gut auf dem Schreibtisch. Dein Außen-Ski macht aber trotzdem was er will.

Steffen, Karo, Haitao und Janko danke ich für leckere Stationsfrühstücke und

die Freistellung zur Laborarbeit in meinem PJ, die mir viele Besuche bei dem lieben Supernovateam möglich machten. Danke für die Betreuung bei der Bestrahlung auch zu später Stunde an die Physiker Herr Neidel, Herr Ubrich und auch Herrn Böttcher für den Krieger.

Meinen Brüdern Maze und Wankl danke ich für ein stets offenes Ohr, diverse leckere Prinzregentenschnitten und Zusendung spannender fachfremder Literatur, beides war eine gute Ablenkung wenn´s a mol g´huret hot.

Dank auch meiner tollen WG-Familie, in der Bela, Ben, Wiek (merci bien ob der heldenhaften, frühmorgendlicher und von mir nie gutzumachenden Bergung von Klapprechner, USB-Stock und Zugfahrkarte. Lupo lebe hoch!) und Yasin immer für gute Stimmung, leckeres Essen, Backgammon, Bier und viele gemeinsame Ausflüge zu haben waren. Schön, dass ich mit euch leben und studieren konnte. Auf euch ein kräftiges MARGARETE !!

Den liebenswürdigen Gießenern Nicole, Maddin und Karin danke ich für ihre große Gastfreundschaft, Nebelmaschine, Discokugel, Dusche und kiloweise Leberkäs und Braten.

Mein Dank der Firma Söldner Haustechnik GmbH für die schönen Probeausdrucke zur Rechtschreibprüfung.

Herrn Max Mustermann danke ich zu guter Letzt für unvergesslichen Ruhm und lebenslangen Spott.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Strahlenbiologische Charakterisierung des murinen Lewis-Lung-Modells“ in der Klinik für Strahlentherapie unter Leitung von Frau Prof. Dr. Engenhart-Cabilic mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Arenz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde/wird in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht.

_____

Ort, Datum, Unterschrift

EIGENE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

02/2011

Symposium experimentelle Strahlentherapie und klinischeStrahlenbiologie:

Birgit Bischoff, Andrea Arenz, Fabian Eberle, Rajkumar Savai, Claudia Fournier, Gisela Taucher-Scholz, Jörg Hänze, Rita Engenhart-Cabillic und Florentine Kamlah

Strahlentherapeutische Charakterisierung von murinen Lewis-Lung-Carcinoma (LLC1)-Zellen nach Photonen- und Partikelbestrahlung

06/2011

DEGRO-Kongress 2011 Wiesbaden:

B. Bischoff (Marburg), A. Arenz, F. Eberle, R. Savai, C. Fournier, G.Taucher-Scholz, R. Engenhart-Cabillic, F. Kamlah

Strahlentherapeutische Charakterisierung von murinen Lewis-Lung-Carcinoma (LLC1)-Zellen nach Photonen- und Partikelbestrahlung