

Von der Fachhochschule Darmstadt
Fachbereich Chemie- und Biotechnologie
im
Studiengang Biotechnologie
genehmigte
Diplomarbeit
von
Daniela Becker

**Untersuchungen zum strahleninduzierten
Bystandereffekt in normalen humanen
Fibroblasten**

Diese Diplomarbeit wurde in der Zeit von Juni bis Dezember 2005
in der Abteilung Biophysik der
Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt
angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	5
Einleitung	6
1 Physikalische Eigenschaften ionisierender Strahlung	6
2 Grundlagen der Strahlenbiologie.....	9
2.1 Fibroblasten des Bindegewebes	10
2.2 Keratinocyten des Epithelgewebes.....	11
2.3 Regulationsmechanismen des Zellzyklus und Verzögerungen nach Bestrahlung.....	12
3 Bystandereffekte.....	14
4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
Material und Methoden	17
1 Zellen und Kultivierungsmethoden	17
1.1 Verwendete Zellen.....	17
1.2 Verfahren zur Zellkultivierung.....	17
1.2.1 Kultivierungsbedingungen.....	17
1.2.2 Subkultivierungen.....	18
1.2.3 Langzeitlagerung der Zellen	18
1.2.4 Synchronisation der Fibroblasten	19
1.2.5 Altersbestimmung von Fibroblasten.....	19
2 Bestrahlungsexperimente	21
2.1 Röntgenbestrahlung.....	21
2.2 Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen	21
2.3 Cokultivierung von bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten	23
3 Protein-Nachweismethoden.....	25
3.1 Gelelektrophorese und Western-Blot	25
3.2 Western-Quantifizierung	26
3.3 Immunodetektion mittels Durchflusszytometrie	28
4 Zellzyklusanalysen nach der Höchst-BrdU-Quenching-Methode.....	30
5 Überleben von Fibroblasten nach Kultivierung mit dem Zellkulturüberstand von bestrahlten Keratinocyten.....	31
6 Nachweis von intrazellulären Radikalen mittels Dichlorofluorescein (DCF-) Assay.....	33
7 Statistische Analyse der Daten	35

Ergebnisse	36
1 Bystandereffekte nach direkter Bestrahlung von konfluenten Monolayer-Kulturen	36
1.1 Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	36
1.1.1 Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21	37
1.1.2 Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung	40
1.2 Bestrahlung mit Uranionen	43
1.2.1 Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21	43
2 Lösliche Faktoren als Vermittler von Bystandereffekten in Fibroblasten	45
2.1 p21-Expression in asynchronen Bystanderzellen nach Röntgenstrahlung	45
2.2 p21-Expression in konfluenten Bystanderzellen nach Röntgenstrahlung	47
2.3 p21-Expression in konfluenten Bystanderzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	48
3 Überleben von unbestrahlten Fibroblasten nach Kultivierung mit dem Zellkulturüberstand von mit Röntgenbestrahlten Keratinozyten	49
4 Strahleninduzierte Bildung von intrazellulären Radikalen	51
Diskussion	57
1 Zellzykluseffekte in konfluenten Bystanderzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen	58
Vermittlung der	62
2 Expression von Zellzyklusregulatoren in Bystanderzellen über lösliche Faktoren	62
3 Einfluss löslicher Faktoren auf das klonogene Überleben von Fibroblasten	63
4 Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies nach Bestrahlung	64
Literaturverzeichnis	67
Abkürzungsverzeichnis	71
Anhang	72
1 Verwendete Materialien	72
1.1 Chemikalien	72
1.2 Zellkulturmedien und Lösungen	73
1.2.1 Zellkultur	73
1.2.2 Biochemische Methoden	74
1.3 Sonstige Materialien	77
1.4 Geräte	78
Danksagung	79

Zusammenfassung

Seit den frühen 50er Jahren werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* biologische Effekte in unbestrahlten Zellen beschrieben, die sich in der Nachbarschaft zu bestrahlten Zellen befinden. Diese „Bystandereffekte“ sind im Rahmen des vermehrten Einsatzes von Kohlenstoffionen in der Tumorthherapie von Interesse, um die Auswirkung der Strahlen in den Randbereichen zum bestrahlten Gewebe abschätzen zu können. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Beurteilung, in welchem Maße Bystandereffekte durch dicht-ionisierende Strahlung (Kohlenstoff- und Uranionen) hervorgerufen werden können. Als Modellsystem wurden Fibroblasten eingesetzt, die als Zellen des Bindegewebes von jeder Bestrahlung betroffen sind. Als biologischer Endpunkt wurde die Expression von Zellzyklusregulatoren (p53, p21) untersucht, die nach Bestrahlung vermehrt gebildet werden und eine Verzögerung im Zellzyklus einleiten, welche die Reparatur des DNA-Schadens begünstigt. Die Induktion dieser Proteine in Bystanderzellen und die daraus resultierende Zellzyklusverzögerung sind bereits für α -Teilchen publiziert. Ein weiteres Ziel bestand darin, die Relevanz der möglichen Mechanismen von Bystandereffekten speziell nach dicht-ionisierender Strahlung zu untersuchen. Daher wurde in dieser Diplomarbeit nach direkter Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen unter Bedingungen, die einen direkten Zellkontakt zwischen bestrahlten und Bystanderzellen ermöglichen, eine p21-Induktion in Bystanderzellen beobachtet. Die Kommunikation über lösliche Faktoren (Cytokine, ROS) konnte nicht ausgeschlossen werden. Die Gesamtmenge des Proteins p53 blieb in den Bystanderzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen unverändert, jedoch wurde ein transienter Zellzyklusarrest in der ersten G₁-Phase beobachtet. In weiteren Versuchen wurde durch die räumliche Trennung von bestrahlten (Donorzellen) und unbestrahlten Zellpopulationen (Akzeptorzellen) und anschließender gemeinsamer Cokultivierung die Kommunikation zwischen den Zellpopulationen auf lösliche Faktoren beschränkt, die durch das Medium diffundieren und eine permeable Membran passieren konnten. Unter diesen Bedingungen wurde eine Induktion von p21 in den unbestrahlten Akzeptorzellen nur nach Röntgenbestrahlung, nicht aber nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen beobachtet. Da Keratinozyten durch Produktion von löslichen Faktoren das Zellwachstum anderer Zelltypen beeinflussen können, wurde in diesem Zusammenhang durch einmaligen Transfer von Medium, mit dem vorher röntgenbestrahlte Keratinozyten kultiviert worden waren, keine Reduktion des klonogenen Überlebens in unbestrahlten Fibroblasten beobachtet. Außerdem wurde die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die als mögliche Auslöser einer zellulären Antwort in Bystanderzellen diskutiert werden, direkt nach Röntgenbestrahlung, jedoch weder direkt nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- noch mit Uranionen nachgewiesen. Zu späteren Zeiten trat eine erhöhte intrazelluläre ROS-Bildung immer dann auf, wenn auch eine p21-Induktion sichtbar war. In unbestrahlten Akzeptorzellen konnte keine erhöhte ROS-Bildung festgestellt werden, wenn eine Cokultivierung mit Zellen erfolgte, die mit Kohlenstoff- oder mit Uranionen bestrahlt wurden.

Abstract

Biological effects in unirradiated cells, which are located near to irradiated cells, have already been reported *in vivo* and *in vitro* since the early 1950s. These so-called “Bystander responses” are of special interest in the context of the increased use of carbon ions in radiotherapy, especially to explore a potential bystander effect at the boarder line of the exposed tumor. One goal of this diploma work was to find out to what extent bystander responses are induced by densely-ionizing radiation such as carbon und uranium ions. Our studies were focused on human fibroblasts, because they are involved in every radiation exposure. We analyzed the expression of the cell-cycle-regulators p53 and p21, which are expressed at higher level after radiation and induce a cell-cycle-delay giving the cell time for repair of the DNA-damage. The observed changes in the protein expression and the occurrence of a transient cell-cycle-delay have already been reported for α -particles.

A second goal of this study was an improved understanding of the mechanisms underlying the effects in bystander cells, especially following densely-ionising exposure. In this study confluent monolayers were used, allowing communication either by direct cell contact (via gap junctions) or by soluble factors. We found an induction of p21 in bystander cells which were exposed to low fluences of carbon as well as uranium ions. The protein level of p53 did not change in bystander cells after irradiation with carbon ions. Under the same conditions we found in bystander cells a transient cell-cycle-delay in the first G₁-phase after irradiation with carbon ions. In further experiments we separated the irradiated (donor cells) and the non-irradiated cells (acceptor cells) with a special coculture system and restricted the communication between the cells on soluble factors. The soluble factors are able to pass a permeable membrane and can travel through the medium. Under these conditions, we detected a p21-induction in the unirradiated acceptor cells only after x-rays, but not after irradiation with carbon ions.

Epidermal keratinocytes are known to produce soluble factors *in vivo* and *in vitro*, which modulate the growth of other cell types within the epidermis and dermis. Coming from this knowledge, we transferred the medium from irradiated keratinocytes to non-irradiated fibroblasts, but we did not observe any reduction of the clonogenic survival in the fibroblast cells. Furthermore, we measured the formation of reactive oxygen species (ROS), which may be involved in the cellular response of bystander cells. We observed an increased formation of intracellular ROS immediately after exposure to x-rays, but not to carbon and uranium ions. We did not found in unirradiated acceptor cells an increasing formation of intracellular ROS after coculturing with cells, which were exposed to carbon and uranium ions.

Einleitung

1 Physikalische Eigenschaften ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlenarten geben bei der Wechselwirkung mit Materie Energie ab. Sie sind in der Lage, Elektronen aus den Atomen der Materie, die sie durchdringen, herauszulösen. Die deponierte Energie (ΔE) pro Masseneinheit (Δm) wird als Dosis [Einheit Gray = Gy] angegeben (siehe Formel 1). Die Dosis ist eine wichtige physikalische Größe, da biologische Effekte von ionisierender Strahlung häufig als Funktion der Dosis beschrieben werden können.

$$D[\text{Gy}] = \frac{\Delta E [\text{J}]}{\Delta m [\text{kg}]} \quad (1)$$

In biologischen Systemen werden Schäden durch ionisierende Strahlung auf direkte und indirekte Weise induziert. Eine direkte Strahleneinwirkung liegt dann vor, wenn es durch Ionisationsereignisse im Zielmolekül selbst (z.B. der DNA im Zellkern) zu Schäden kommt. Wenn es sich um ein biologisches Target, z.B. eine Zelle handelt, die hauptsächlich aus Wasser besteht, ist eine Wechselwirkung zwischen der Strahlung und den Wassermolekülen wahrscheinlich. Es kommt zur Ionisation von Wassermolekülen, der sogenannten Radiolyse, die eine Bildung von freien Elektronen und radikalischen Verbindungen zur Folge hat. Die entstehenden Radikale können nach Diffusion mit den Zielmolekülen weiterreagieren und so als indirekte Strahlenwirkung Schäden induzieren [Herrmann & Baumann, 1997].

Da die Energieabgabe und die Ionisationsereignisse für die verschiedenen Strahlenarten unterschiedlich sind, unterscheidet man zwischen dünn-ionisierender Strahlung (Elektronen, elektromagnetische Strahlung wie Röntgen- und γ -Strahlen) und dicht-ionisierender Strahlung (nieder-energetische Protonen, α -Partikel, Neutronen und schwere Ionen). Dünn-ionisierende Strahlen deponieren ihre Energie durch Photo- oder Compton-Prozesse in einer gleichmäßigen räumlichen Verteilung in Bezug auf den Zellkern (Mikrometer Bereich). Dicht-ionisierende Strahlen hingegen wechselwirken durch Coulomb-Kräfte, vor allem mit den Elektronen der Targetmoleküle und erzeugen längs ihrer Flugbahn eine Spur von dicht liegenden Ionisationsereignissen und Elektronen. Bei dicht-ionisierender Strahlung spielt der direkte Effekt eine größere Rolle als bei dünn-ionisierender Strahlung, bei der 2/3 der Ionisationsereignisse auf dem indirekten Effekt beruhen [Hall, 1994].

Bei der Interaktion von schweren Ionen mit der Targetmaterie verlieren die Ionen entlang ihrer Flugbahn kontinuierlich Energie, bis sie stoppen. Dabei werden Sekundärelektronen (δ -Elektronen)

mit unterschiedlich hoher kinetischer Energie erzeugt. Das Verhältnis von lokal abgegebener Energie (dE) und Wegstreckenelement (ds) der Ionen wird als linearer Energietransfer (LET) bezeichnet (siehe Formel 2).

$$LET = \frac{dE}{ds} \left[\frac{keV}{\mu m} \right] \quad (2)$$

Aus dem LET und der Energie der Ionen ergibt sich die lokale Ionisationsdichte in der Spur. Je geringer die Energie der Ionen und je höher der LET, umso größer ist die Schadensdichte im Zielmolekül. Dies ist aus der Simulation von Ionisationsereignissen in Abbildung 1 ersichtlich. Gezeigt sind die Sekundärelektronen entlang der Flugbahn von Protonen (niedriger LET) und Kohlenstoffionen (mittlerer LET) bei gleicher Energie beider Teilchen (1 MeV/u). Außerdem ist die DNA-Helix als Beispiel für ein Zielmolekül mit abgebildet.

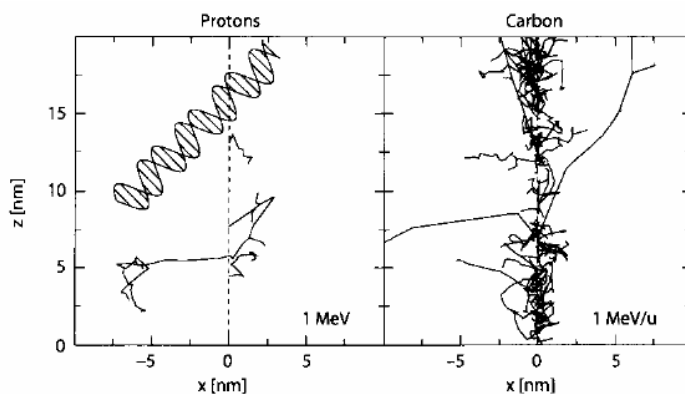


Abbildung 1: Simulation der Ionisationsereignisse entlang einer Teilchenspur von 1 MeV/u Protonen und 1 MeV/u Kohlenstoffionen. Zur Demonstration der Reichweite der Sekundärelektronen sind exemplarisch die Dimensionen der DNA eingezeichnet [Krämer & Kraft, 1994].

Das Produkt aus dem LET (L_{Δ}), der Flächenbelegung (Φ) und der Dichte (ρ) des bestrahlten Materials ergibt die Dosis (D), die bei der Bestrahlung mit Teilchen absorbiert wird (siehe Formel 3).

$$D[Gy] = 1,6 \cdot 10^{-9} \cdot L_{\Delta} \left[\frac{keV}{\mu m} \right] \cdot \phi \left[\frac{1}{cm^2} \right] \cdot \rho^{-1} \left[\frac{cm^3}{g} \right] \quad (3)$$

Die bei der Interaktion von Strahlung und Materie abgegebene Energie (Dosis) kann entlang der Reichweite gemessen werden. Man erhält Tiefendosisprofile und kann so verschiedene Strahlenarten miteinander vergleichen (siehe Abbildung 2). Bei Photonenstrahlung wird die maximale Dosis am Anfang der Wegstrecke deponiert und ist auf die Vorwärtstreuung der Elektronen zurückzuführen. Mit zunehmender Energie liegt das Maximum tiefer. Die deponierte Dosis fällt dabei exponentiell ab.

Bei Ionenstrahlen (hier gezeigt für Kohlenstoffionen) wird die Geschwindigkeit durch die Interaktionen mit Atomen und Elektronen des Targetmaterials entlang der Wegstrecke reduziert, die Energieabgabe und die Ionisationsdichte sind aber zunächst gering (siehe Abbildung 2).

Das Maximum des Energieverlustes befindet sich am Ende der Wegstrecke, dem so genannten „Bragg-Peak“. Nach dem Bragg-Peak fällt die Dosis steil ab. Das im Vergleich zu Photonenbestrahlungen invertierte Dosisprofil von Protonen und schweren Ionen (Kohlenstoff) wird in der Tumortherapie ausgenutzt. Durch die präzise Einstellung der Eindringtiefe im Gewebe über die Anfangsenergie der Ionen können Tumorzellen mit Bragg-Peak-Energien am Ende der Wegstrecke effektiver abgetötet werden, unter gleichzeitig niedriger Belastung des gesunden Gewebes zu Beginn der Wegstrecke [Kraft, 1997; Kraft *et al.*, 1997].

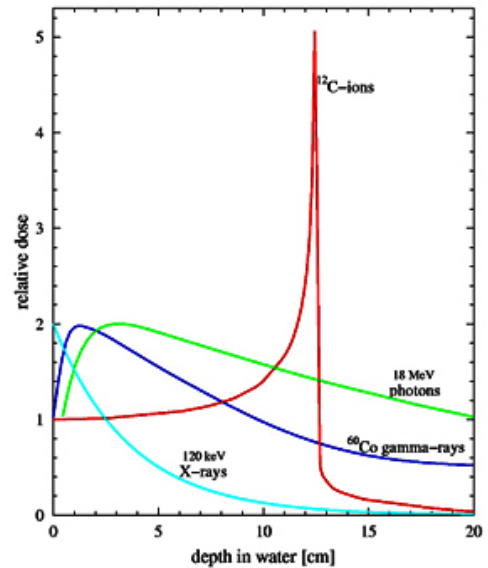


Abbildung 2: Tiefendosisprofile von Kohlenstoffionen im Vergleich zu Photonen

Der vermehrte Einsatz von schweren Ionen in der Strahlentherapie ist ein Grund für die weitere Erforschung der Wirkungsmechanismen von schweren Ionen. Außerdem ist durch die Ausweitung der Weltraumforschung, in der bemannte Flüge über Monate inzwischen Routine geworden sind, das Interesse an den gesundheitlichen Risiken für Astronauten stark angestiegen. Bei der Risikoabschätzung spielen die Wirkung von Protonen und schweren Ionen, vor allem von Eisenionen als Bestandteil der kosmischen Strahlung, eine große Rolle [Schimmerling *et al.*, 2003; Cucinotta *et al.*, 2001]. Für den Strahlenschutz wiederum hat die Wirkung dicht-ionisierender Strahlung durch den Rückbau von Kernkraftwerken erneut aktuelle Bedeutung bekommen. Das Verständnis der besonderen Wirkung von Niedrigdosisbestrahlung und Bystandereffekten ist wichtig für eine genaue Einschätzung von Strahlenrisiken. Bisher werden aus Dosis-Effekt-Kurven, die nur den Hochdosisbereich abdecken, Werte für den Niedrig-Dosis-Bereich extrapoliert [Bauchinger, 2001; Wolff, 1991].

2 Grundlagen der Strahlenbiologie

Ein Vergleich der biologischen Effekte von unterschiedlichen Strahlenqualitäten wird durch die Einführung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE) möglich. Die RBE ist definiert als das Verhältnis zwischen der Dosis von dünn- und dicht-ionisierender Strahlung, welches benötigt wird, um den gleichen biologischen Effekt zu erzielen [Überblick in Krämer & Kraft, 1994].

Das klassische Kriterium zur Beurteilung einer Schädigung durch Strahleneinwirkung ist die Messung der Zellinaktivierung, d.h. des Verlustes der Koloniebildungsfähigkeit [Puck & Marcus, 1955]. Um die Strahlenwirkung von Teilchenstrahlung zu beschreiben, werden die Inaktivierungsquerschnitte aus dem Kurvenverlauf der halblogarithmisch aufgetragenen Dosis-Effekt-Kurve bestimmt [Kraft, 1987]. Ausgehend von den Versuchen von Munro [1970] wird als das strahlensensitive Target der Zelle der Zellkern mit der gesamten genetischen Information angesehen. Daher wird die biologische Effektivität eines einzelnen Teilchendurchgangs durch den Zellkern bestimmt. Dies erfolgt über den Wirkungsquerschnitt, der zum geometrischen Querschnitt (z.B. Zellkernfläche bei Fibroblasten) ins Verhältnis gesetzt wird. Dieses Verhältnis entspricht gerade der Wahrscheinlichkeit, dass ein Teilchendurchgang zur Inaktivierung der Zelle führt. Um die mittlere Trefferzahl (N) der einzelnen Zellkerne zu bestimmen, kann diese über den geometrischen Wirkungsquerschnitt (σ_{geo}) und die Fluenz (F) berechnet werden (siehe Formel 4).

$$N = \sigma_{geo} \cdot F \quad (4)$$

Für die Einschätzung der biologischen Wirkung von niedrigen Fluenzen / Dosen von Teilchenstrahlung ist die Ermittlung des Anteils ungetroffener Zellen (P_0) von Bedeutung, deren Berechnung der Poisson-Verteilung folgt:

$$P_0 = e^{-N} \quad (5)$$

Schädigungen der DNA, insbesondere durch Brüche des DNA-Doppelstranges, sind schwerwiegende, häufig letale Ereignisse für die betroffene Zelle. Daher hat die Untersuchung von DNA-Reparaturmechanismen und Signaltransduktion innerhalb der Zellen in der Strahlenbiologie eine zentrale Bedeutung. Signaltransduktion innerhalb der Zellen schließt Zellzyklusregulation nach Bestrahlung mit ein. Zellzyklusverzögerungen bieten der Zelle die Möglichkeit zur Reparatur von DNA-Schäden, die eine notwendige Voraussetzung für den Erhalt der genetischen Integrität sind. Daher sind die an der Zellzyklusregulation beteiligten Proteine von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Mechanismen der Strahlenwirkung [Mc Donald III & el-Deiry, 2001; Qin & Li, 2003].

2.1 Fibroblasten des Bindegewebes

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fragestellungen hauptsächlich an humanen Fibroblasten untersucht. Fibroblasten sind ein wichtiges Modellsystem, weil sie als Zellen des Bindegewebes von jeder Bestrahlung betroffen sind. Fibroblasten des menschlichen Organismus gelten in der Strahlentherapie vor allem als Mediatoren von unerwünschten Spätfolgen (Fibrose), die während und nach Bestrahlung auf Interaktionen zwischen den Zellen beruhen [Diegelmann 1997; Martin *et al.*, 1993]. Die für Fibroblasten typische zelluläre Antwort auf Bestrahlung besteht darin, dass nur ein geringer Anteil der Fibroblasten Apoptose zeigt und dass sie in einen frühzeitigen Zellzyklusarrest übergehen [Di Leonardo *et al.*, 1994], dem sich wiederum eine frühzeitige Differenzierung [Rodemann *et al.*, 1991; Fournier *et al.*, 2001] anschließen kann. Da zwischen Keratinozyten und Fibroblasten strahlungsinduzierte Wechselwirkungen beobachtet werden [Mothersill & Seymour, 1997; Maas-Szabowski *et al.*, 1999], wurde in einem Überlebensexperiment auch die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Zellsystemen untersucht.

Fibroblasten sind mesodermalen Ursprungs und bilden den Hauptbestandteil der Bindegewebszellen bei Haut, Knorpel, Sehnen, Bändern und Blutgefäßen. Sie sind vereinzelt an die Komponenten der extrazellulären Matrix gebunden, die den größten Teil des Bindegewebes ausmacht, reich an Kollagen ist und Schutz vor mechanischem Stress bietet. Fibroblasten synthetisieren Komponenten der Interzellularsubstanz. Sie besitzen eine hohe Aktivität im wachsenden Bindegewebe. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* weisen Fibroblasten eine endliche Lebensdauer auf. Fibroblasten sind adhärent wachsende Zellen, die unter Kulturbedingungen ein einschichtiges Wachstum (Monolayer) auf der Wachstumsunterlage aufzeigen (siehe Abbildung 3). Als multipotente Zellen kann eine Differenzierung der Fibroblasten zu anderen Zelltypen mit spezieller Funktion erfolgen. Die Klassifizierung erfolgt nach dem Stadium der Differenzierung anhand morphologischer und biochemischer Unterschiede [Übersicht in Alberts *et al.*, 1994].

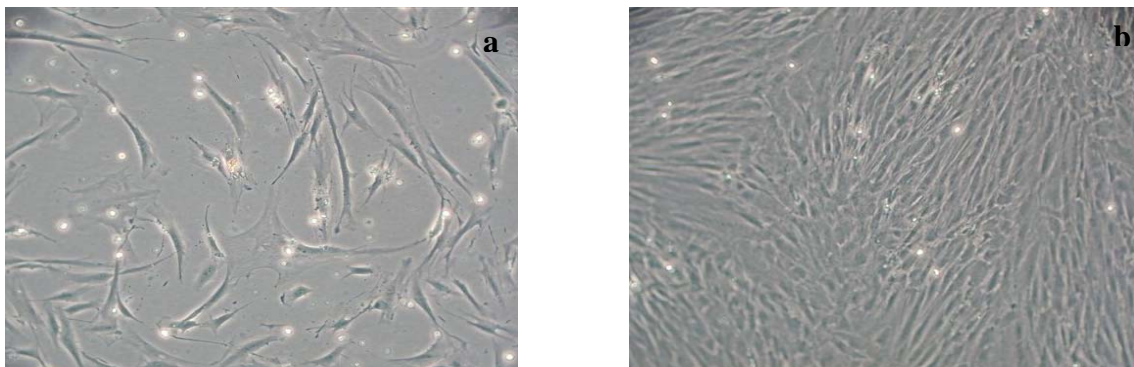


Abbildung 3: Wachstum von Fibroblasten der Zelllinie AG01522C (a) subkonfluenten und (b) konfluenten Monolayer.

2.2 Keratinozyten des Epithelgewebes

In der Epithelschicht der Haut stellen Keratinozyten die häufigste Zellart dar und sind fest miteinander verbunden. Das Wachstum von Zellen der Keratinozytenlinie HaCaT [Boukamp *et al.*, 1988] als konfluenter Monolayer ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Keratinozyten sind an die Extrazellulärmatrix gebunden, welche aus einer dünnen Schicht, der Basallamina besteht. Die Hauptfunktion der Keratinozyten besteht in der Produktion von Keratinfilamenten, die sich als Intermediärfilamentsystem durch das gesamte Zytoplasma der Zelle spannen und somit Schutz vor mechanischem Stress bieten [Übersicht in Alberts *et al.*, 1999]. Keratinozyten produzieren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Reihe von löslichen Proteinen, die sowohl ihr eigenes als auch das Zellwachstum anderer Zelltypen in der Epidermis und der Dermis beeinflussen [Luger & Schwarz, 1990,1996; Schröder, 1995].

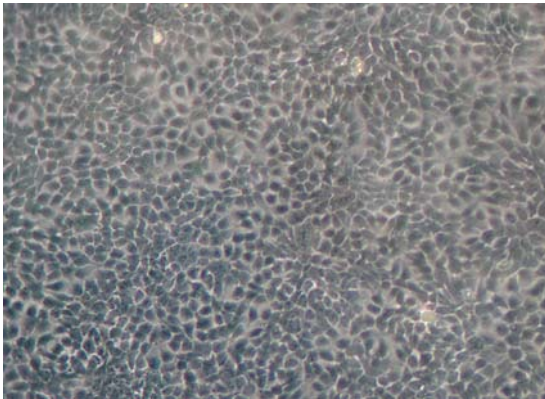


Abbildung 4: Keratinozyten der Zelllinie HaCaT als konfluenter Monolayer

2.3 Regulationsmechanismen des Zellzyklus und Verzögerungen nach Bestrahlung

In Organismen kommt es ständig zu Zellteilungen. Die Entwicklung einer einzelnen Zelle nach erfolgter Zellteilung bis zur nächsten Teilung wird als Zellzyklus bezeichnet. Im Verlauf des Zellzyklus wird eine Kopie der genetischen Information der Ursprungszelle für die Weitergabe an die nächste Generation vorbereitet. Der eukaryontische Zellzyklus wird in vier Phasen unterteilt (siehe Abbildung 5). Zu Beginn des Zellzyklus werden in der G₁-Phase Wachstumsfaktoren und Proteine synthetisiert, welche für die Einleitung der Synthese-Phase (S-Phase) erforderlich sind. Am „G₁-Kontrollpunkt“ wird die Größe der Zelle und deren Ernährungsbedingungen im Hinblick auf die bevorstehende Teilung überprüft.

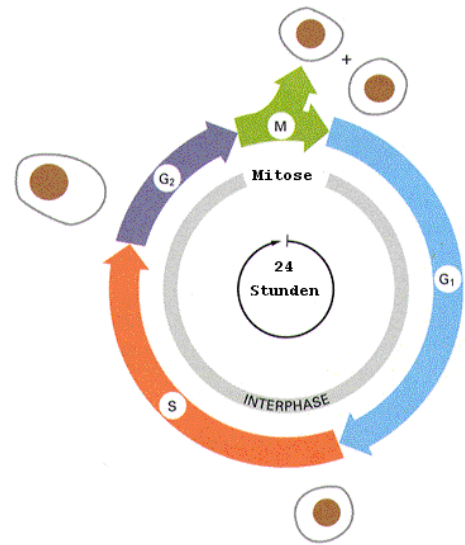


Abbildung 5: Die vier aufeinander folgenden Phasen im Zellzyklus (hier 24h) eines Eukaryonten. Während der Interphase wächst die Zelle kontinuierlich. Die DNA-Replikation ist auf einen Teil der Interphase, die S-Phase, beschränkt. In der M-Phase hört das Wachstum auf; der Kern teilt sich zuerst und dann die Zelle [Abbildung aus Alberts *et al.*, 1994].

Ungünstige Wachstumsbedingungen können Zellen veranlassen, in eine verlängerte G₁-Phase einzutreten, die sie durch Stimulation wieder verlassen können. Die Einleitung der S-Phase und die damit verbundene Reduplikation des genetischen Materials (Synthese von DNA) setzt eine Aktivierung der Zelle durch extrazelluläre Faktoren voraus. Nach abgeschlossener DNA-Replikation geht die Zelle in die G₂-Phase über, die der Vorbereitung der Mitose dient. Das erfolgreiche Passieren eines „G₂-Kontrollpunktes“ ist die Bedingung für die Einleitung der Zellteilung. An diesem Kontrollpunkt wird die korrekte Verdopplung aller Chromosomen überprüft und die nach der letzten Mitose begonnene Interphase endet mit Beginn der nächsten Mitose [Übersicht in Alberts *et al.*, 1994].

Zur Gewährleistung des korrekten Ablaufs des Zellzyklus verfügt die Zelle über ein Kontrollsystem. Cycline und Proteinkinasen sind Untereinheiten von Enzymkomplexen, die den Fortgang des Zellzyklus positiv regulieren. Cycline sind in diesen Komplexen die regulatorischen und die Proteinkinasen die katalytischen Untereinheiten. Die Proteinkinasen werden durch die Bindung der Cycline aktiviert. Sowohl die Proteinkinasen als auch die bereits gebildeten Komplexe können durch Proteinkinase-Inhibitoren gehemmt werden. Die Cyclin-abhängigen Kinasen begleiten die Zelle im Zellzyklus mit unterschiedlicher Aktivität [Sherr, 1996].

Als Folge einer DNA-Schädigung nach Bestrahlung kann es zu Zellzyklusverzögerungen in fast allen Phasen des Zellzyklus (außer in der M-Phase), aber insbesondere in der G₁- oder der G₂-Phase kommen. Diese Verzögerung („Arrest“) begünstigt die Reparatur der DNA. Ein Schlüsselprotein für die Einleitung des strahleninduzierten G₁-Arrests ist der Tumorsuppressor p53 [Meek, 2004]. Zur Einleitung des G₁-Arrests wird TP53 (p53) durch Phosphorylierung stabilisiert, akkumuliert dadurch und wird in den Zellkern transportiert (Übersicht siehe Abbildung 6). Dort wirkt es als Transkriptionsfaktor für andere Gene, unter anderem für den Proteinkinase-Inhibitor CDKN1A (p21). Das so vermehrt exprimierte p21-Protein bindet an alle Cyclin-Cdk-Komplexe mit unterschiedlichen Affinitäten [Carr, 2000; Harper *et al.*, 1993]. Die höchste Affinität hat es zu den Komplexen, die für den Fortgang der G₁-Phase und den Übergang in die S-Phase essentiell sind. Bei erhöhter Expression von p21 wird somit die Zelle bevorzugt in der G₁-Phase zurückgehalten [Übersicht in O'Reilly, 2005]. Eine Induktion von p21 und der damit verbundene Zellzyklusarrest in der G₁-Phase des Zellzyklus kann auch unabhängig von p53 eintreten. Insbesondere in Zusammenhang mit oxidativen Vorgängen in der Zelle werden alternative Mechanismen diskutiert. Dies zeigt die große Bedeutung von p21 für die Aufrechterhaltung der Zellzykluskontrolle [Russo *et al.*, 1995; Übersicht in O'Reilly 2005].

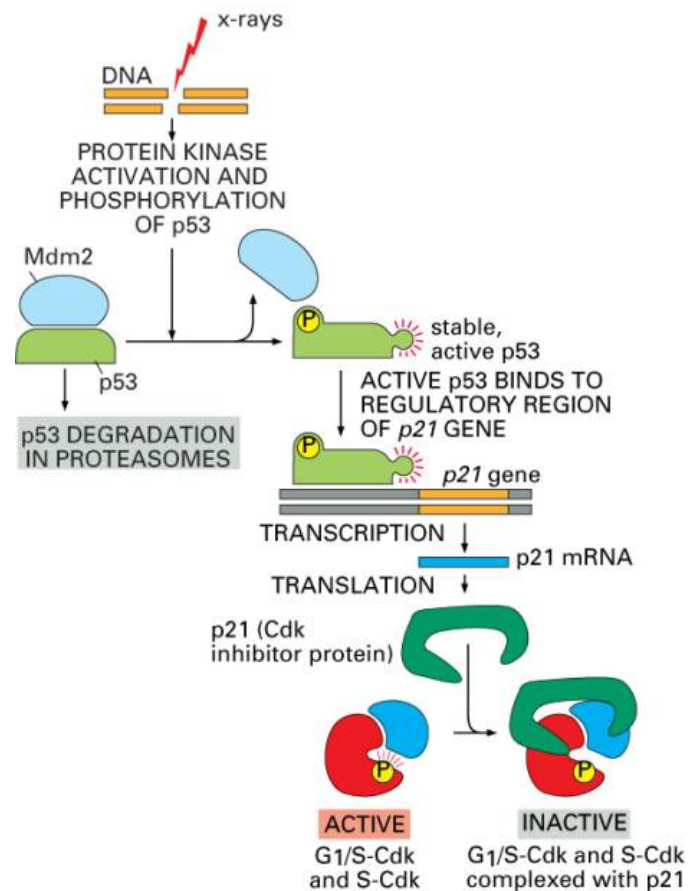


Abbildung 6: Zellzyklusarrest in der G₁-Phase vermittelt über die Induzierung von p21 durch den Transkriptionsfaktor p53 [aus Alberts *et al.*, 1994].

3 Bystandereffekte

Lange Zeit bestand in der Strahlenbiologie in Bezug auf die Strahlenempfindlichkeit von Zellsystemen die Auffassung, dass die DNA-Moleküle im Zellkern das kritische Ziel für die Wirkung ionisierender Strahlung sind [Munro, 1970] und biologische Effekte aufgrund von unreparierten DNA-Schäden auftreten. In den letzten Jahren wurde dies jedoch in Frage gestellt, da biologische Effekte, die normalerweise in Zusammenhang mit direkter Bestrahlung von Zellen beobachtet wurden, in unbestrahlten Zellen auftraten, wenn diese sich in Kontakt zu den bestrahlten Zellen befanden. Diese strahleninduzierten Effekte in unbestrahlten Zellen in der Nachbarschaft von bestrahlten Zellen werden als Bystandereffekte bezeichnet. Inzwischen schließen die publizierten Daten viele biologische Effekte ein, die in Bystanderzellen beobachtet wurden. Diese Effekte beinhalten Chromosomenveränderungen (Schwester-Chromatid-Austausche, Chromosomenaberrationen), die Induktion von Genmutationen, die genomische Instabilität, die Mikrokernbildung, veränderte Zellzyklusregulationen und den Zelltod [Prise *et al.*, 2005; Coates *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2003].

Von Bystandereffekten *in vivo* wurde schon seit den frühen 50er Jahren durch das Auftreten von Effekten in unbestrahlten Geweben nach lokalisierter Strahlentherapie („abscopal effects“) berichtet [Mole, 1953] und durch spätere Beobachtungen ergänzt [Lorimore *et al.*, 2005; Prise *et al.*, 2005]. Die Erforschung von Bystandereffekten in unbestrahlten Geweben ist insbesondere im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung von Strahlung von Interesse, um die Risiken der Strahlentherapie abzuschätzen. Bystandereffekte wurden *in vitro* für mehrere Endpunkte gezeigt.

Obwohl die Regulationsmechanismen von strahleninduzierten Bystandereffekten noch nicht erklärt werden können, gibt es Hinweise, dass sie interzellulär durch lösliche extrazelluläre Faktoren (z. B. Cytokine) oder über direkte Zell-Zell-Kommunikation durch gap-junctions vermittelt werden [Übersicht Azzam, 2004]. In Bezug auf die intrazelluläre Signalvermittlung gibt es Hinweise, dass diese über Sauerstoffradikale erfolgt, die im Rahmen eines durch Stress erhöhten oxidativen Stoffwechsels der Zelle, insbesondere bei der oxidativen Phosphorylierung, entstehen [Spitz *et al.*, 2004]. Dies ergibt sich vor allem aus Daten, die eine Unterdrückung von Bystandereffekten durch Antioxidantien oder Superoxidanionradikal-Fängern zeigen [Azzam *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 1997].

Ein im Rahmen dieser Arbeit untersuchter Endpunkt für Ionenstrahlung ist der Zellzyklusarrest und dessen Regulation über die Genexpression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21 in

Bystanderzellen. Dazu gibt es bereits vergleichbare Daten für Röntgenstrahlung [Yang *et al.*, 2005] und für α -Teilchen. Nach Bestrahlung eines geringen Anteils von Zellkernen innerhalb einer konfluenten Population wurde mit α -Teilchen eine erhöhte Induktion der Proteine p53 und p21 gezeigt, die auf eine Signaltransduktion über gap junctions zurückgeführt wurde [Azzam *et al.*, 1998]. Damit im Einklang stehende Daten aus der gleichen Gruppe zeigten nach Bestrahlung mit vergleichbaren Fluenzen von α -Teilchen eine transiente Zellzyklusverzögerung in der ersten G₁-Phase [Azzam *et al.*, 2000].

4 Zielsetzung der Arbeit

Besondere Eigenschaften von schweren Ionen sind die hohe lokale Ionisationsdichte, das invertierte Dosisprofil und die erhöhte biologische Wirksamkeit, welche die Grundlage für den vermehrten Einsatz von Ionen, insbesondere von Kohlenstoffionen in der Strahlentherapie bilden. Die therapeutische Anwendung war nur durch eine sorgfältige Untersuchung der biologischen Wirkung von schweren Ionen möglich [Kraft, 1987]. Dabei stand neben der effektiven Abtötung von Tumorzellen, die bestmögliche Schonung des bei der Behandlung des Tumors durchstrahlten gesunden Gewebes im Vordergrund. Da hier die Zellen direkt bestrahlt werden, wurden vor allem die Schädigung der DNA und der Chromosomen, deren Reparatur und sich daraus ergebende Langzeiteffekte, wie zum Beispiel das Zellüberleben, untersucht. In den letzten Jahren wurden jedoch ebenfalls biologische Effekte in unbestrahlten Zellen beobachtet, wenn sich diese in Kontakt zu bestrahlten Zellen befanden. Diese sogenannten „Bystandereffekte“ in unbestrahlten Zellen wurden bereits für α -Teilchen und Heliumionen beschrieben. Da jedoch die Mechanismen für dicht- und dünn-ionisierende Strahlung noch unklar sind, ist die weitere Erforschung der Bystandereffekte in unbestrahlten Geweben insbesondere im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung von Strahlung von Interesse. Die Auswirkungen von Bystandereffekten nach Bestrahlung von Zellen im Tumorbett könnten noch besser abgeschätzt werden. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Beantwortung der Fragen, inwieweit Bystandereffekte eine Rolle nach dicht-ionisierender Strahlung (Kohlenstoff- und Uranionen) spielen und ob Hinweise zur Relevanz der diskutierten Mechanismen erhalten werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fragestellungen hauptsächlich an humanen Fibroblasten untersucht, weil sie als Zellen des Bindegewebes von jeder Bestrahlung betroffen sind.

Material und Methoden

Die für die Durchführung der folgenden Experimente benötigten Chemikalien und Geräte sowie die Zusammensetzung von Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

1 Zellen und Kultivierungsmethoden

1.1 Verwendete Zellen

Für die Experimente wurden humane Fibroblasten der Zelllinie AG01522C als Sekundärkultur vom Coriell Institute for Medical Research Camden (NJ, USA) bezogen. Die Isolierung der Primärzellen erfolgte aus dem Vorhautbindegewebe eines gesunden, drei Tage alten Säuglings. Vor der Ankunft der Zellen wurden bereits 7 Subkultivierungen (Passagen) durchgeführt und die kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) betragen 10. Außerdem wurde die humane, immortalisierte, nicht-tumorigene Keratinozytenlinie HaCaT [Boukamp *et al.*, 1988] verwendet, die vom DKFZ in Heidelberg in der 39. Passage zur Verfügung gestellt wurde.

1.2 Verfahren zur Zellkultivierung

1.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die Inkubation beider Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 89% Luftfeuchtigkeit. Es handelte sich bei beiden Zelllinien um adhärente Zellen, zu deren Kultivierung Zellkulturflaschen (75 cm², 25 cm²) der Firma FALCON verwendet wurden. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung durch das Medium zu gewährleisten, betrug der Flüssigkeitsstand in den Zellkulturflaschen 2 mm (15 ml, 5 ml). Zur Kultivierung der Fibroblastenzellen wurde ein Komplettmedium bestehend aus 500 ml Vollmedium EMEM + EBSS, 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin eingesetzt. Subkultivierungen der subkonfluenten Zellen und Medienwechsel erfolgten abwechselnd alle 3 bis 4 Tage. Da Fibroblasten sehr unterschiedlich in Abhängigkeit vom verwendeten fötalen Kälberserum reagieren, wurde jede verwendete Charge im Hinblick auf das Wachstumsverhalten getestet. Die Keratinozyten erhielten ein Medium bestehend aus 500 ml DMEM Basis Medium High Glucose D (4,5 g/l entsprechend 0,025 M), 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Da Subkultivierungen alle 3 bis 4 Tage durchgeführt wurden, mussten keine separaten Medienwechsel durchgeführt werden.

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Experimente miteinander vergleichen zu können, sollten konstante Zelldichten und gleicher G₀/G₁-Phase-Gehalt der Fibroblasten vorliegen. Daher wurden konfluente Monolayer-Kulturen (Zelldichten von 5x10⁴ Zellen pro cm²) mit kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) von 17 bis 26 bzw. Passagen zwischen 11 bis 17 eingesetzt.

1.2.2 Subkultivierungen

Zur Ablösung der adhärenen Fibroblasten wurden 3 ml EDTA-Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin, 0,1% EDTA) verwendet (Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank, 3-4 Minuten). Die eingesetzte EDTA-Konzentration diente speziell bei den Fibroblastenzellen zur besseren Ablösung des adhärenen Zellrasens. EDTA führt als Komplexbildner mit Ca²⁺-Ionen zu einer Destabilisierung der Cadherine. Die Trypsin-Inaktivierung wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium erreicht, welches auch cytotoxische Effekte des EDTA unterbindet. Mit einer 2 ml Pipette wurden die abgelösten Zellverbände vereinzelt und anschließend die Zellzahl mittels eines elektronischen Zellzählgerätes ermittelt. Die abgelösten Zellen wurden mit entsprechender Zellzahl in neue Zellkulturgefäße übergeführt. Das optimale Zeitintervall zwischen den Subkultivierungen lag bei 7 bis 10 Tagen.

Für die Ablösung der subkonfluenten Keratinozyten wurden 2 ml 0,1%ige Na₂-(EDTA)-Lösung (in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gelöst) und 1 ml EDTA-Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA) verwendet. Zuerst wurden die Zell-Zell-Kontakte des konfluenten Zellrasens der Keratinozyten durch Zugabe der vorgewärmten EDTA-Lösung gelöst (Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank, 5-10 Minuten). Nach Entfernung der EDTA-Lösung, wurde im zweiten Schritt zum Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix die EDTA-Trypsin-Lösung zugegeben (Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank, 5 Minuten). Das Abstoppen der Trypsinlösung erfolgte ebenfalls durch Zugabe von serumhaltigem Medium. Nach der Vereinzelnung der Zellen und der Zellzahlbestimmung (s.o.) wurden die Zellen mit einer maximalen Splitrate von 1:10 in neue 25 cm² Zellkulturflaschen übergeführt. Die Subkultivierungen erfolgten alle 3-4 Tage.

1.2.3 Langzeitlagerung der Zellen

Die Langzeitlagerung erfolgte für beide Zelllinien in Tiefkühlmedien (Zusammensetzungen siehe *Anhang*) bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Die Zelldichten betragen zwischen 1,5x10⁶ und 1,8x10⁶ Zellen/ml. Vor dem Einfrieren sollten die Kulturen zwischen 70 % bis 80% Konfluenz erreicht haben. Am Vortag des Einfrierens wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Proliferation zu stimulieren.

Nach dem Ablösen der subkonfluenten Fibroblasten wurde die Zellzahl bestimmt, anschließend zentrifugiert (8', 1000g) und das Pellet in einem entsprechenden Volumen Kryomedium

resuspendiert. Um das Eindringen von Glycerin in die Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen 30 min inkubiert und anschließend über Nacht in Isopropanol bei -80°C gelagert (Einfrierrate $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen dem Stickstoffbehälter entnommen und durch kurzes Aufschrauben entgast, um ein Explodieren durch den sich ausdehnenden Stickstoff zu verhindern. Die Zellsuspensionen wurden kurz bei 37°C im Wasserbad erwärmt und dann in 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit 15 ml vorgewärmten Medium überführt. Nach Inkubationszeiten von circa 2-3 Stunden wurde die Anheftungseffizienz der Fibroblasten abgeschätzt und ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zur Langzeitlagerung der Keratinozyten wurden diese analog dem Subkultivierungsprotokoll von der extrazellulären Matrix abgelöst und vereinzelt. Die subkonfluenten Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rpm, 6'), in Kryomedium resuspendiert und 20-30 min inkubiert, um das Eindringen von DMSO in die Zellen zu gewährleisten. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht in Isopropanol bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in den Stickstoffbehälter gegeben. Das Auftauen der Keratinozyten erfolgte analog dem Protokoll für die Fibroblasten (25 cm^2 Zellkulturflaschen, 5 ml vorgewärmtes Medium). Der Mediumwechsel nach dem Auftauen erfolgte erst am nächsten Tag.

1.2.4 Synchronisation der Fibroblasten

Da Fibroblasten einen einschichtigen Monolayer bilden und bei Erreichen der Konfluenz ihre Proliferation einstellen, wurden die Zellen durch Wachstumsinhibition in der G_0/G_1 -Phase synchronisiert. Zwei Wochen vor Bestrahlung wurden ungefähr 8000 Zellen/ cm^2 ausgesät. Die Bestimmung des Zellzyklusanteils mittels Durchflusszytometrie ergab, dass in allen Experimenten circa 85% bis 90% der Zellen in der G_0/G_1 -Phase synchronisiert waren.

1.2.5 Altersbestimmung von Fibroblasten

Die Altersbestimmung der Fibroblasten ist ein wichtiger Parameter für die Kultivierung und Beurteilung der Ergebnisse. Die hier verwendeten Fibroblasten sind nicht immortalisiert und unterliegen auch *in vitro* einem Alterungs- und Differenzierungsprozess. Der Grad der Differenzierung steigt mit der Anzahl der Teilungen. Die Berechnung der kumulativen Populationsverdopplungen (cumulative population doubling, CPD) erfolgte wie in Formel 6 dargestellt über die Anzahl der geernteten Zellen (N), der Anzahl der zuvor eingesäten Zellen (N_0) und der CPD der vorherigen Passage (CPD_{ALT}).

$$\text{CPD}_{\text{neu}} = \text{CPD}_{\text{alt}} + \frac{\ln \frac{N}{N_0}}{\ln 2} \quad (6)$$

Insbesondere für die Untersuchung von Bystandereffekten wurden Zellen mit niedriger CPD eingesetzt, da die Expression des in dieser Arbeit untersuchten Zellzyklus-Inhibitor-Proteins p21 bei jungen Zellen relativ niedrig ist, sodass die eher schwache p21 Expression bei Bystandereffekten vom Kontrolllevel unterschieden werden kann. Zellen mit hoher CPD besitzen einen bis Faktor zwei höheren Grundlevel der p21 Expression [Fournier *et al.*, 2004].

2 Bestrahlungsexperimente

2.1 Röntgenbestrahlung

Die Röntgenbestrahlungen wurden mit einer Isovolt DS1 Röntgenröhre der Firma Seifert durchgeführt, welche mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einem Kathodenstrom von 16 mA gefahren wurde. Die Röntgenröhre besteht aus einer Wolframanode. Dem Austrittsfenster der Röntgenstrahlung ist ein Filtersystem bestehend aus 7 mm Beryllium, 1 mm Aluminium und 1 mm Kupfer vorgelagert, welches die langwelligen Anteile der Röntgenstrahlung absorbiert. Die Dosis und die Dosisleistung wurden mit dem Dosimeter SN4 (PTW Freiburg) ermittelt und digitalisiert. Der Fokusabstand (vom Brennpunkt des Strahls zur Probe) wurde auf circa 30 cm eingestellt.

Für Röntgenstrahlexperimente wurden asynchrone, proliferierende oder konfluente und somit kontaktinhibierte Zellen verwendet. Die Synchronisation erfolgte durch Wachstumsinhibierung (siehe *Material und Methoden* 1.2.4). Die Zellen wurden in konditioniertem Medium in Zellkulturflaschen bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Dosisleistung betrug 1 Gy/min. Die applizierte Dosis lag in den verschiedenen Experimenten zwischen 0,25 Gy und 5 Gy. In jedem Experiment wurden unbestrahlte Kontrollzellen mitgeführt, die den gleichen Bedingungen bei Transport und Lagerung während der Bestrahlung ausgesetzt waren.

2.2 Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen

Die Bestrahlungen mit beschleunigten Ionen wurden am UNILAC (Universal Ion Linear Accelerator) der GSI durchgeführt. Die Ionisationskammer wurde vor jeder Bestrahlung neu kalibriert. Zur Kalibrierung dienten Kernspurdetektoren (CR-39-Plättchen), die mit einer bestimmten Pulszahl bestrahlt wurden. Die latente Schädigung der Plättchen wurde mit Natronlauge sichtbar gemacht und unter dem Mikroskop ausgewertet. Über den resultierenden Eichfaktor (Teilchen / Pulse · cm⁻²) konnte die Fluenz für die Bestrahlungen berechnet werden.

In den Experimenten am UNILAC wurden die Zellen mit niedrig energetischen Kohlenstoff- und Uranionen (4.0 bis 9.8 MeV pro Nukleon) bestrahlt. In Tabelle 1 sind die Energien und der zugehörige Lineare Energie Transfer (LET) aufgelistet, die verwendet wurden.

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Schwerionen.

Ion	Energie auf Target (MeV/u)	LET (keV/ μm)	Fluenz (Teilchen/ cm^2)	Dosis (Gy)	Mittlere Trefferzahl pro Zellkern	Anzahl der minst. 1x getroffenen Zellkerne	Dosis pro Treffer (Gy)
Kohlenstoff	9,8	170	5×10^3	0,0014	0,01	1%	0,13
	9,8	170	1.5×10^4	0,0041	0,03	3%	0,13
	9,8	170	5×10^4	0,0136	0,1	10%	0,13
	9,8	170	2×10^6	0,544	3,92	98%	0,13
	9,8	170	2×10^7	5,44	39,2	100%	0,13
Uran	4,2	15000	5×10^3	0,12	0,01	1%	12
	4,2	15000	1.5×10^4	0,36	0,03	3%	12
	4,2	15000	5×10^4	1,20	0,1	10%	12
	4,2	15000	2×10^6	48,0	3,92	98%	12
	4,2	15000	2×10^7	480	39,2	100%	12

Die absorbierte Dosis (D) für die Bestrahlung mit Teilchen wurde nach Formel (3) berechnet. Da Zellen hauptsächlich aus Wasser bestehen, kann die Dichte des bestrahlten Materials (ρ) gleich 1 gesetzt werden (siehe Formel 7). Somit ergab sich die Berechnung der Dosis für die Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen aus dem LET (L_Δ) und der Flächenbelegung (Φ).

$$D[\text{Gy}] = 1,6 \cdot 10^{-9} \cdot L_\Delta \left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right] \cdot \phi \left[\frac{1}{\text{cm}^2} \right] \quad (7)$$

Die mittlere Trefferzahl pro Zellkern wurde über den geometrischen Wirkungsquerschnitt und die Fluenz berechnet (siehe *Einleitung* Formel 4). Die Zellkernfläche von Fibroblasten beträgt $196 \pm 75 \mu\text{m}^2$ [berechnet aus 9336 ausgewerteten Zellen, persönliche Mitteilung von M. Winter, GSI]. Die Anzahl der getroffenen Zellkerne stellt eine Poisson-Verteilung dar, in welche die mittlere Trefferzahl pro Zellkern eingeht (siehe *Einleitung* Formel 5). Die Zellpopulationen, in denen nur 1 % bis 10 % der Zellkerne direkt bestrahlt wurden, werden in den Ergebnissen als Bystanderpopulationen bezeichnet.

Für die Beschleunigerexperimente wurden spezielle Magazine verwendet, in welchen die Petrischalen mit den Zellmonolayern in eine vertikale Position gebracht und mit einer ausreichenden Menge an Zellkulturmedium bedeckt wurden [Kraft-Weyrather *et al.*, 1989]. Um die Stimulierung der Zellzyklus-Progression durch frisches Medium zu verhindern, wurde serumfreies Medium verwendet. Im Anschluss an die Bestrahlung wurde das serumfreie Medium durch konditioniertes Medium ersetzt. Wie bei der Röntgenbestrahlung wurden unbestrahlte Kontrollzellen mitgeführt, die den gleichen Bedingungen bei Transport und Lagerung während der Bestrahlung ausgesetzt waren.

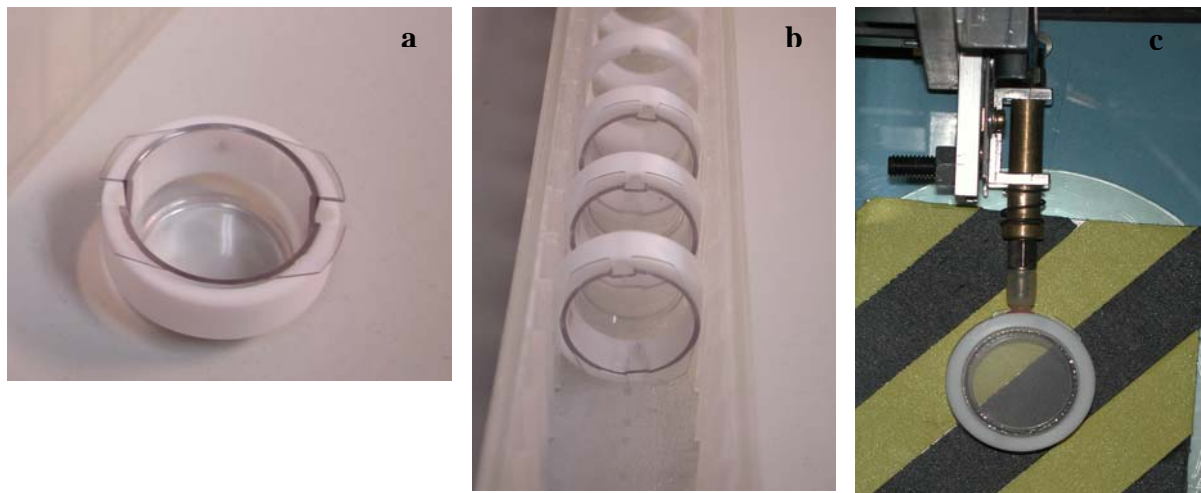


Abbildung 7: (a) Speziell angefertigte Teflonringe für die Bestrahlung von Einsätzen zur Cokultivierung von bestrahlten und unbestrahlten Zellen am Schwerionenbeschleuniger (UNILAC) der GSI. (b) Durch diese Konstruktion können die Zellkultureinsätze in die erforderliche vertikale Bestrahlungsposition innerhalb der Magazine gebracht werden. (c) Greifarm mit Teflonringen und Einsätzen in Bestrahlungsposition.

Für die Bestrahlung der Zellkultureinsätze in den Magazinen wurden spezielle Teflonringe angefertigt, in welchen die Zellkultureinsätze so befestigt wurden, dass sie im Magazin in die erforderliche vertikale Bestrahlungsposition gebracht werden konnten (siehe Abbildung 7).

2.3 Cokultivierung von bestrahlten und unbestrahlten Fibroblasten

Für die Fragestellung, ob bestrahlte Zellen Mediatoren induzieren, die als lösliche Faktoren sekretiert und durch Diffusion zwischen zwei Zellmonolayern Bystandereffekte bei unbestrahlten Zellen hervorrufen, wurden Fibroblasten mit Röntgen und Kohlenstoffionen bestrahlt und mit unbestrahlten Fibroblasten cokultiviert. Für die Experimente mit asynchronen Zellen wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² 16 und 24 Stunden vor der Bestrahlung aus einer konfluenten Kultur und für die Experimente mit konfluenten Zellen 1×10^4 Zellen/cm² circa 2 Wochen vor der Bestrahlung ausgesät.

Die Cokultivierung der Zellen erfolgte in Multiwell™ 6-Well-Zellkulturplatten und den entsprechenden Zellkultureinsätzen der Firmen FALCON® oder Greiner bio-one. Wie in Abbildung 8 dargestellt, bestanden die Zellkultureinsätze aus einer transparenten Polyethylenterephthalat (PET) Membran mit einer Porengröße von 1 µm ($1,6 \times 10^6$ Poren/cm²), um die Diffusion von Molekülen zwischen den Zellmonolayern zu gewährleisten. Der Abstand zwischen den Zellkultureinsätzen und dem Boden der 6-Well-Zellkulturplatte betrug 0,9 mm.

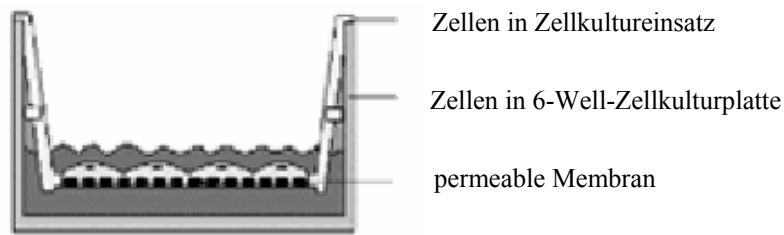


Abbildung 8: Insert-Well-Cokultivierungssystem der Firma FALCON®. Der 6-Well-Zellkulturplatte ist im Abstand von 0,9 mm ein Zellkultureinsatz mit einer Porengröße von 1 μm ($1,6 \times 10^6$ Poren/ cm^2) aufgelagert, um die Diffusion von Molekülen zwischen den Zellmonolayern zu gewährleisten.

In den Bestrahlungsexperimenten wurden die Zellen der Zellkultureinsätze (Donorzellen) mit Röntgen oder Kohlenstoffionen bestrahlt und direkt im Anschluss mit den unbestrahlten Zellen (Akzeptorzellen) der 6-Well-Zellkulturplatten kokultiviert. Nach 3 und 5 Stunden Inkubationszeit wurde die Induktion der Proteine p21 und p53 über Western-Blot-Analyse oder in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die bestrahlten Zellen werden im Folgenden als Donorzellen, die unbestrahlten Zellen als Akzeptorzellen bezeichnet. Um zu kontrollieren, ob mediumvermittelte Effekte in Akzeptorzellen durch vorausgegangene Bestrahlung der Donorzellen induziert wurden, wurden auch unbestrahlte Donorzellen des gleichen Typs parallel verwendet.

3 Protein-Nachweismethoden

3.1 Gelelektrophorese und Western-Blot

Der Bestrahlung der Zellen und den anschließenden Inkubationszeiten schloss sich die Proteinextraktion an. Das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturgefäßen (siehe *Material und Methoden* 1.2.2) erfolgte durch Trypsin, jedoch nur mit einer kurzen Einwirkzeit von einer Minute. Das Ablösen wurde mit anschließendem Abschaben der Zellen auf Eis kombiniert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (10', 107 g, 4°C), durch einen Waschriff mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) resuspendiert und erneut in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (15', 2500 rpm, 4°C). Der Zellaufschluss und die Proteinextraktion erfolgten durch Zugabe des RIPA-Puffers (Zusammensetzung siehe *Anhang*) in die Eppendorf-Reaktionsgefäße, wobei 50 µl auf 1x10⁶ Zellen gegeben wurden. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte durch Auf- und Abziehen mit einer Spritze. Nach 30-minütiger Lyse wurden die Zelltrümmer von den extrahierten Proteinen durch Zentrifugation abgetrennt (5', 13.000 rpm, 4°C).

Zur Bestimmung der in der SDS-PAGE-Elektrophorese einzusetzenden Proteinvolumina wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Hierbei wurde als Reagenz zur kolorimetrischen Bestimmung Coomassie-Brilliant-Blau eingesetzt. Das Rinderserumalbumin in bekannten Konzentrationen (5-40 µg Protein/ml) diente als Eichsubstanz.

Die durch Lyse extrahierten Proteine wurden im Verhältnis 1:2 mit SDS-Sample-Puffer versetzt. Davon wurden zwischen 7,5 und 10 µg in 12% Nodium Dodecyl Sulfat (SDS)- Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gelelektrophorese-Apparatur wurde mit einer Stromstärke von 16 mA und einer Spannung von 400 V bei einer Laufzeit von 2,5 bis 3 Stunden betrieben. Als Markerprotein wurde ein Full Range Rainbow™ Marker eingesetzt.

Über Nacht wurden die Proteine mit einer Transferzelle auf eine Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Membran unter der Verwendung von eingeweichten Filterpapieren und Schwämmen transferiert (Parameter: 20 V, 200 mA). Nach 14- stündiger Laufzeit wurde die Membran mit 1x TBST-Puffer gewaschen. Nach der Blockierung der unspezifischen freien Bindungsstellen auf der Membran mit 5 %igem Magermilchpulver (2 Stunden, RT), wurde die Membran mit monoklonalen Antikörpern gegen die untersuchten Proteine p53 und p21 beladen. Im Anschluss an mehrere Waschriffte (3 x 10 Minuten) mit 1x TBST-Puffer, wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper hinzugegeben. Die Meerrettich-Peroxidase katalysierte die Chemilumineszenz-Reaktion des Substrates Luminol. Die emittierten Photonen (430 nm) wurden autoradiographisch dargestellt (Beispiel siehe Abbildung 9). Die Expositionszeiten des Fotomaterials variierten für die Proteine p53 und p21 zwischen 3 und 5 Minuten.

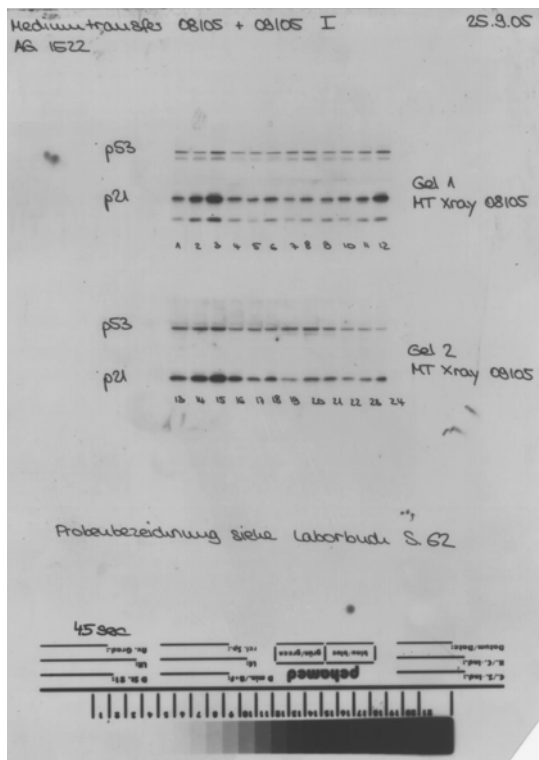
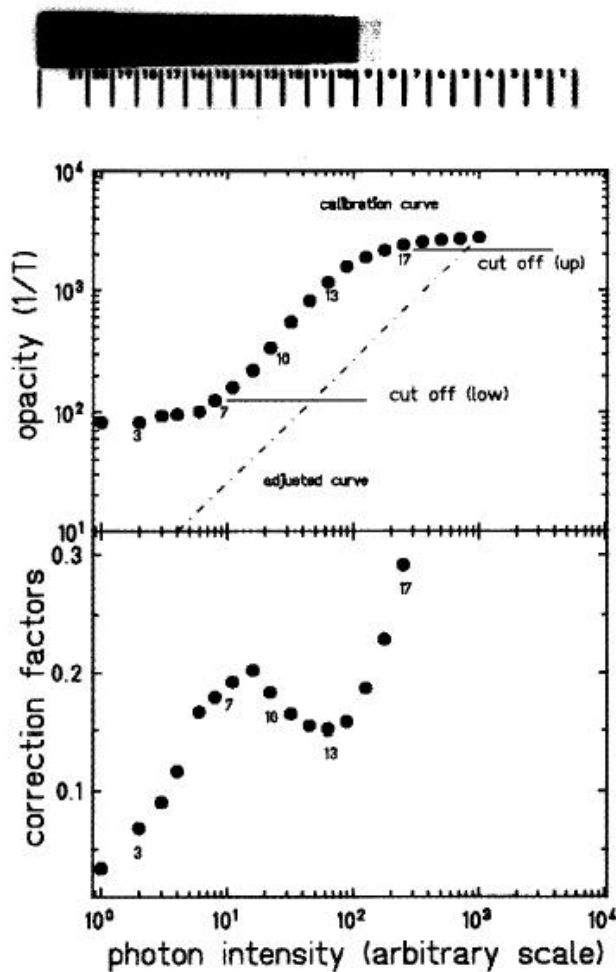


Abbildung 9: Autoradiographischer Film mit den Proteinen p53 und p21 nach Filmentwicklung; Schwärzung des Films durch Referenzbelichter zur Erstellung einer Kalibrierungskurve (Graukeil, unterer Rand).

Zur Kalibrierung der Filme wurde mittels Referenzbelichter der Randbereich des Films standardisierten Lichtpulsen der Wellenlänge 460 nm ausgesetzt (Graukeil, siehe Abbildung 9). Um die Regelmäßigkeit des Proteinauftrages zu überprüfen, wurde nach dem Abwaschen der p21- und p53-Antikörper von der Membran mit Stripping-Puffer (Zusammensetzung siehe *Anhang*) das Strukturprotein α -Tubulin detektiert. Dieses ist keinen strahleninduzierten Änderungen unterworfen. Für die Tubulin-Detektion wurde ein monoklonaler anti- α Tubulin-Erstantikörper verwendet. Da α -Tubulin hochexprimiert ist, wurden die Filme nur für circa 1 Sekunde belichtet.

3.2 Western-Quantifizierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine p53 und p21 über Western-Blot-Analyse analysiert. Um deren relative Proteinmenge zu bewerten, musste eine exakte Quantifizierungsmethode eingesetzt werden, welche die chemilumineszenten Western-Blot-Signale analysiert. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist ein sensitives und lineares Detektionssystem notwendig. Der eingesetzte Referenzbelichter erzeugte mit Licht der Wellenlänge 460 nm in 21 Stufen eine Schwärzung auf dem autoradiographischen Film durch Erhöhung der Photonenintensität über 3 Größenordnungen. Die niedrigste Photonenintensität wurde willkürlich auf 10^0 festgesetzt. Nach der Filmentwicklung wurden die Signale durch ein Laser-Densitometer verarbeitet, indem die Transmission (T) durch die geschwärzten Signale bestimmt wurde. Für die Generierung der Kalibrierungskurve, exemplarisch in Abbildung 10b dargestellt, wurde die Opazität (Opazität = $1/T$) jedes Kalibrierungssignals in Abhängigkeit von der Photonenintensität aufgetragen. Im Idealfall verhält sich die Transmission durch die geschwärzten Signale linear zur Photonenintensität. Die Korrektur der Nichtlinearität erfolgte durch die Faltung der Kalibrierungsmit der Idealkurve.



a **Abbildung 10: Erstellung der Kalibrierungskurve für die densitometrische Quantifizierung von Röntgenfilmsignalen.** (a) Filmschwärzung durch standardisierte 460 nm Lichtpulse (Graukeil). Die Stufen 1 bis 21 entsprechen Photonintensitäten zwischen 10^0 bis 10^3 . (b) Kalibrierungskurve erstellt durch Schwärzung des Films mit standardisierten Lichtpulsen der Wellenlänge 460 nm. Gezeigt ist die Opazität (1/Transmission) der geschwärzten Flächen im Verhältnis zur Intensität der Photonen. Ansprech-Bereich, Sättigungs-bereich, Größenordnung und Steigung im dynamischen Bereich stehen in Abhängigkeit zur Filmsensitivität und den Entwicklungsbedingungen. Die Idealkurve (gestrichelt) stellt die lineare Beziehung zwischen den geschwärzten Flächen und der Photonintensität dar. (c) Korrekturfaktor ermittelt durch Faltung der Kalibrierungsmittel mit der Idealkurve [aus: Fournier *et al.*, 2003].

Die resultierenden Korrekturfaktoren wurden aufgetragen (siehe Abbildung 10c). Bei einem zweiten Abscannen des Films wurden die Korrekturfaktoren nun automatisch zu jedem Pixel des gescannten Bildes hinzugefügt. Als Ergebnis erhielt man ein korrigiertes Bild, in welchem eine Linearität zwischen der Schwärzung des Films und der Photonintensität bestand. Die Abspeicherung erfolgte im 8-bit Format als *Tag Image File Format* (TIFF). Diese Arbeitsschritte wurden automatisch vom Programm MEPHYSTO (PTW-Freiburg) durchgeführt. Die TIFF-Dateien wurden mit dem GeneTools Software Programm (Syngene, Cambridge, UK) analysiert, in welchem die gesamte Schwärzung der Proteinbanden integriert und der Hintergrund durch Integration einer entsprechenden Protein-freien Fläche abgezogen wurde [Fournier *et al.*, 2003].

3.3 Immunodetektion mittels Durchflusszytometrie

Mit durchflusszytometrischen Messungen können bestimmte Eigenschaften einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom gemessen werden, wie z.B. die vermehrte Expression des Zellzyklusregulator-Proteins p21. Hierzu wird das Protein mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen. Mit dieser Methode wurde sowohl die Induktion von p21 in den Bestrahlungsexperimenten mit direkter Exposition der Zellen als auch in den Untersuchungen zum mediumvermittelten Bystandereffekt kokultivierter und unbestrahlter Fibroblasten parallel zur Western-Blot-Analyse bestimmt. Außerdem wurde durch die Markierung mit fluoreszierenden DNA-Farbstoffen der DNA-Gehalt einzelner Zellen bestimmt, um Aussagen über die Häufigkeitsverteilung der Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen machen zu können.

Die Zellen wurden nach der Bestrahlung trypsiniert (siehe *Material und Methoden* 1.2.2) und zentrifugiert (8', 1600 rpm, 4°C). Nach drei Waschschritten mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) zur Entfernung der Medium- und Trypsinreste, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 3,7 %igem Paraformaldehyd (PFA). Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte mit dem Detergenz Triton X 100 (0,5%), um die Zellen für die Antikörper zugänglich zu machen. Zur Entfernung des Triton X 100 wurden die Zellen dreimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Nach dem Blockierungsschritt der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen mit 0,4%-igem Rinderserumalbumin (BSA) über Nacht bei 4°C wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper beladen, der direkt gegen das gesuchte Protein p21 gerichtet war. Als Zweitantikörper wurde ein Fluorochrom-konjugierter anti-Maus IgG Antikörper (Fab'Fragment) verwendet. Das Fluorochrom Alexa488 (Molecular Probes) wurde im Durchflusszytometer bei einer Wellenlänge von 495 nm angeregt und emittierte eine maximale Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 519 nm. Zur Darstellung der Kern-DNA wurden die fixierten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert.

Während den Messungen im Durchflusszytometer können unterschiedliche Parameter gleichzeitig bestimmt werden. Das Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) wurde gegeneinander aufgetragen und zeigte somit die Größenverteilung der Zellpopulationen. Da Zellen während der Synthese-Phase ihren DNA-Gehalt durch DNA-Replikation verdoppeln, konnte über die Messung des an die Kern-DNA gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (Kanal FL6-DAPI) der Anteil des DNA-Gehaltes in den verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt werden. Hierbei wurden bei der Messung nur die Signale der Zellpopulationen mit einfachem und doppeltem DNA-Gehalt (Bereich RN1) berücksichtigt.

Das Fluoreszenzsignal wurde für jede einzelne Zelle gemessen. Zur Bestimmung der p21-Induktion wurde die Fluoreszenzintensität des antikörpergekoppelten Fluorochroms Alexa488 (Kanal FL1-FITC) durch einen zweiten Bereich (RN2) definiert und bestimmt. Der angegebene mittlere Wert

für die Fluoreszenz entspricht dem Integral der Einzelmessungen (= Bereich RN2) normiert auf die Zahl der Einzelmessungen (arithmetischer Mittelwert).

Im Verlauf der Messungen stellte sich heraus, dass ungefärbte Zellen unspezifisch an den Zweitantikörper (Alexa488) binden. Infolgedessen wurden in weiteren Messungen unbestrahlte Zellen mit dem Zweitantikörper beladen, deren Fluoreszenzwerte bestimmt und diese von den Werten der bestrahlten Zellen abgezogen. Die p21-Induktion der bestrahlten Zellen wurde auf eine unbestrahlte Kontrolle normiert.

4 Zellzyklusanalysen nach der Höchst-BrdU-Quenching-Methode

Um den Zellzyklusverlauf nach Bestrahlung der synchronisierten Zellen bis 98 Stunden über die erste Zellteilung hinaus zu verfolgen, wurden die Zellen nach Wiederaussaat (5000 bis 10000 Zellen/cm²) unter Zusatz von 5-Brom-desoxyuridin (BrdU) mit einer Konzentration von 10 µM abgedunkelt kultiviert. Dieses wird bei der DNA-Synthese während der S-Phase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Nach der Zellernte (siehe *Material und Methoden* 1.2.2) wurden die Zellen durch Zugabe von 70% Ethanol für 1 Stunde bei 4°C fixiert und anschließend zur Vermeidung unspezifischer Signale ein RNase-Verdau (2 µg/ml in PBS) für 30-45 min im Brutschrank oder Wasserbad (37°C) durchgeführt. Die DNA-Menge wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff Höchst-33258 (16 µg/ml in 1:4 Ethanol/PBS) detektiert, welcher spezifisch an Adenosin-Thymidin-Basenpaare bindet (Anregungswellenlänge 360 nm, Emissionswellenlänge 470 nm). In die DNA eingebautes BrdU behindert die Bindung des Höchst-Farbstoffes, wodurch das Signal nach dem Durchlaufen der S-Phase gemindert (gequencht) wird. Nach einem zweiten Durchlaufen der S-Phase wird das Signal nochmals schwächer. Zur Ermittlung des Gesamtgehalts an DNA wurden die Zellen mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (200 µg/ml in Millipore gelöst) gefärbt, dessen Einbau nicht durch BrdU gehindert wird. Durch Auftragung der Intensitätshäufigkeiten der Hoechst- und Ethidiumbromid-Fluoreszenz konnten in einer Zweiparametrischen Darstellung die einzelnen Zellzyklen und Zellzyklus-Phasen unterschieden werden.

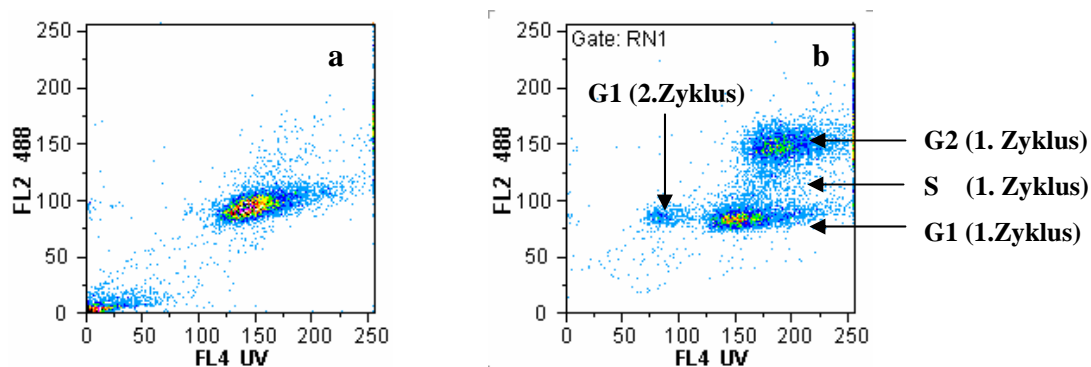


Abbildung 11: Zweiparametrische Darstellung einer Höchst-BrdU-Quenching-Messung unbestrahlter Zellen. Die Intensitätshäufigkeiten der Hoechst- (FL4) und Ethidiumbromid-Fluoreszenz (FL2) sind gegeneinander aufgetragen (a) Nach 16 Stunden befinden sich die meisten Zellen in der ersten G₀/G₁-Phase. (b) Nach 32 Stunden sind die Zellen durch den Zellzyklus nach Markierung mit BrdU gelaufen und können den einzelnen Zellzyklus-Phasen (eingezeichnet) zugeordnet werden.

In Abbildung 11 sind Spektren von unbestrahlten Fibroblasten 16 und 32 Stunden nach Wiederaussaat mit der Höchst-BrdU-Quenching-Methode dargestellt. Nach 16 Stunden befinden sich die meisten Zellen in der ersten G₀/G₁-Phase (a). Nach 32 Stunden sind die Zellen durch den Zellzyklus gelaufen und können den einzelnen Zellzyklus-Phasen zugeordnet werden (b).

5 Überleben von Fibroblasten nach Kultivierung mit dem Zellkulturüberstand von bestrahlten Keratinozyten

Um das Überleben von Fibroblasten nach Zugabe des Mediums von bestrahlten Keratinozyten zu bestimmen, wurden HaCaT-Zellen direkt bestrahlt. Als Referenz wurde das Überleben von unbestrahlten (Kontrolle 0 Gy) und mit 5 Gy bestrahlten Fibroblasten (Kontrolle 5 Gy) in Fibroblastenmedium bestimmt. Beide Zelllinien lagen zum Zeitpunkt der Einsaat als subkonfluente Monolayer vor.

Da die verwendete Keratinozytenlinie HaCaT von Petra Boukamp (DKFZ, Heidelberg) in der GSI neu etabliert wurde, musste deren Wachstumsverhalten bestimmt werden (siehe *Ergebnisse* 3). Daraus ergab sich, dass die Zellen 4 Tage vor Aussaat im Verhältnis 1:6 subkultiviert werden mussten. Am Tag des Experiments wurden die Fibroblasten 6 Stunden vor der Bestrahlung mit entsprechenden Zellzahlen, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, in 75cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium ausgesät, um sich bis zum Bestrahlungszeitpunkt regenerieren zu können. Die Keratinozyten wurden entsprechend 6 Stunden vor der Bestrahlung mit einer Zelldichte von 8000 Zellen/cm² in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Für die Experimente wurde für beide Zelllinien ausschließlich Fibroblastenmedium (Zusammensetzung siehe *Anhang*) mit 20% FCS verwendet, da sich die Fibroblasten in HaCaT-Zellkulturmedium nicht kultivieren ließen.

Tabelle 2: Einsaat der Fibroblasten (AG1522) zur Bestimmung des Überlebens

AG01522	Koloniebildungsrate (abgeschätzt)	Überlebensrate (abgeschätzt)	Einsaat/75cm ²
Kontrolle 0 Gy	0,25	1	400
	0,15	1	667
	0,05	1	2000
Kontrolle 5 Gy	0,25	0,02	20000
	0,15	0,02	33333
	0,05	0,02	100000
+ Medium von unbestrahlten	0,25	1,0	400
	0,15	1,0	667
	0,05	1,0	2000
+ Medium von bestrahlten	0,25	1	400
	0,15	1	667
	0,05	1	2000
	0,025	0,5	8000

Die Bestrahlung der Zelllinien erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 5 Gy Röntgenstrahlung. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium der bestrahlten Keratinozyten abgesaugt und sterilfiltriert, um zu gewährleisten, dass keine Zellen durch den

Mediumtransfer übertragen werden konnten. Der Zellkulturüberstand der unbestrahlten Fibroblasten wurde durch den filtrierten Keratinozyten- Zellkulturüberstand ersetzt. Parallel wurde nach gleicher Vorgehensweise filtriertes Medium von unbestrahlten Keratinozyten auf Fibroblasten gegeben. Für die Inkubation wurde eine kürzere Inkubationszeit (9 Tage, 37°C) als bei Fibroblasten üblich gewählt, um keinen weiteren Mediumwechsel durchführen zu müssen. Anschließend wurden die Fibroblasten mit Methylenblau gefärbt und die Koloniezahl bestimmt. Es wurden nur solche Kolonien gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden. Die Bestimmungen wurden dreifach für jeden Datenpunkt durchgeführt.

6 Nachweis von intrazellulären Radikalen mittels Dichlorofluorescein (DCF-) Assay

Zur Bestimmung intrazellulär entstehender Radikale im Anschluss an Bestrahlungsexperimente, wurde der Dichlorofluorescein (DCF-) Assay verwendet. Hierbei wird die Fluoreszenz von DCF gemessen, das als unpolares 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) der Zellkultur zugegeben wird und die Zellmembran passiert. Im Zytoplasma wird es anschließend durch intrazelluläre Esterasen gespalten und kann in dieser Form nicht mehr aus der Zelle austreten. Die Oxidation durch intrazellulär vorhandene ROS modifiziert das Molekül so, dass es bei entsprechender Anregung fluoresziert (siehe Abbildung 12).

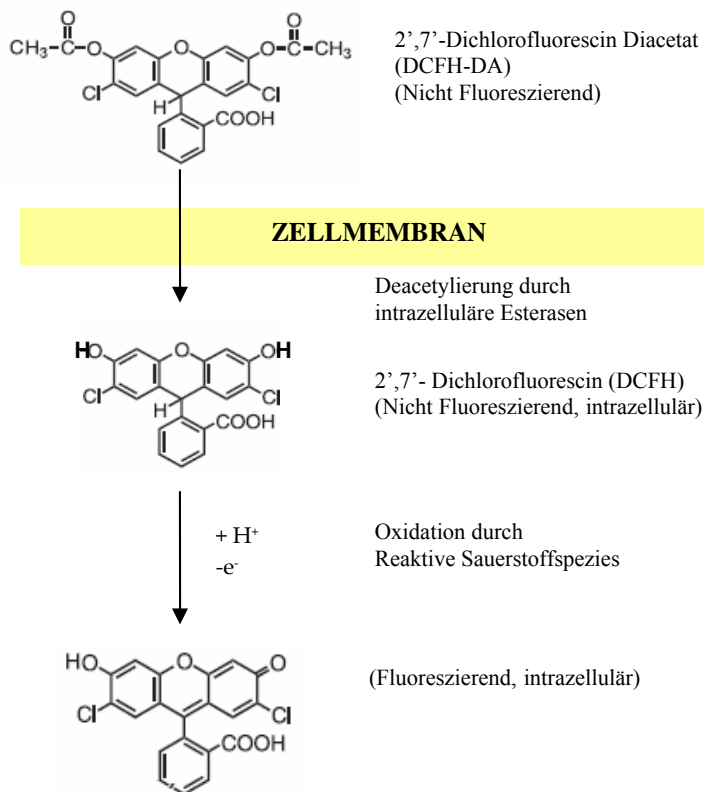


Abbildung 12: Zwischenstufen der Umwandlung von chemisch reduziertem und acetyliertem 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) in fluoreszierendes 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) innerhalb der Zelle. 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) penetriert durch die Zellmembran in die Zelle, wo eine Deacetylierung durch intrazelluläre Esterasen erfolgt. Diese Verbindung bleibt im Zellinneren eingeschlossen und kann die Zelle nicht mehr verlassen. Durch die Einwirkung von Peroxiden (H₂O₂) und anderen reaktiven Sauerstoffspezies wird 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) durch Oxidationen in fluoreszierendes DCF umgewandelt.

Vor der Bestrahlung wurde für die Beladung der Zellen das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und mit dem Farbstoff 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (EK 25 μM , gelöst in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Um Autooxidationen des Farbstoffs durch Lichteinwirkung zu verhindern, wurde im Anschluss an die Beladung Lichteinwirkung möglichst vermieden. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde der überschüssige Farbstoff durch Waschschrte mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) von den Zellen entfernt [Wan *et al.*, 2005]. Nach der Bestrahlung wurde im Fluoreszenzreader der Farbstoff bei einer mittleren Wellenlänge von 485 nm (Bandbreite 20 nm) angeregt und die Fluoreszenzintensität bei einer mittleren Wellenlänge von 530 nm (Bandbreite 25 nm) bestimmt. Während den Fluoreszenzmessungen wurde ein Ablösen des Zellrasens durch Messung in PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) verhindert.

7 Statistische Analyse der Daten

In den Experimenten zur Untersuchung der Expression der Zellzyklusproteine p53 und p21 nach direkter Kohlenstoff- und Uranbestrahlung (siehe *Ergebnisse* 1), wurden jeweils zwei Bestrahlungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden für die Western-Blot-Analyse in jedem Bestrahlungsexperiment 2 Proben unabhängig voneinander bestrahlt und für die weitere Aufarbeitung vereinigt. Die Quantifizierung der Proteinmengen erfolgte in 3 unabhängigen Aufträgen. Soweit möglich, wurde über die Standardabweichung und die Anzahl der Einzelmessungen die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet. Für die parallel durchgeführte Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden 2 unabhängige Proben bestrahlt, diese jedoch unabhängig voneinander aufgearbeitet und gemessen. Innerhalb eines Bestrahlungsexperimentes wurde der Mittelwert gebildet. Aus den Mittelwerten beider Bestrahlungsexperimente und der Standardabweichung wurde der SEM berechnet.

Bei den entsprechenden Analysen zur Zellzyklusverteilung nach direkter Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (siehe *Ergebnisse* 1.1.2) wurden Einzelproben bestrahlt und gemessen. Für die unbestrahlten Kontrollzellen konnte ein Mittelwert aus den Dreifachbestimmungen gebildet und der Standardfehler der Mittelwerte berechnet werden, da sie den gleichen Anteil in den verschiedenen Zellzyklusphasen besaßen. Für die Untersuchung von mediumvermittelten Bystandereffekten nach Cokultivierung (siehe *Ergebnisse* 2) wurden für Western-Blot- und FACS-Analysen je 2 Proben unabhängig voneinander bestrahlt und für die weitere Aufarbeitung vereinigt. Soweit mehrere Bestrahlungsexperimente durchgeführt wurden, wurde über den Mittelwert der einzelnen Bestrahlungen die Standardabweichung und der SEM berechnet. Für die Untersuchungen zum Überleben von Fibroblasten (siehe *Ergebnisse* 3) wurden Dreifachbestimmungen für jeden Datenpunkt durchgeführt und aus diesen Mittelwerte, Standardabweichung und SEM gebildet. Für die Messungen von intrazellulären ROS nach Bestrahlung (siehe *Ergebnisse* 4) wurden die Proben unabhängig voneinander bestrahlt und gemessen. Je nach Anzahl der Bestimmungen (variierte zwischen 2 bis 6) wurden aus ihnen der Mittelwert, die Standardabweichung und der SEM gebildet.

Wenn in den Experimenten neben Doppelbestimmungen auch Einzelwerte vorlagen, wurde für die Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwert des SEM für die Doppelbestimmungen gebildet und auf die Einzelbestimmungen bezogen.

Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Zellzyklusproteine p53 und p21 in unbestrahlten Fibroblasten nach direkter Bestrahlung von wenigen Zellen innerhalb des konfluenten Monolayers mit Kohlenstoff- und Uranionen untersucht. Parallel dazu wurde die Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen gemessen (siehe *Ergebnisse 1*). Es wurden konfluente Zellen verwendet, um eine Signalvermittlung basierend auf Zell-Zell-Kontakten zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Expression der oben genannten Zellzyklusproteine in den gleichen Zellen unter Bedingungen untersucht, die eine Signalvermittlung von bestrahlten zu unbestrahlten Zellen nur über das Zellkulturmedium erlauben (siehe *Ergebnisse 2*). Darüber hinaus war es von Interesse, ob ein Signalaustausch zwischen bestrahlten Keratinozyten und unbestrahlten Fibroblasten zu einem veränderten klonogenen Überleben der Fibroblasten führt. (siehe *Ergebnisse 3*). Da die Produktion von intrazellulären Radikalverbindungen als primärer Effekt in Bystanderzellen diskutiert wird, wurde diese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung bestimmt (siehe *Ergebnisse 4*).

1 Bystandereffekte nach direkter Bestrahlung von konfluenten Monolayer-Kulturen

Zellen stehen in konfluenten Monolayern in direktem Kontakt zueinander. Durch die Bestrahlung von nur wenigen Kernen einzelner Zellen können in den unbestrahlten Zellen des Monolayers Bystandereffekte untersucht werden. Dies ist bei Teilchenstrahlung durch Verwendung sehr niedriger Fluenzen möglich. Die Zellpopulationen, in denen nur 1 % bis 10 % der Zellkerne direkt bestrahlt wurde, werden im Folgenden als Bystanderpopulationen bezeichnet.

1.1 Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Konfluente Monolayer-Kulturen von Fibroblasten wurden mit niedrigen Fluenzen von Kohlenstoffionen bestrahlt, sodass aufgrund der statistischen Verteilung der Treffer nur ein geringer Prozentsatz der Zellkerne getroffen wurde. Zum Vergleich wurde eine hohe Fluenz gewählt, sodass 98 % der Zellkerne mindestens einmal, im Mittel aber 4-mal getroffen wurde (siehe Tabelle 1). Die Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21 wurde nach Bestrahlung mittels Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie bestimmt.

Bereits publizierte Daten für hohe Fluenzen zeigten für die Induktion von p21 ein Maximum 3-6 Stunden nach Bestrahlung [Fournier *et al.*, 2004]. In vorläufigen Experimenten, die dieser Arbeit vorausgegangen waren, sind für niedrige Fluenzen ebenfalls erhöhte Mengen für p21 beobachtet worden, die aber bis 24 Stunden nach Bestrahlung wieder auf Kontrollniveau abgesunken waren.

Daher wurden in den Experimenten dieser Arbeit frühe Zeitpunkte (3 und 5 Stunden nach Bestrahlung) gewählt (siehe *Ergebnisse* 1.1.1). Außerdem wurde die p21-Induktion der bestrahlten Zellen entweder ohne Wiederaussaat 3 oder 24 Stunden im Anschluss an die Bestrahlung oder nach 3 oder 24 Stunden Inkubationszeit und anschließender Wiederaussaat der Zellen bestimmt. Letzteres erfolgte parallel zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung bis 98 Stunden nach Exposition (siehe *Ergebnisse* 1.1.2). Die Inkubationszeiten wurden eingeführt, um sicherzustellen, dass durch die Wiederaussaat der Zellen die Zell-Zell-Kommunikation nicht frühzeitig unterbrochen wurde.

Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21

In den folgenden Ergebnissen wird nur auf die Induktion des Zellzyklusregulators p21 nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen eingegangen, da sich in Bystanderzellen keine Veränderung der Expression von p53 zeigte. Die Ergebnisse der beiden unabhängig voneinander durchgeführten Experimente unterschieden sich allerdings im Hinblick auf die Induktion von p21.

Außerdem ergaben die mit Durchflusszytometrie erhaltenen Werte niedrigere Induktionen als in der Western-Blot-Analyse, was auf einer niedrigeren Sensitivität der Immunodetektion mittels Durchflusszytometrie beruhen könnte. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss daher berücksichtigt werden, dass die FACS-Analyse neu eingeführt wurde, und dass deshalb deren Ergebnisse nicht gleichberechtigt zu den Ergebnissen der etablierten Western-Blot-Analyse stehen.

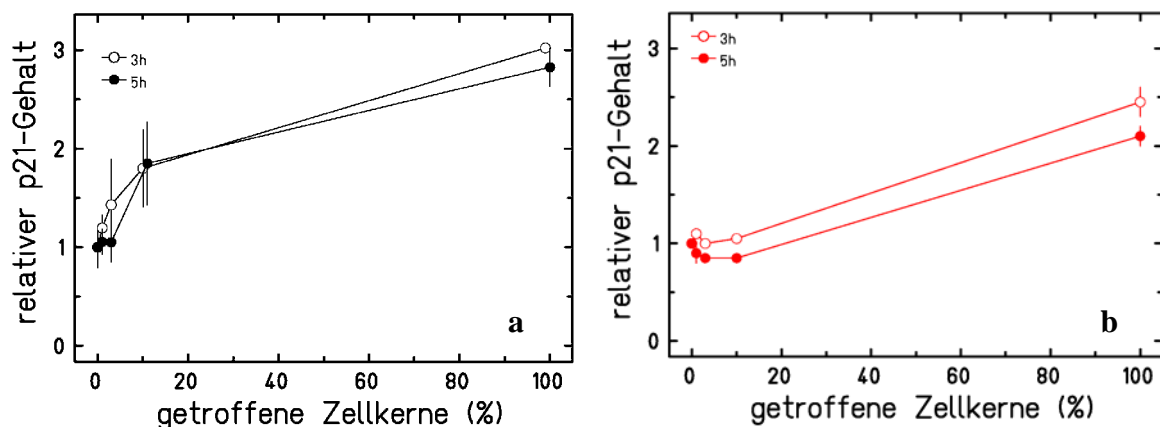


Abbildung 13: p21-Induktion in humanen Fibroblasten als Funktion der Prozentzahl getroffener Zellkerne nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen; Aufarbeitung der Zellen über Western-Blot-Analyse (a) und Durchflusszytometrie (b) jeweils 3 und 5 Stunden nach Exposition; Standardfehler der Mittelwerte (SEM) für Western-Blot-Analyse berechnet aus drei Aufträgen (n=3), für Durchflusszytometrie berechnet aus zwei unabhängigen Proben (n=2).

Wie in Abbildung 13a zu sehen ist, wurde in einem Experiment in der Western-Blot-Analyse sowohl 3 als auch 5 Stunden nach Bestrahlung eine deutliche Erhöhung der p21-Induktion in den Bystanderpopulationen (3 % und 10 % getroffene Zellkerne) beobachtet. In der parallel

durchgeführten Messung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 13b) wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Ein repräsentatives Beispiel für die Darstellung der Messdaten ist in Abbildung 14 für die Kontrollzellen gezeigt.

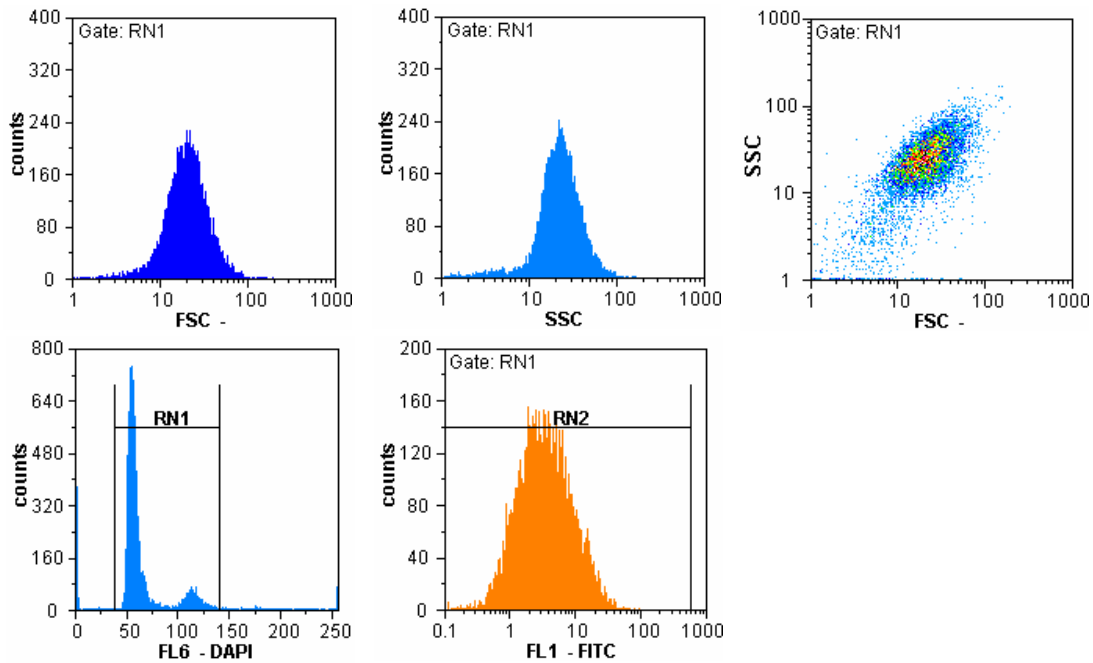


Abbildung 14: Bestimmung der p21-Induktion in unbestrahlten Fibroblasten über Messung der Fluoreszenzintensität mit dem Durchflusszytometer. Die Auftragung des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichtes (SSC) zeigt die Größenverteilung der Zellpopulationen. Über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (Kanal FL6-DAPI) erfolgt die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Hierbei werden nur die Signale der Zellen mit einfachem und doppeltem DNA-Gehalt (Bereich RN1) berücksichtigt. Zur Bestimmung der p21-Induktion wurde die Fluoreszenzintensität (angegeben als arithmetischer Mittelwert) des antikörpergekoppelten Fluorochroms Alexa488 (Kanal FL1-FITC) über die Definition eines zweiten Bereiches (RN2) bestimmt.

In einem weiteren Bestrahlungsexperiment wurde wie im oben beschriebenen Experiment die Expression von p21 mittels Western-Blot-Analyse 3 und 24 Stunden nach Bestrahlung bestimmt und gegen die Prozentzahl an getroffenen Zellkernen aufgetragen (siehe Abbildung 15).

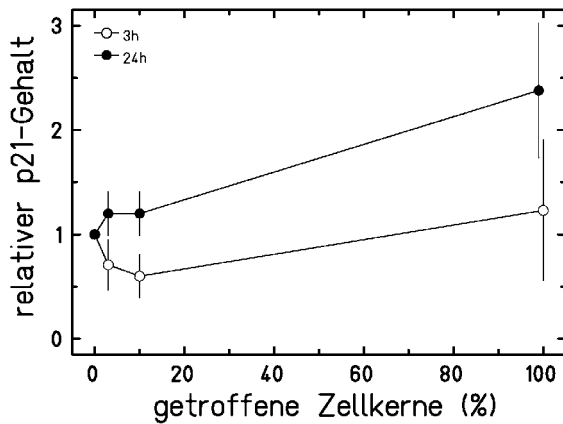


Abbildung 15: p21-Induktion in humanen Fibroblasten als Funktion der Prozentzahl getroffener Zellkerne nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen; ermittelt über Western-Blot-Analyse. Lysate wurden 3 und 24 Stunden im Anschluss an die Bestrahlung hergestellt. Der Standardfehler der Mittelwerte (n=3) wurde berechnet.

Im Gegensatz zum ersten Bestrahlungsexperiment wurde 3 Stunden nach Bestrahlung eine Verminderung der p21-Induktion für die Bystanderpopulationen beobachtet (siehe Abbildung 15). Auch war die p21-Induktion im Vergleich zum ersten Experiment viel geringer, wenn 98 % der Zellkerne einer Zellpopulation getroffen wurden. Allerdings wurde 24 Stunden nach Bestrahlung eine leichte p21-Induktion in Bystanderzellen beobachtet, was im Gegensatz zu den vor Beginn dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen steht.

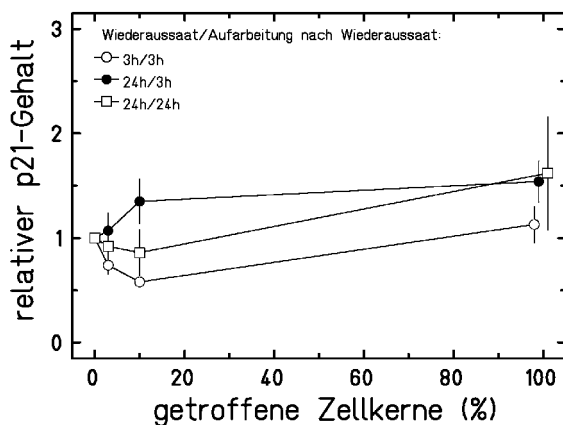


Abbildung 16: p21-Induktion in humanen Fibroblasten als Funktion der Prozentzahl getroffener Zellkerne nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen; ermittelt über Western-Blot-Analyse. Wiederaussaat nach 3 bzw. 24 Stunden. Lysate wurden 3 und 24 Stunden im Anschluss an die Wiederaussaat hergestellt. Der Standardfehler der Mittelwerte (n=3) wurde berechnet.

Wurden die Zellen 3 und 24 Stunden in Kontaktinhibition belassen, anschließend wieder ausgesät und dann der zelluläre p21-Gehalt nach 3 bzw. 24 Stunden bestimmt, zeigte sich ein ähnliches Bild für die p21-Induktion wie nach unmittelbarer Wiederaussaat im gleichen Experiment (siehe Abbildung 16). Auch hier war der zelluläre p21-Gehalt in den Bystanderpopulationen für zwei von 3 Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigt. Die Werte waren allerdings erhöht, wenn die Wiederaussaat 24 Stunden erfolgte und nach 3 Stunden die Proteinmenge bestimmt wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Induktion von p21 in Bystanderzellen nach Bestrahlung mit niedrigen Fluenzen von Kohlenstoffionen beobachtet wurde. Allerdings war diese Induktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung sichtbar.

Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung

Parallel zur Quantifizierung von p53 und p21 wurde die Zellzyklusverteilung 18 bis 98 Stunden nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit Hilfe der Höchst-BrdU-Quenching-Methode im Durchflusszytometer bestimmt.

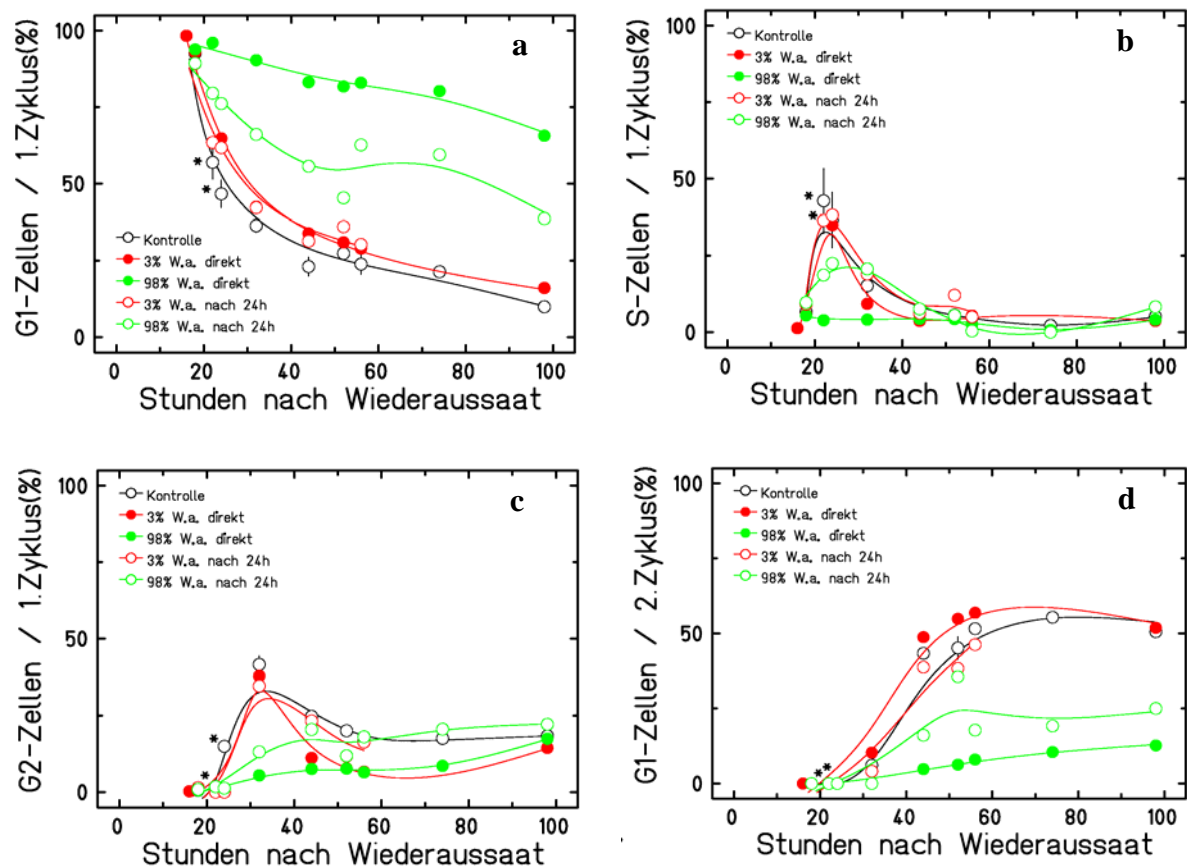


Abbildung 17: Zellzyklusverteilung humaner Fibroblasten 18 bis 98 Stunden nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Es wurden 3% und 98% der Zellkerne bestrahlt. Wiederaussaat (W.a.) direkt im Anschluss und 24 Stunden nach Bestrahlung (Höchst-BrdU-Quenching-Methode und Analyse im Durchflusszytometer). Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Kontrollen berechnet aus 3 unabhängigen Versuchen (Ausnahme * = Messwert bestehend aus nur einem Kontrollwert, daher Berechnung eines Standardfehlers aus dem mittleren Standardfehler der anderen Messwerte).

In Abbildung 17 ist der Verlauf der Zellzyklusverteilung von der G₁-Phase des ersten Zellzyklus bis hin zur G₁-Phase des zweiten Zellzyklus dargestellt. Wie Abbildung 17a zeigt, nahm der Anteil der G₁-Phase-Zellen des ersten Zellzyklus mit fortschreitender Zeit nach Bestrahlung ab. Für die unbestrahlten Kontrollzellen, die im Anschluss an die Bestrahlung entweder direkt oder nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ausgesät wurden, war der Anteil an den Zellzyklusphasen sehr ähnlich. Die entsprechenden Werte wurden gemittelt und der Standardfehler berechnet. Die unbestrahlten Kontrollzellen verblieben zu 10 % in der ersten G₁-Phase. In Bystanderpopulationen (3 % bestrahlte Zellkerne) wurde hingegen bis 98 Stunden nach Wiederaussaat ein um 5-6 %

höherer Anteil an G₁-Phase Zellen des ersten Zyklus im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen. Dieser Unterschied lag jedoch nahe am durchschnittlichen Standardfehler der Messungen (2,24 %), auch wenn alle Messpunkte über der Kontrollkurve lagen. Ein Unterschied zwischen sofortiger und verzögerter Wiederaussaat zeigte sich jedoch für den Anteil an G₁-Phase Zellen des ersten Zyklus, wenn 98 % der Zellkerne einer Population bestrahlt wurden. Die direkt im Anschluss an die Bestrahlung ausgesäten Zellen verblieben zu 70 % in der G₁-Phase des ersten Zellzyklus, während die nach 24 Stunden Inkubationszeit ausplattierten Zellen nur zu 40 % in der ersten G₁-Phase arretierten.

Aus Abbildung 17b ist zu ersehen, dass bereits 20 Stunden nach Wiederaussaat sowohl die Kontrollzellen als auch die Bystanderzellen in die Synthese-Phase übergangen. Sie zeigten wie bereits für den Anteil an G₁-Phase-Zellen einen ähnlichen Kurvenverlauf, für den auch der Zeitpunkt der Wiederaussaat keine Rolle spielte. Der höchste Anteil der Zellpopulationen in der S-Phase (40-50 %) wurde zwischen 20 und 30 Stunden nach Wiederaussaat erreicht. Wurden hingegen 98 % der Zellkerne einer Population bestrahlt, traten diese im Vergleich zu den Kontrollzellen zeitlich verzögert und nur mit einem geringen Prozentsatz in die S-Phase ein. Die Wiederaussaat nach der Inkubationszeit von 24 Stunden führte zu einem Eintritt von circa 25 % der Zellpopulation in die S-Phase. Die direkt nach der Bestrahlung ausgesäten Zellen gingen sogar nur zu 5 % in die erste S-Phase über.

Der Anteil an Zellen in der G₂-Phase des ersten Zellzyklus war in den Zellpopulationen ähnlich wie in der S-Phase (siehe Abbildung 17c). Die Kontroll- und Bystanderzellen, unabhängig von sofortiger und verzögerter Wiederaussaat, durchliefen zu gleichen Prozentanteilen die G₂-Phase, welche ihren höchsten Anteil circa 32 Stunden nach Wiederaussaat hatte. Zellpopulationen, bei denen 98 % der Zellkerne bestrahlt worden waren und die direkt nach Bestrahlung wiederausgesät wurden, traten langsamer in die G₂-Phase ein als Zellen, die nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ausgesät wurden. In beiden Fällen wurde ein Endwert von circa 25 % erreicht, vergleichbar den Kontroll- und Bystanderzellen. Sie verblieben teilweise in der G₂-Phase, während für die Kontroll- und Bystanderzellen der G₂-Anteil zu späteren Zeitpunkten wieder abnahm. Das bedeutet, dass ungeachtet der Bestrahlung in der ersten G₁-Phase diejenigen Zellen, die in den Zellzyklus wieder eingetreten waren, in keiner nachfolgenden Phase des ersten Zyklus langfristig akkumulierten.

Wie Abbildung 17d zu entnehmen ist, erreichte der Eintritt der Kontroll- und Bystanderzellen in die G₁-Phase des zweiten Zyklus ab 60 Stunden nach Wiederaussaat seinen Höchstwert. Der Kurvenverlauf war in beiden Fällen weitestgehend gleich, jedoch lag der Anteil der direkt nach der Bestrahlung wieder ausgesäten Bystanderzellen zwischen 40 bis 60 Stunden über der

Kontrollkurve mit einer Differenz von 10 %, erreichte aber den gleichen Endwert. Die Zellpopulationen, bei denen 98 % der Zellkerne bestrahlt worden waren, traten im Vergleich zu den Kontrollzellen zeitlich verzögert und nur zu 13 % nach sofortiger und zu 25 % nach verzögerter Wiederaussaat ein.

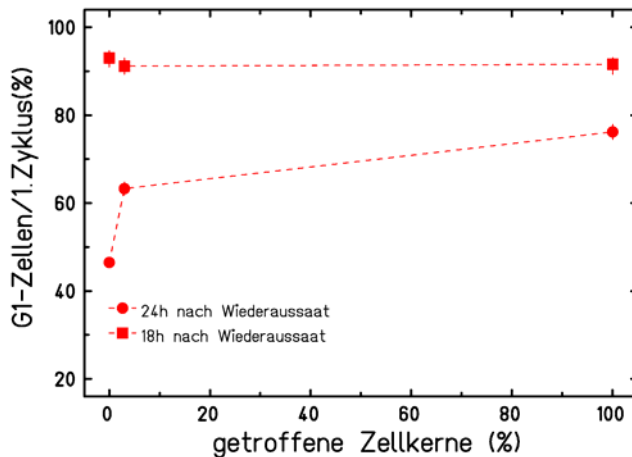


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der G1-Zellen des 1. Zellzyklus 18 und 24 Stunden nach Wiederaussaat in Abhängigkeit der % getroffenen Zellkerne einer Population. Die Werte wurden aus der sofortigen und verzögerten Wiederaussaat von Fibroblasten gemittelt und der SEM berechnet (n=2).

Obwohl die Zellzyklusverteilungen der Kontroll- und Bystanderpopulationen über den Zeitraum des ganzen Experiments betrachtet einen sehr ähnlichen Verlauf zeigten, gab es 24 Stunden nach Wiederaussaat einen Unterschied im Anteil an G₁-Zellen des ersten Zyklus. In Abbildung 18 ist der prozentuale Anteil der G₁-Zellen des ersten Zellzyklus 18 und 24 Stunden nach Wiederaussaat dargestellt. Da die entsprechenden Werte sehr ähnlich waren, wurden die Ergebnisse aus der sofortigen und verzögerten Wiederaussaat gemittelt und der SEM berechnet (n=2). 18 Stunden nach Wiederaussaat zeigte sich kein Unterschied in der Zellzyklusverteilung zwischen den Kontroll- und Bystanderpopulationen. 24 Stunden nach Wiederaussaat zeigte sich jedoch ein anderes Bild: die Zellen der Kontrollpopulation lagen nur noch zu 45 % in der G₁-Phase vor, während sich die Bystanderpopulationen noch zu 60 % in der G₁-Phase befanden und somit gegenüber den Kontrollzellen deutlich verzögert waren. Die Zellen bei denen 98 % der Zellkerne bestrahlt wurden, befanden sich noch zu ca. 80 % in der G₁-Phase.

1.2 Bestrahlung mit Uranionen

Die Induktion der Zellzyklusregulatoren p53 und p21 in Bystanderzellen nach Bestrahlung mit Uranionen wurde in zwei Experimenten untersucht. Die Ergebnisse für die Induktion des Zellzyklusregulators p53 wurden in die Darstellung mit einbezogen, da sich diese im Gegensatz zur Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in Bystanderzellen veränderte. Analog zu den Bestrahlungsexperimenten mit Kohlenstoffionen wurden 1%, 3%, 10% und 98% der Zellkerne einer Population bestrahlt. Dies entsprach aber aufgrund des 100-fach höheren LET-Wertes einer entsprechend 100-fach höheren Dosis (siehe Tabelle 1) pro getroffener Zellkern. Die p53- und p21-Expression wurde 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung mit Hilfe von Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie untersucht. Die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) wurden aus den beiden Bestrahlungsexperimenten ermittelt.

1.2.1 Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21

Wie in Abbildung 19 gezeigt, wurden sowohl für p53 als auch für p21 erhöhte Proteinmengen in den Bystanderpopulationen gefunden. Vor allem 3 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich eine deutliche p21-Induktion (siehe Abbildung 19a). Zu diesem Zeitpunkt war p53 aber nur leicht erhöht, wenn 1 % der Zellkerne getroffen wurde. Für beide Proteine wurde 5 Stunden nach Bestrahlung ein Anstieg beobachtet (siehe Abbildung 19b).

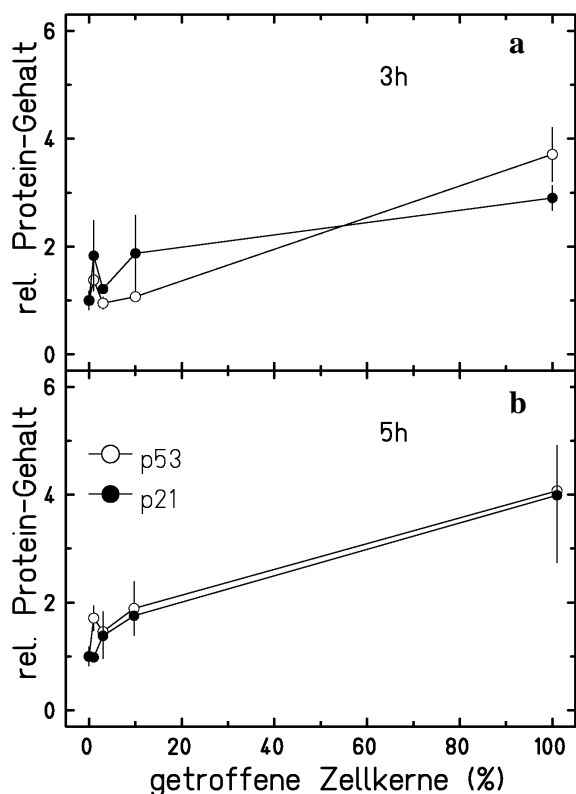


Abbildung 19: Ermittlung der relativen p53 und p21-Expression in humanen Fibroblasten als Funktion der Prozentzahl getroffener Zellkerne 3 (a) und 5 Stunden (b) nach Bestrahlung mit Uranionen; ermittelt über Western-Blot-Analyse; Ermittlung des Standardfehler der Mittelwerte (SEM) aus 2 Bestrahlungsexperimenten (n=2).

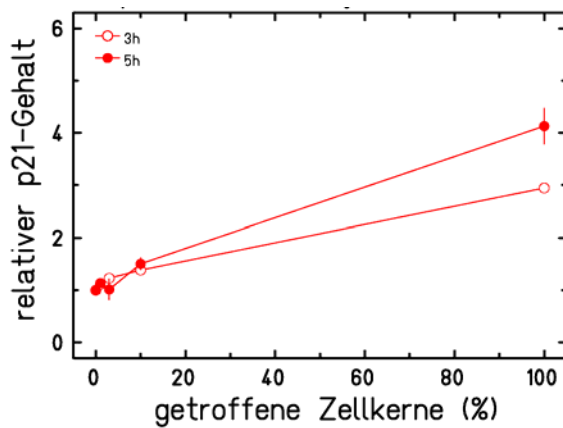


Abbildung 20: Ermittlung der relativen p21-Induktion in humanen Fibroblasten als Funktion der Prozentzahl getroffener Zellkerne nach Bestrahlung mit Uranionen; ermittelt 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung im Durchflusszytometer; Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte (SEM) aus 2 Bestrahlungsexperimenten (n=2).

Die erhöhten Werte für die zelluläre p21-Menge wurden durch die Durchflusszytometrie-Daten bestätigt (siehe Abbildung 20), auch wenn sich hier ebenfalls zeigte, dass die Unterschiede zwischen Kontroll- und Bystanderpopulationen geringer waren als bei der Analyse durch Western-Blot.

2 Lösliche Faktoren als Vermittler von Bystandereffekten in Fibroblasten

In den folgenden Experimenten wurde die Induktion von p21 in Zellen untersucht, die mit bestrahlten Zellen aufgrund des Versuchsaufbaus nur über das Zellkulturmedium Botenstoffe austauschen können. Der Austausch von löslichen Faktoren wird als ein möglicher Mechanismus für Bystandereffekte diskutiert. Über die Induktion von p21 in Akzeptorzellen (AG01522) nach einer Kokultivierung mit röntgenbestrahlten Donorzellen wurde kürzlich berichtet [Yang *et al.*, 2005]. In Anlehnung an das von Yang *et al.* verwendete Protokoll wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit für Röntgenbestrahlung zunächst asynchrone Zellen (siehe *Ergebnisse* 2.1) verwendet. In weiteren Versuchen wurden dann auch konfluente, überwiegend in der G₁-Phase synchronisierte Zellen miteinander verglichen (siehe *Ergebnisse* 2.2). Im Anschluss wurden die Versuche mit Kohlenstoffionen mit konfluenten Zellen durchgeführt (siehe *Ergebnisse* 2.3).

2.1 p21-Expression in asynchronen Bystanderzellen nach Röntgenstrahlung

Konfluente Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten (Donorzellen) und in Zellkultureinsätze (Akzeptorzellen) ausgesät und lagen daher als asynchrone Zellen vor. Die Donorzellen wurden 16 Stunden und 24 Stunden später entweder nicht oder mit 5 Gy Röntgen bestrahlt und direkt anschließend mit den Akzeptorzellen für 5 Stunden kokultiviert. Anschließend wurde die p21-Induktion mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie bestimmt.

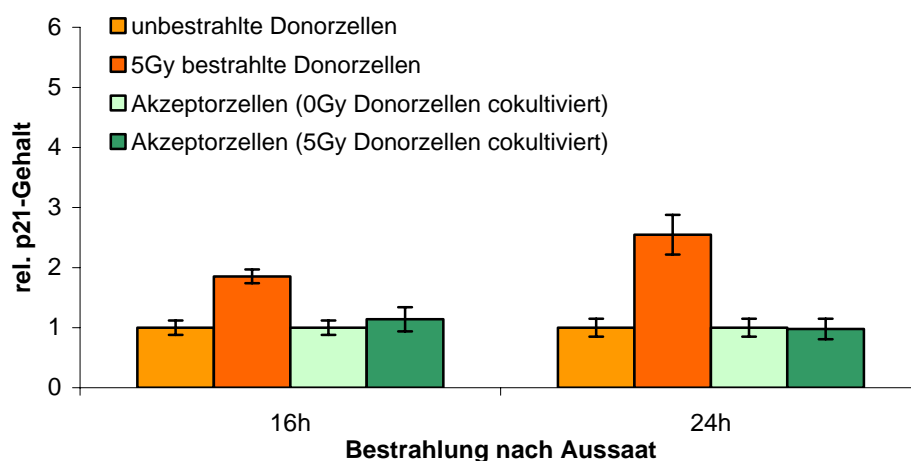


Abbildung 21: Relativer p21-Gehalt von Donorzellen (Fibroblasten) sowie kokultivierten Akzeptorzellen (Fibroblasten). Konfluente Zellen wurden 16 oder 24 Std. vor Bestrahlung ausgesät. Die Donorzellen in 6-Well-Zellkulturplatten (10000 Zellen/cm²) wurden mit 0 Gy und 5 Gy Röntgen bestrahlt und anschließend für 5 Stunden mit unbestrahlten Akzeptorzellen (15000 Zellen/cm²) kokultiviert. Bestimmung der p21-Induktion mit Hilfe von Western-Blot-Analyse. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte bei 24 Stunden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Bestimmungen (n=3). Bei 16 Stunden aus einem Experiment mit jeweils 3 Bestimmungen (n=3).

Die Ermittlung der p21-Induktion mit Hilfe beider Methoden (siehe Abbildung 21 und 22) ergab übereinstimmend und unabhängig vom Zeitpunkt der Aussaat, dass in den mit 5 Gy bestrahlten Donorzellen p21 deutlich induziert wurde. In den Akzeptorzellen wurde keine Veränderung des intrazellulären p21-Gehalts festgestellt.

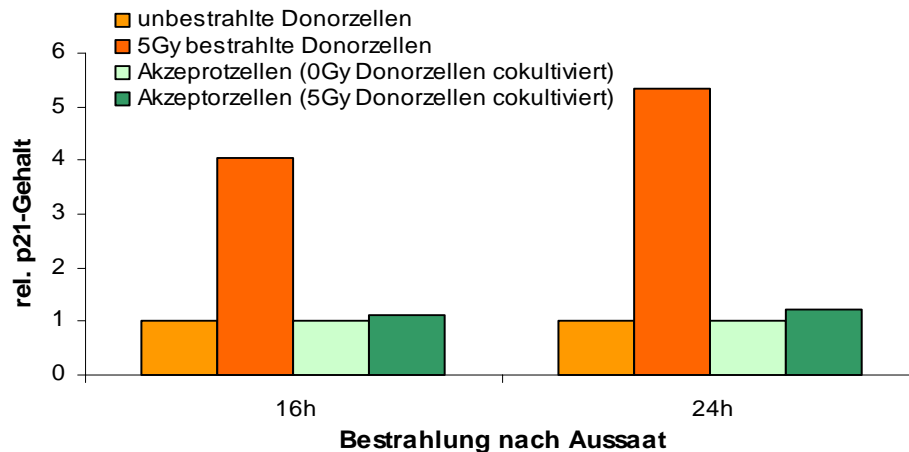


Abbildung 22: Relativer p21-Gehalt von unbestrahlten und direkt bestrahlten Donorzellen (Fibroblasten) sowie kokultivierten, unbestrahlten Akzeptorzellen (Fibroblasten). Konfluente Zellen wurden 16 oder 24 Std. vor Bestrahlung ausgesät. Die Donorzellen in 6-Well-Zellkulturplatten (10000 Zellen/cm²) wurden mit 0 Gy und 5 Gy Röntgen bestrahlt und anschließend für 5 Stunden mit unbestrahlten Akzeptorzellen (15000 Zellen/cm²) kokultiviert. Bestimmung der p21-Induktion von Einzelproben über Durchflusszytometrie.

Die Ermittlung der p21 Induktion mittels Durchflusszytometrie erlaubte die gleichzeitige Bestimmung der Zellzyklusverteilung. Diese ist in Abbildung 23 für die Donorzellen gezeigt. Die Zellen befanden sich entweder zu einem hohen Anteil in der S-Phase (16 Stunden) oder in der G₂-Phase (24 Stunden). Der zelluläre p21-Gehalt und auch die Induktion des Proteins sind in keiner Zellzyklus-Phase so deutlich wie in der G₁-Phase [Cai & Dynlacht, 1998]. Deshalb wurde in der Auswertung der Durchflusszytometrie nur der p21-Gehalt der G₁-Zellen berücksichtigt. Es ergaben sich aber die gleichen Verteilungen wie für die gesamte Population (hier nicht gezeigt).

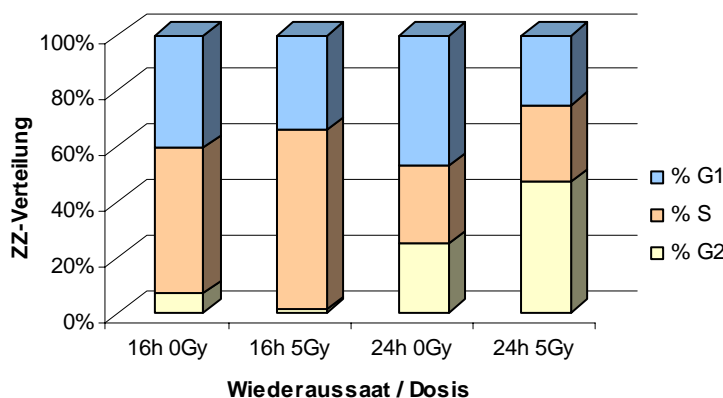


Abbildung 23: Zellzyklusverteilung unbestrahlter und mit 5 Gy Röntgen bestrahlter Fibroblasten 5h nach Bestrahlung. Wiederaussaat der Zellen 16 und 24 Stunden vor der Bestrahlung aus einer konfluente Kultur.

2.2 p21-Expression in konfluenten Bystanderzellen nach Röntgenstrahlung

Um zu vermeiden, dass die p21-Induktion in den Donor- und Akzeptorzellen nicht vergleichbar ist wegen Unterschieden in der Zellzyklus-Verteilung (siehe *Ergebnisse* 2.1), wurde ein weiteres Röntgenexperiment mit konfluenten Zellen durchgeführt. Diese waren zum Aufarbeitungszeitpunkt zu 70% in der G₁-Phase synchronisiert. Außerdem sollten die Röntgenexperimente mit Ionenbestrahlungen vergleichbar sein, die mit konfluenten Zellen durchgeführt wurden (siehe *Ergebnisse* 1.1, 1.2 und 2.3).

Die synchronisierten Donorzellen wurden entweder nicht oder mit 0,5 Gy und 5 Gy Röntgen bestrahlt und für 3 und 5 Stunden mit den Akzeptorzellen kokultiviert. Dann wurde die Induktion des Proteins p21 parallel über Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie bestimmt.

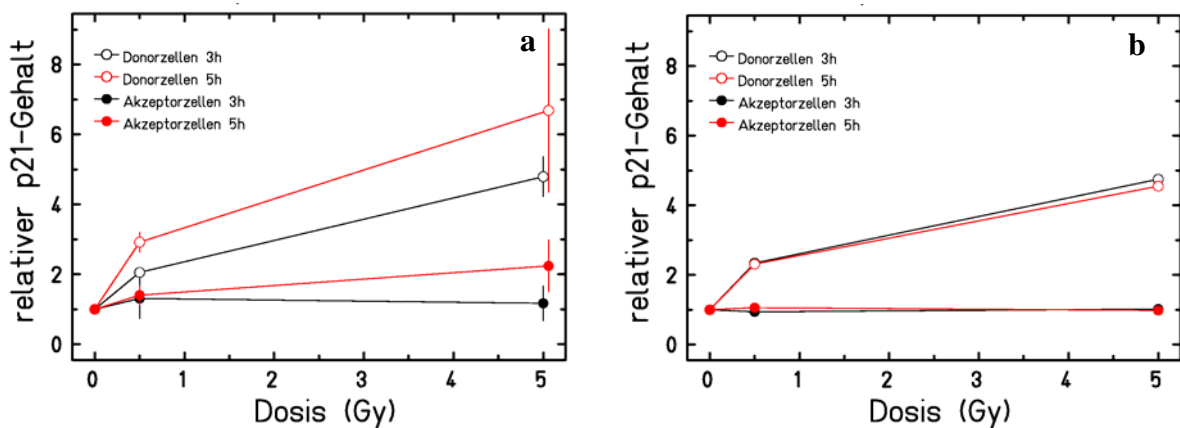


Abbildung 24: Relative p21-Induktion in Donor- und Akzeptorzellen. Synchronisation zu 70 % in der G₁-Phase. Bestrahlung der Akzeptorzellen mit 0 Gy, 0,5 Gy und 5 Gy Röntgenstrahlen. Bestimmung der p21 Induktion 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung mit Hilfe von Western-Blot-Analyse (a) und Durchflusszytometrie (b). Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte (n=3).

Auch für synchrone, bestrahlte Donorzellen zeigte sich mit beiden Methoden eine deutliche p21 Induktion (siehe Abbildung 24a und b). Für die Akzeptorzellen zeigte sich zumindest in der Western-Blot-Analyse ein von den Ergebnissen für asynchrone Zellen abweichendes Bild: der intrazelluläre p21-Gehalt war 5 Stunden nach Beginn der Kokultivierung mit bestrahlten Donorzellen etwa doppelt so hoch wie nach Kokultivierung mit unbestrahlten Donorzellen.

2.3 p21-Expression in konfluenten Bystanderzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Die Beobachtung, dass nach Röntgenbestrahlung für synchrone Zellen eine leicht erhöhte p21-Induktion in Akzeptorzellen gefunden wurde, führte zu der Frage, ob die Bestrahlung von Donorzellen mit Kohlenstoffionen ebenfalls zu einer mediumvermittelten p21-Induktion in Akzeptorzellen führt. Der Versuchsaufbau war der gleiche wie im Röntgenversuch, nur wurden für Kohlenstoffionen bei der Bestrahlung der Donorzellen auch die sehr niedrigen Dosen bzw. Fluenzen einbezogen, bei denen nur 1% bis 10% der Donorzellen bestrahlt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur die Bestimmung der p21-Induktion mit Hilfe von Durchflusszytometrie berücksichtigt werden. Wie in Abbildung 25a dargestellt, ergaben sich für die Donorzellen im Dosisbereich zwischen 0,544 Gy und 5,44 Gy sowohl 3 als auch 5 Stunden nach Bestrahlung deutlich höhere Werte für die p21-Induktion als in den Kontrollzellen. In Abbildung 25b ist der Niedrig-Dosisbereich gezeigt. Hier ist deutlich zu sehen, dass in den Donorzellen, von denen nur 3 % bestrahlt wurden, eine erhöhte p21-Induktion zu sehen war. In den Akzeptorzellen wurde im Gegensatz dazu weder 3 Stunden noch 5 Stunden nach Beginn der Kokultivierung mit den Donorzellen eine erhöhte p21-Induktion gemessen.

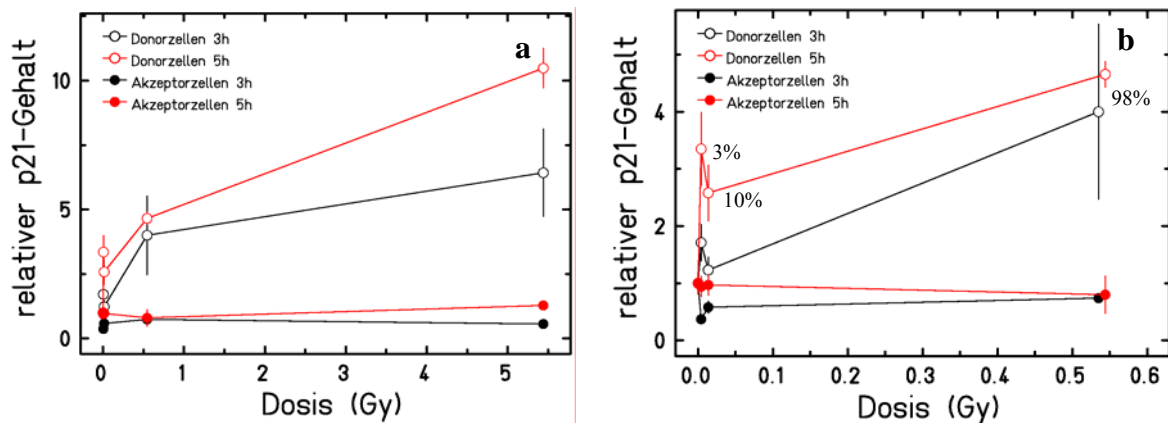


Abbildung 25: Fluoreszenzmessung der p21-Induktion in Donor- und Akzeptorzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Durchflusszytometrie). (a) Dosisbereich von 0,0014 Gy bis 5,44 Gy Kohlenstoff (b) Dosisbereich von 0,0014 Gy bis 0,544 Gy Kohlenstoff (entsprechend % getroffene Zellkerne sind eingezeichnet). Inkubation für jeweils 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung. Normierung des relativen Fluoreszenzsignals auf die Kontrolle. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte ($n=2$).

Abschließend kann festgehalten werden, dass zwar keine durch lösliche Faktoren vermittelte p21-Induktion in den Akzeptorzellen nach Bestrahlung der Donorzellen mit Kohlenstoff nachgewiesen werden konnte, jedoch auch in diesen Versuchen in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 1.1 geschilderten Ergebnissen eine erhöhte p21-Induktion in direkt bestrahlten Populationen beobachtet wurde, in denen nur 3 % der Zellkerne getroffen wurden.

3 Überleben von unbestrahlten Fibroblasten nach Kultivierung mit dem Zellkulturüberstand von mit Röntgenbestrahlten Keratinozyten

Um einen durch lösliche Faktoren vermittelten Effekt auf das Überleben von Fibroblasten zu untersuchen, wurden immortalisierte Keratinozyten der Zelllinie HaCaT als Donorzellen eingesetzt. Mothersill und Seymour [1997] fanden bereits bei Verwendung der gleichen Keratinozyten als Donorzellen eine Verminderung des Überlebens von unbestrahlten humanen Fibroblasten, nachdem Zellkulturmedium von bestrahlten Donorzellen zu unbestrahlten Fibroblasten transferiert worden war. Dies war allerdings nur bei Verwendung von Keratinozyten als Donorzellen deutlich, nicht wenn Fibroblasten als Donorzellen eingesetzt wurden.

In dem hier vorliegenden Experiment wurden normale Fibroblasten (AG01522) eingesetzt, während Mothersill und Seymour [1997] eine etablierte Linie (humane MSU-1 Fibroblasten, immortalisiert aber nicht-tumorigen) verwendet haben. In allen weiteren Punkten wurde das von Mothersill und Seymour verwendete Protokoll übernommen. Da die Keratinozyten in der GSI neu etabliert wurden, setzte deren Verwendung als Donorzellen eine genauere Kenntnis des Wachstumsverhaltens voraus, um am Tag des Experiments eine subkonfluente Kultur zu erhalten.

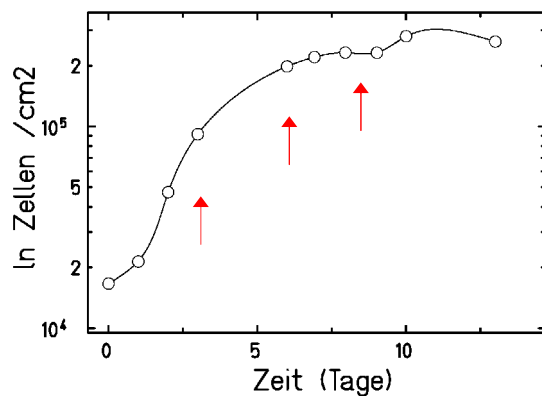


Abbildung 26: Zellwachstum von HaCaT (Keratinozyten). Kultivierung der Zellen in 35 mm Petrischalen und Bestimmung der Zellzahl im CASY-Zellzählgerät. Darstellung des Zellwachstums als Zellen/cm². Mediumwechsel sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In Abbildung 26 ist das Zellwachstum der Keratinozyten (Zellen/cm²) über die Zeit (Tage) dargestellt. Die exponentielle Phase beginnt circa zwei Tage nach Einsaat von 17000 Zellen/cm². Die Zellen wachsen nach Erreichen eines konfluenten Monolayers mehrschichtig. Sie erreichen nach 9-10 Tagen einen G₁-Phase-Anteil von 75 %. In Abbildung 27 ist das Überleben von Fibroblasten dargestellt (Zahlenwerte in Tabelle 3), die 1 Stunde nach Bestrahlung mit dem Medium von unbestrahlten oder mit 5Gy Röntgen bestrahlten Keratinozyten überschichtet wurden. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Fibroblasten, auf deren Plattierungseffizienz die Überlebenswerte bezogen wurden. Außerdem wurde das Überleben von mit 5 Gy Röntgen bestrahlten Fibroblasten parallel mitbestimmt.

Tabelle 3: Überleben von AG01522 Zellen (Fibroblasten) nach Bestrahlung mit 5Gy Röntgen oder Transfer des Mediums von unbestrahlten und mit 5Gy Röntgen bestrahlten HaCaT-Zellen (Keratinozyten). Die Überlebenswerte (S) wurde auf die Plattierungseffizienz (PE) unbestrahlter Fibroblasten bezogen (S/PE). Alle Zellen wurden 9 Tage ohne einen weiteren Mediumwechsel kultiviert, anschließend gefärbt (Methylenblau) und die Koloniezahl bestimmt (1 Kolonie \geq 50 Zellen). Die Fibroblasten wurden entweder direkt bestrahlt oder mit konditioniertem Medium von unbestrahlten und bestrahlten HaCaT-Zellen kultiviert. Zu diesem Zweck wurden die HaCaT-Zellen bestrahlt, für 1 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend der Zellkulturüberstand abgenommen, sterilfiltriert und auf unbestrahlte Fibroblasten gegeben.

¹⁾ Ausplattierungseffizienz (PE) der unbestrahlten Kontrollzellen betrug $0,10 \pm 0,01$ (13%)

Das relative Überleben (S) wurde aus der Anzahl der ausplattierten Zellen und der bestimmten Koloniezahl bestimmt. (S/PE) = normiertes Überleben \pm SEM (Standardfehler der Mittelwerte, n= 3 oder 4).

Zelllinie	S	(S/PE) \pm SEM
Unbestrahlte AG ¹⁾	0,10	1 \pm 0,130
5Gy bestrahlte AG	0,0034	0,034 \pm 0,013
AG + Medium unbestrahlter HaCaT	0,09	0,900 \pm 0,090
AG + Medium 5Gy bestrahlter HaCaT	0,09	0,900 \pm 0,108

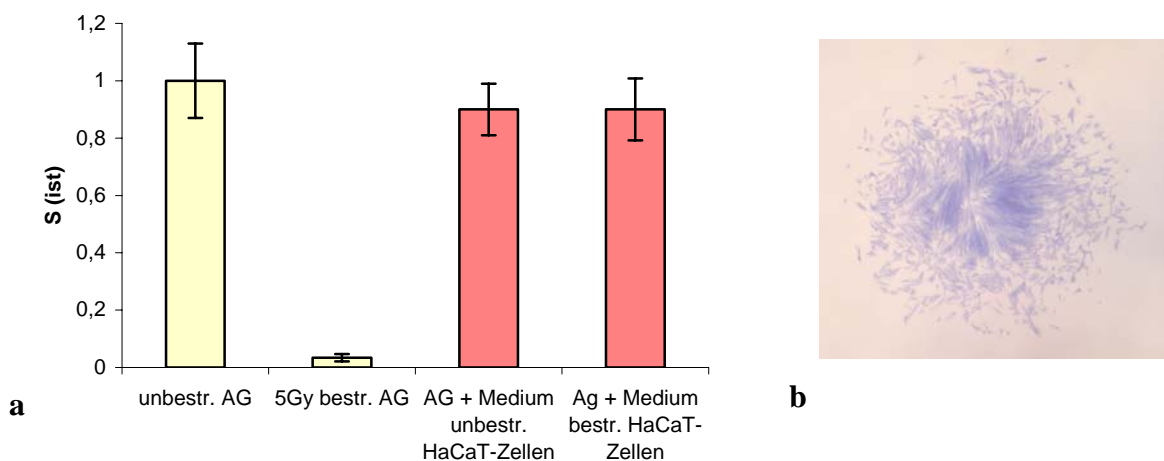


Abbildung 27: (a) Überleben für Fibroblasten der Zelllinie AG01522 nach direkter Röntgenbestrahlung mit 5Gy oder nach Transfer des Mediums von unbestrahlten und 5Gy Röntgen bestrahlten Keratinocyten der Zelllinie HaCaT. Als Kontrolle wurde die Plattierungseffizienz unbestrahlter Fibroblasten parallel bestimmt. Die HaCaT-Zellen wurden bestrahlt, für 1 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend der Zellkulturüberstand abgenommen, sterilfiltriert und auf unbestrahlte Fibroblasten gegeben. Diese wurden weitere 9 Tage bei 37°C ohne erneuten Mediumwechsel kultiviert. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte (n= 3 oder 4). (b) Methylenblau-gefärbte Fibroblasten für die Bestimmung der Koloniezahl (1 Kolonie \geq 50 Zellen).

Das Überleben der mit 5 Gy Röntgen direkt bestrahlten Fibroblasten wurde auf 3,4 % im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen reduziert. Der Transfer des Mediums von Keratinocyten reduzierte das Überleben der Fibroblasten im Verhältnis zu den Kontrollzellen um 10 %, allerdings unabhängig von der Bestrahlung der Keratinocyten. Es konnten also keine Einflüsse von löslichen Faktoren auf das Überleben unbestrahlter Fibroblasten festgestellt werden, die mit dem Zellkulturüberstand von bestrahlten Keratinocyten kultiviert worden waren.

4 Strahleninduzierte Bildung von intrazellulären Radikalen

Die intrazelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Bystanderzellen wird als ein möglicher Bestandteil der Prozesse, die zu Bystandereffekten führen, diskutiert. Daher wurde die intrazelluläre ROS-Bildung nach Bestrahlung untersucht. Dazu musste zuerst ein entsprechendes Testverfahren etabliert werden (siehe *Material und Methoden* 6).

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine Endkonzentration des DCF von 25 μM die höchsten Fluoreszenzwerte ergab. Außerdem mussten für die Versuche 6-Well-Zellkulturplatten ausgesucht werden, die eine geringe Eigenfluoreszenz besitzen. Die Untersuchung der unspezifischen Fluoreszenz von unbeladenen Zellen ergab, dass sie sich mit Bestrahlung nicht veränderte. Die Fluoreszenz von mit DCF-Lösung beladenen, aber unbestrahlten Fibroblasten war um den Wert 2,2 höher als die Werte von unbeladenen Zellen. Um den Einfluss von Strahlung auf den Farbstoff zu untersuchen, wurde 25 μM DCF (in PBS gelöst) bestrahlt und anschließend die Fluoreszenz zusammen mit unbestrahltem 25 μM DCF (in PBS gelöst) gemessen (siehe Abbildung 28). Die Fluoreszenzwerte waren mit und ohne Bestrahlung gleich und entsprachen dem Wert für PBS. Als Leerwert wurde die Fluoreszenz der 6-Well-Platten mit PBS bestimmt. In allen weiteren Bestrahlungsexperimenten erfolgte die Beladung mit DCF jeweils direkt vor Messung der Fluoreszenz.

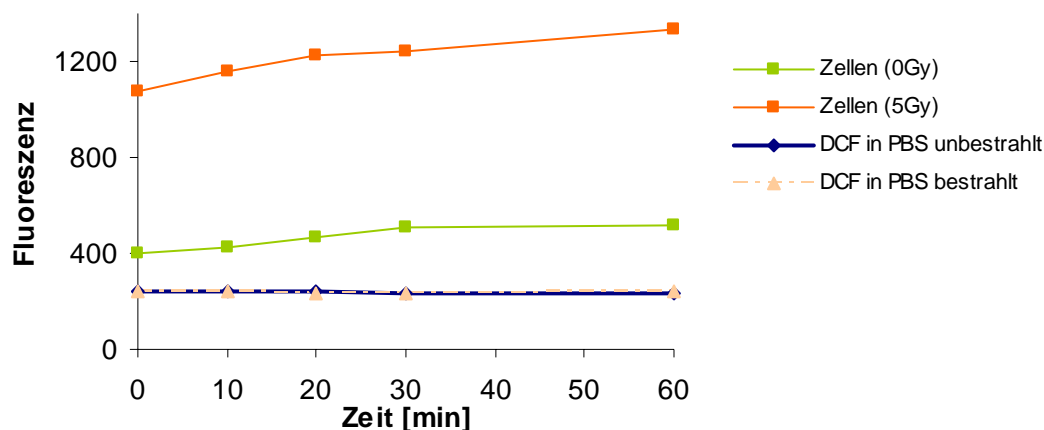


Abbildung 28: Bestimmung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgen mit Hilfe des Dichlorofluorescein (DCF)-Fluoreszenz-Test. Beladung der Zellen mit einer Zelldichte von 5500 Zellen/cm² mit 25 μM DCF (in PBS gelöst) 30 min. vor Bestrahlung. Messung der intrazellulären Fluoreszenz direkt nach und bis 60 Minuten nach Bestrahlung (Anregungswellenlänge 485 nm).

Die Bestimmung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in unbestrahlten und mit 5 Gy Röntgen bestrahlten Fibroblasten ist in Abbildung 28 dargestellt. Nach Bestrahlung der beladenen Zellen konnte eine Fluoreszenzerhöhung um den Faktor 2,6 im Vergleich zur beladenen

Kontrolle gemessen werden (ohne Abzug des Leerwertes). Ein Bestrahlungseffekt für die gewählte Röntgendosis konnte also klar gezeigt werden. Durch die Messung der Fluoreszenz über einen Zeitintervall von 1 Stunde konnte beobachtet werden, dass die Autooxidation des Farbstoffes bei den beladenen Zellen durch Licht und Sauerstoff konstant, aber für alle Proben gleichmäßig zunimmt.

Um die Sensitivität des DCF-Fluoreszenztests zu ermitteln, wurden Fibroblasten unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlung (zwischen 0,25 und 5 Gy), unter besonderer Berücksichtigung niedriger Dosen, ausgesetzt. Anschließend wurde die Fluoreszenz bestimmt (siehe Abbildung 29).

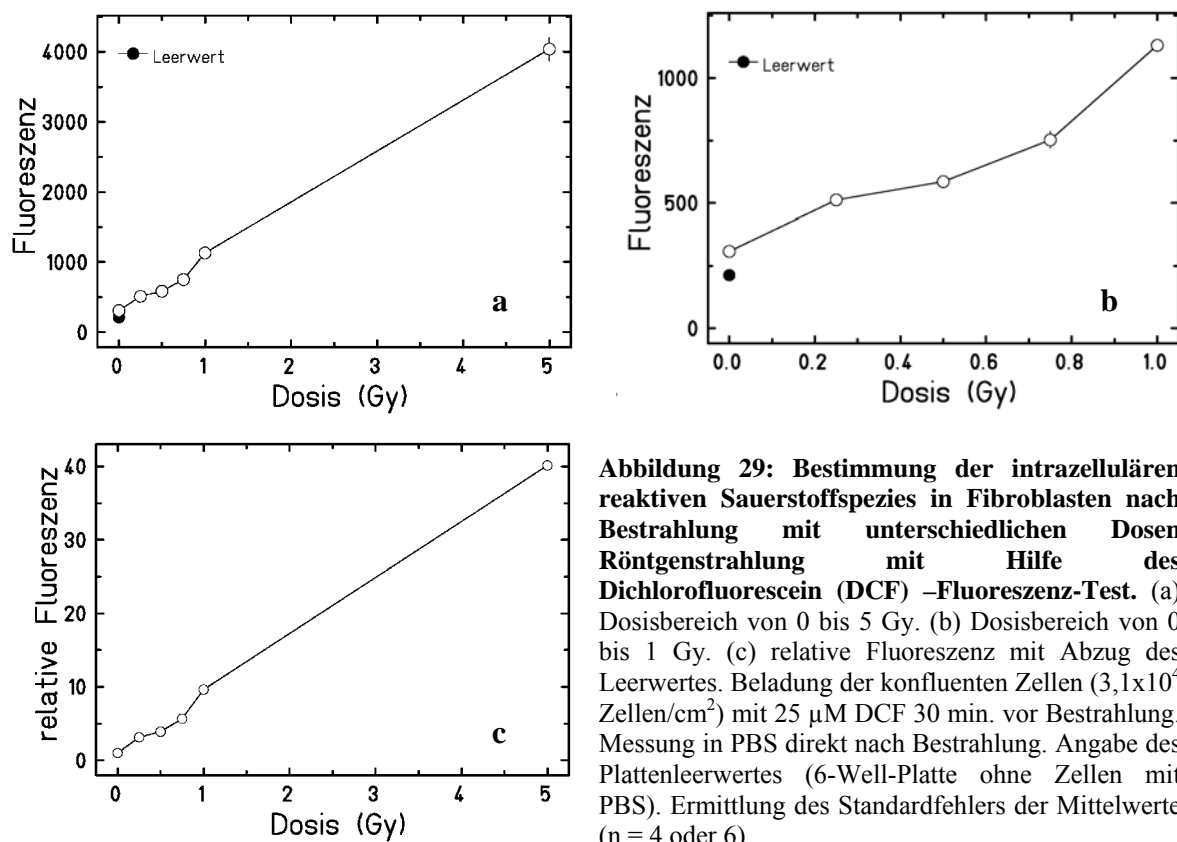


Abbildung 29: Bestimmung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlung mit Hilfe des Dichlorofluorescein (DCF) –Fluoreszenz-Test. (a) Dosisbereich von 0 bis 5 Gy. (b) Dosisbereich von 0 bis 1 Gy. (c) relative Fluoreszenz mit Abzug des Leerwertes. Beladung der konfluenten Zellen ($3,1 \times 10^4$ Zellen/cm²) mit 25 μ M DCF 30 min. vor Bestrahlung. Messung in PBS direkt nach Bestrahlung. Angabe des Plattenleerwertes (6-Well-Platte ohne Zellen mit PBS). Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte ($n = 4$ oder 6).

Die Fluoreszenzintensität der bestrahlten Zellen verhielt sich annähernd linear zur bestrahlten Röntgendosis. Wie aus Abbildung 29 b klar hervorgeht, konnten intrazellulär gebildete ROS nach Bestrahlung mit sehr niedrigen Dosen (0,25 Gy) nachgewiesen werden. Der ausgewiesene Messbereich des Testes ermöglicht die Bestimmung einer Fluoreszenzänderung mindestens bis zu einer 20fach höheren Dosis (5 Gy). Da für die intrazelluläre ROS-Bildung nach Bestrahlung mit schweren Ionen bis jetzt keine eigenen Messwerte und nur wenige, nicht direkt vergleichbare publizierte Daten vorliegen, war die Bestimmung der Sensitivität und der Größe des Messbereiches eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz des DCF-Testes zu diesem Zweck.

In einem Beschleunigerexperiment wurde die intrazelluläre ROS-Bildung nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen untersucht. Gemessen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung, nach

3 Stunden und nach 3 Tagen. Die Fluenzen wurden so gewählt, dass 3%, 10% und 98% der Zellkerne des konfluenten Monolayers (61000 Zellen/cm²) bestrahlt wurden.

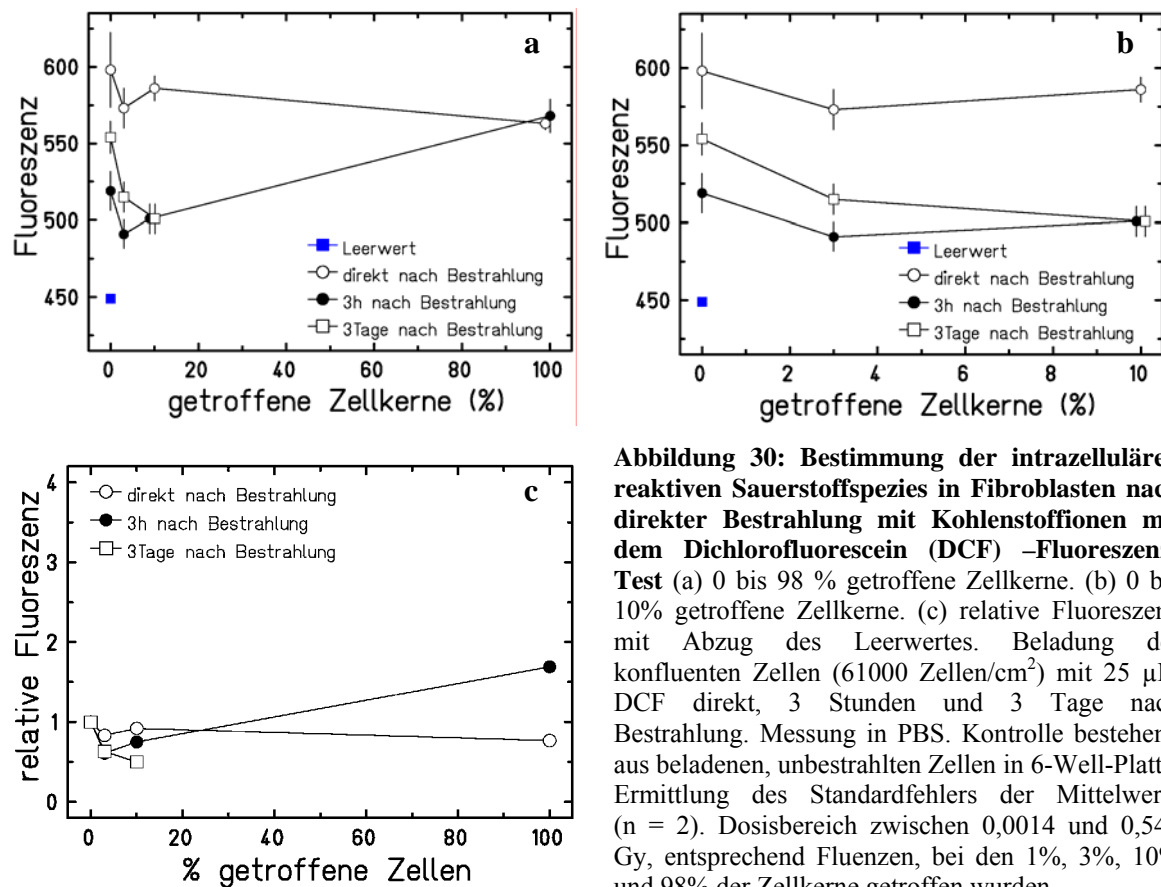


Abbildung 30: Bestimmung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten nach direkter Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit dem Dichlorofluorescein (DCF) –Fluoreszenz-Test (a) 0 bis 98 % getroffene Zellkerne. (b) 0 bis 10% getroffene Zellkerne. (c) relative Fluoreszenz mit Abzug des Leerwertes. Beladung der konfluenten Zellen (61000 Zellen/cm²) mit 25 µM DCF direkt, 3 Stunden und 3 Tage nach Bestrahlung. Messung in PBS. Kontrolle bestehend aus beladenen, unbestrahlten Zellen in 6-Well-Platte. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte (n = 2). Dosisbereich zwischen 0,0014 und 0,544 Gy, entsprechend Fluenzen, bei den 1%, 3%, 10% und 98% der Zellkerne getroffen wurden.

In Abbildung 30 ist die Bildung der intrazellulären ROS nach direkter Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in Abhängigkeit von der Prozentzahl an getroffenen Zellkernen dargestellt. Es konnte kein Anstieg der intrazellulären ROS beobachtet werden, und zwar weder direkt nach der Bestrahlung noch nach 3 Stunden und 3 Tagen (siehe Abbildung 30a und b). Die Fluoreszenz normiert auf die Kontrollzellen ist in Abbildung 30c gezeigt. Daraus geht hervor, dass es nur in der Population mit 98 % bestrahlten Zellkernen 3 Stunden nach Bestrahlung zu einer Erhöhung der Fluoreszenz um den Faktor 2 kommt.

In einem weiteren Experiment wurde die Auswirkung von einer Bestrahlung mit Uranionen auf die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies untersucht. Wie in Abbildung 31 gezeigt, konnte für fast keine Populationen ein erhöhter Anstieg der Fluoreszenzintensität im Zeitraum von 1 bis 5 Stunden nach Bestrahlung mit Uranionen nachgewiesen werden.

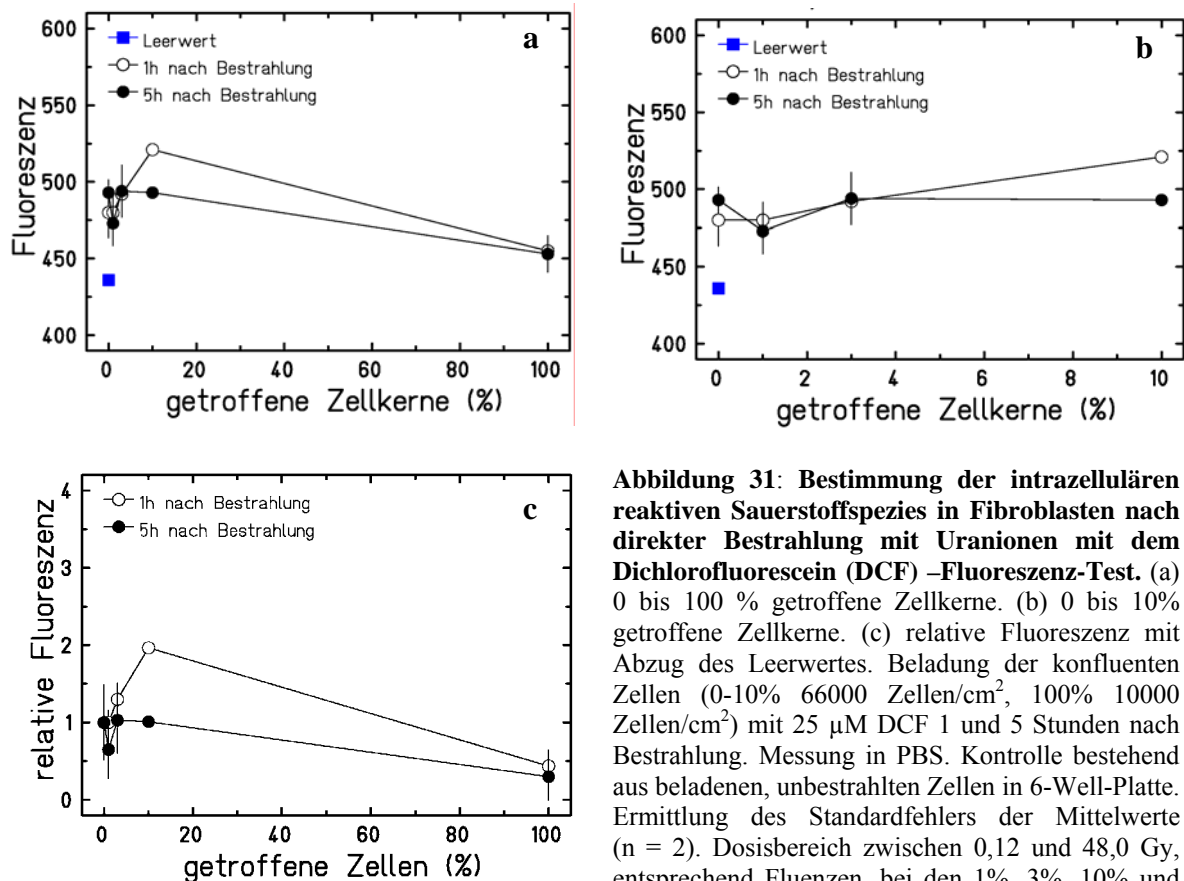


Abbildung 31: Bestimmung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten nach direkter Bestrahlung mit Uranionen mit dem Dichlorofluorescein (DCF)-Fluoreszenz-Test. (a) 0 bis 100 % getroffene Zellkerne. (b) 0 bis 10% getroffene Zellkerne. (c) relative Fluoreszenz mit Abzug des Leerwertes. Beladung der konfluenten Zellen (0-10% 66000 Zellen/cm², 100% 10000 Zellen/cm²) mit 25 µM DCF 1 und 5 Stunden nach Bestrahlung. Messung in PBS. Kontrolle bestehend aus beladenen, unbestrahlten Zellen in 6-Well-Platte. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte (n = 2). Dosisbereich zwischen 0,12 und 48,0 Gy, entsprechend Fluenzen, bei den 1%, 3%, 10% und 98% der Zellkerne getroffen wurden.

Die Ausnahme ist die Population, bei der 10 % der Zellkerne einer Population getroffen wurde, deren ROS-induzierte Fluoreszenz um den Faktor 2 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erhöht ist. Der Anstieg setzt sich bei einem Anteil von 98 % bestrahlten Zellkernen nicht fort. Die Zellzahl war allerdings für diesen Wert niedriger als in allen anderen Proben (0-10 % 66000 Zellen/cm², 98 % 10000 Zellen/cm²).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Vergleich zu Röntgenbestrahlung zu keiner deutlich erhöhten intrazellulären ROS-Bildung nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen kommt. Dies gilt sowohl für die Populationen, in denen alle Zellen bestrahlt wurden als auch für diejenigen, die sich vor allem aus Bystanderzellen zusammensetzen.

In den folgenden Versuchen wurde die mediumvermittelte Bildung von ROS in unbestrahlten Fibroblasten durch Cokultivierung untersucht (verwendetes System siehe *Material und Methoden* 2.4). Ausgangspunkt hierfür war die Hypothese, dass bestrahlte Zellen lösliche Faktoren bilden, die nach Diffusion im Medium in unbestrahlten Zellen Reaktionen hervorrufen, die die Bildung von intrazellulären Radikalen einschließt [Iyer & Lehnert, 2000]. Hierzu wurden Donorzellen mit Kohlenstoff- und Uranionen bestrahlt und anschließend mit Akzeptorzellen kokultiviert. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurden die Akzeptorzellen mit DCF-Lösung beladen und die Fluoreszenz bestimmt.

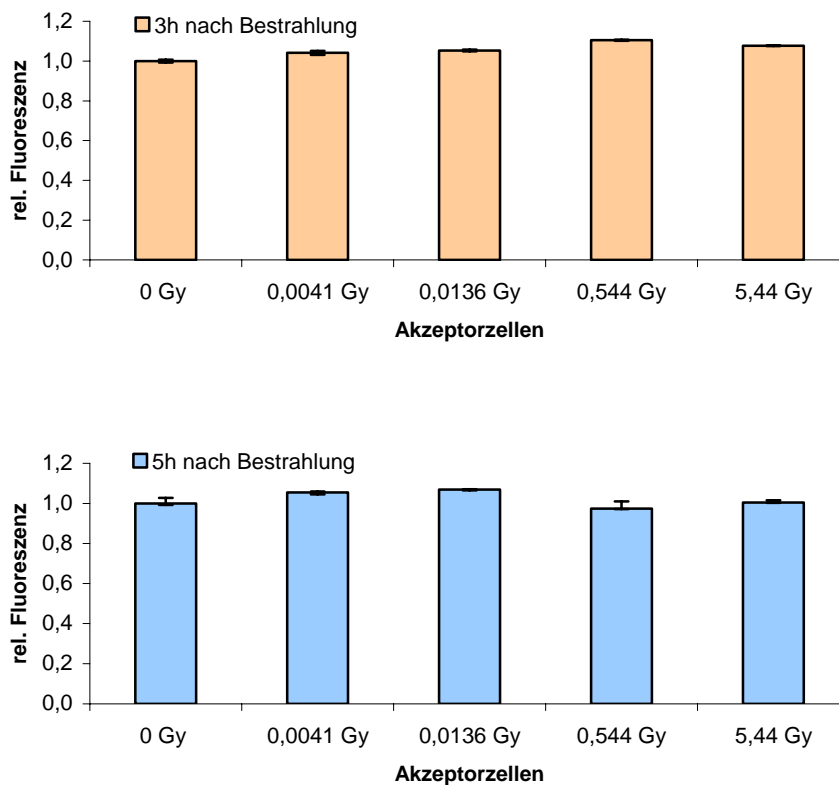


Abbildung 32: Bestimmung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in Akzeptorzellen (Fibroblasten) nach Cokultivierung mit Donorzellen, die mit Kohlenstoffionen bestrahlt worden waren (0,0041 Gy bis 5,44 Gy) mit dem Dichlorofluorescein (DCF)-Fluoreszenz-Test. Normiert auf die Kontrolle. Beladung der konfluenten Zellen mit 25 μm DCF-Farbstoff 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung. Messung in PBS. Kontrolle bestehend aus beladenen, unbestrahlten Zellen in 6-Well-Platte. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte ($n = 2$).

Wie in Abbildung 32 dargestellt ist, kommt es zu den dort gezeigten Zeitpunkten nach Bestrahlung der Donorzellen mit Kohlenstoffionen zu keiner vermehrten ROS-Bildung in den Akzeptorzellen. Nicht gezeigt sind die Werte für eine Inkubationsdauer von 1, 2 und 3 Tagen, die für die Akzeptorzellen ebenfalls nicht erhöht waren. Aus Abbildung 33 geht hervor, dass es auch für Uranionen zu keinem gemessenen Zeitpunkt nach Bestrahlung der Donorzellen zu einer vermehrten ROS-Bildung in den Akzeptorzellen kommt.

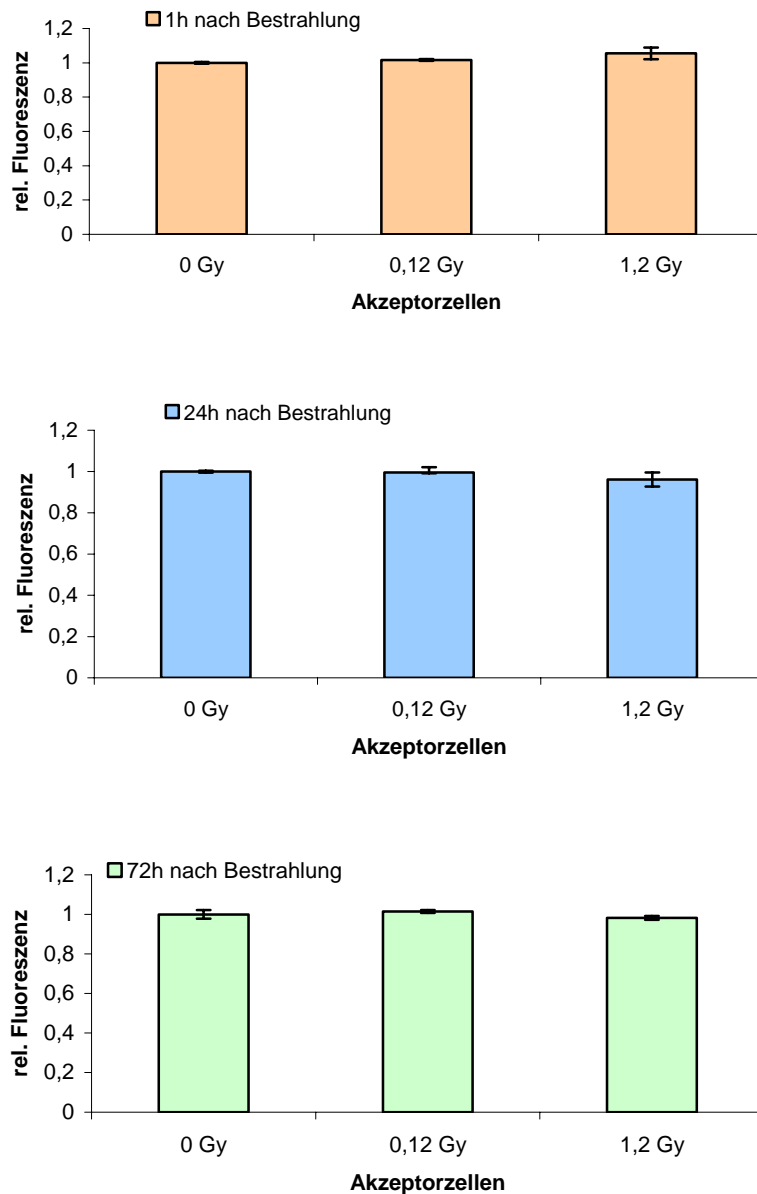


Abbildung 33: Vorkommen intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Akzeptorzellen (Fibroblasten) nach Cokultivierung mit Donorzellen, die vorher mit Uranionen bestrahlt worden waren (0,12 und 1,2 Gy). Messung der Fluoreszenz über den Dichlorofluorescein (DCF) –Fluoreszenz-Test. Beladung der Zellen (4800 Zellen/cm²) mit 25 µm DCF nach 1, 24 und 72 Stunden Inkubation. Messung in PBS-Farbstoff-Lösung. Kontrolle wurde mit unbestrahlten Donorzellen cokultiviert und parallel behandelt. Ermittlung des Standardfehlers der Mittelwerte (n=2)

Zusammenfassend lässt sich für Kohlenstoff- und Uranionen sagen, dass es in Bystanderzellen direkt nach Bestrahlung nicht, wenige Stunden nach Bestrahlung aber zu einer leichten Erhöhung der ROS-Menge kam. Es konnte für die untersuchten Zeitpunkte bis zu 3 Tagen nach Bestrahlung keine ROS-Bildung durch Vermittlung löslicher Faktoren festgestellt werden.

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte biologische Effekte in Zellen zu untersuchen, die selbst unbestrahlt waren, sich aber in Kontakt zu Zellen befanden, die dicht-ionisierender Strahlung (Kohlenstoff- und Uranionen) ausgesetzt worden waren. Die biologischen Reaktionen in den unbestrahlten Zellen werden unter dem Begriff „Bystandereffekte“ zusammengefasst und sind bereits für verschiedene Arten von Photonenstrahlen sowie Protonen, Heliumionen und α -Teilchen in den verschiedensten Zellsystemen beschrieben. In welchem Maße Bystandereffekte durch dichter ionisierende Strahlung hervorgerufen werden können, ist bisher unzureichend untersucht [Übersicht in Prise *et al.*, 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Klärung dieser Frage geleistet werden. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Untersuchung der Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p21 gelegt. Außerdem wurde die Auswirkung einer veränderten Expression in Bystanderzellen auf deren Zellzyklusverteilung überprüft.

Basierend auf den verschiedenen bekannten Formen von Zell-Zell-Kommunikation, stehen im Wesentlichen zwei Hypothesen zu den Mechanismen der bislang beobachteten Bystandereffekte zur Diskussion. Einerseits gibt es Hinweise auf einen Signaltransfer über Membrankanäle (gap junctions), der nur bei direktem Kontakt zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen auftritt. Andererseits werden lösliche Faktoren, die von den bestrahlten Zellen sekretiert werden und über das Medium zu den unbestrahlten Zellen diffundieren, als Signalübermittler angesehen [Übersicht in Hall, 2003]. Ziel dieser Arbeit war es ebenfalls, Hinweise zur Relevanz dieser möglichen Mechanismen speziell nach dicht-ionisierender Strahlung zu erhalten. In diesem Rahmen wurde auch die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) untersucht, die an der zellulären Antwort in Bystanderzellen beteiligt sein könnten.

In welchem Maße Bystandereffekte nach dicht-ionisierender Strahlung in unbestrahlten Zellen auftreten und welche Mechanismen zugrunde liegen, ist im Rahmen des zunehmenden Einsatzes von Kohlenstoffionen in der Tumorthherapie von besonderem Interesse. Dabei ergibt sich auch die Frage, inwieweit Interaktionen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen verschiedenen Typs in den Randbereichen zum bestrahlten Gewebe eine Bystander-Antwort hervorrufen können. Da eine solche Interaktion *in vitro* zwischen bestrahlten Epithelzellen und unbestrahlten Fibroblastenzellen für das klonogene Überleben nach Röntgenbestrahlung bereits beschrieben ist [Mothersill und Seymour, 1997], wurden diese Beobachtungen für die Fibroblasten überprüft, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

1 Zellzykluseffekte in konfluenten Bystanderzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Veränderungen in der Expression von Zellzyklusregulatoren (p53, p21) in Bystanderzellen und deren Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung einzelner Zellen mit Kohlenstoff- und Uranionen untersucht. Die bestrahlten und unbestrahlten Zellen befanden sich in direktem Kontakt zueinander, wodurch sowohl eine Kommunikation durch den direkten Kontakt zwischen den Zellen (evtl. über gap-junctions) als auch eine Vermittlung über lösliche Faktoren als Beitrag zu Bystandereffekten in Frage kommt.

Nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen keine signifikant erhöhte intrazelluläre Menge an p53 in Bystanderzellen beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur schnellen Erhöhung des zellulären p53-Gehaltes nach direkter Bestrahlung von Zellen mit Kohlenstoffionen [Fournier *et al.*, 2004]. Trotzdem könnte p53 an der Induktion von p21 in Bystanderzellen beteiligt sein, da ein erster Schritt bei der Aktivierung des Proteins die posttranslationale Stabilisierung von p53 (Phosphorylierung an Serin-15) ist [Fei & el-Deiry, 2003]. Außerdem wurde bereits für α -Teilchen eine Erhöhung des posttranslational modifizierten p53 in Bystanderzellen gefunden. Die Untersuchung des Anteils an p53, das in Bystanderzellen phosphoryliert vorliegt, wird Gegenstand von weiterführenden Experimenten sein. Neben der Induktion von p21 über den Transkriptionsfaktor p53 kann diese auch unabhängig von p53 erfolgen, entweder über einen durch Stress erhöhten oxidativen Stoffwechsel (ROS) innerhalb der Zelle [Spitz *et al.*, 2004] oder über intrazelluläre Signaltransduktion (Cytokine) [Datto *et al.*, 1995].

In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Induktion von p21 in den Bystanderzellen 3 Stunden nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen beobachtet. Diese beobachtete p21-Induktion hat Ergebnisse von vorausgegangenen Experimenten bestätigt und wird mit diesen zusammengefasst in Abbildung 34 gezeigt (Vergleiche mit *Ergebnissen*, Abbildung 13). Ausgehend von der Annahme, dass sich die Induktion von p21 in linearer Abhängigkeit zum Anteil der getroffenen Zellkerne verhält, ist davon auszugehen, dass eine höhere Induktion von p21 in den Populationen, in denen wenige Prozent der Zellkerne getroffen sind, einer Bystander-Antwort der unbestrahlten Zellen entsprechen. Diese hypothetische lineare Wirkungsbeziehung ist in Abbildung 34 eingezeichnet (mittlere gestrichelte Linie), ober- und unterhalb ist das zugehörige Konfidenzintervall (68%) eingezeichnet, welches aus dem mittleren SEM der experimentell ermittelten Datenpunkte berechnet wurde.

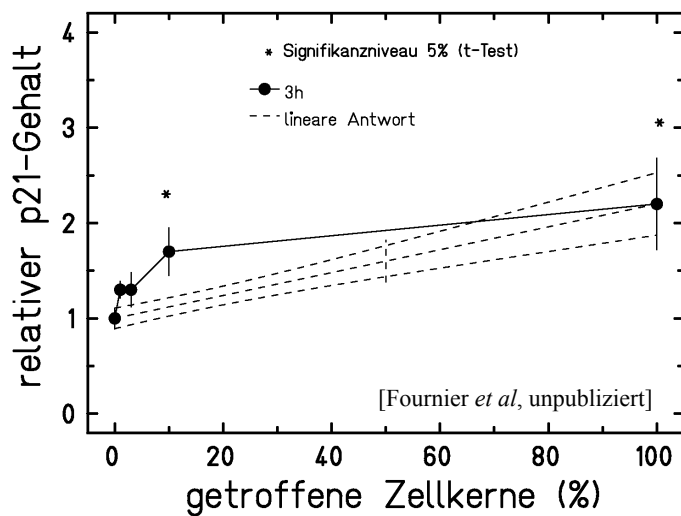


Abbildung 34: Relativer p21-Gehalt in Abhängigkeit des Anteils getroffener Zellkerne in humanen Fibroblasten 3 Stunden nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Werte wurden aus 5 unabhängigen Experimenten gemittelt. Berechnung des SEM (n=5) und der Signifikanz der Ergebnisse im t-Test. Die mittlere gestrichelte Linie stellt den hypothetischen Verlauf einer linearen Wirkungsbeziehung dar. Die beiden äußeren gestrichelten Linien (ober- und unterhalb) zeigen das aus dem mittleren SEM der experimentell ermittelten Datenpunkte berechnete Konfidenzintervall (68%).

Die zusammengefassten Daten wurden in 5 Einzelexperimenten ermittelt und ergaben eine deutliche Induktion von p21 in Bystanderzellen (insbesondere bei 10 % getroffenen Zellkernen) sowie in Populationen, bei denen 98 % der Zellkerne mindestens einmal bestrahlt worden sind. In zwei von insgesamt 5 Experimenten wurde keine Induktion von p21 beobachtet (eines davon wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt). Diese experimentellen Unterschiede können bis jetzt nicht eindeutig erklärt werden, stehen aber möglicherweise im Zusammenhang mit Variationen im zeitlichen Ablauf der zellulären Antwort. Dies geht aus den Ergebnissen eines der beiden Experimente hervor, bei dem zu einem späteren Zeitpunkt (24 Stunden) eine Induktion von p21 in Bystanderzellen beobachtet worden ist (siehe *Ergebnisse*, Abbildung 14).

Um eine mögliche Auswirkung der p21-Induktion auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden in weiterführenden Experimenten Fibroblasten mit Kohlenstoffionen bestrahlt und nach einer 24-stündigen Inkubationszeit neu ausgesät, um den Wiedereintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen. Die Zellzyklusverteilung wurde über 98 Stunden nach Wiederaussaat verfolgt und parallel dazu die p21-Expression in den proliferierenden Zellen ermittelt. In diesem Zeitraum gab es im Zellzyklusverlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Bystanderpopulation. Nur zwischen 18 und 24 Stunden nach Wiederaussaat zeigte sich, dass es in der Bystanderpopulation zu einer Verzögerung beim Austritt aus der ersten G₁-Phase kam. In Abbildung 35 sind entsprechende Datenpunkte im Vergleich zu Ergebnissen eines anderen Experiments gezeigt. Auch wenn sich die Anteile für die erste G₁-Phase der beiden Experimente stark unterscheiden, ist eine Verzögerung der Bystanderzellen in der ersten G₁-Phase klar erkennbar. Entsprechend wurde bereits 3 Stunden nach Wiederaussaat (24 Stunden nach Bestrahlung) eine Erhöhung der zellulären p21-Menge festgestellt, die aber zu späteren Zeitpunkten nicht mehr anhielt (siehe *Ergebnisse*, Abbildung 15). Die für Kohlenstoffionen beobachtete transiente Induktion von p21 in Bystanderzellen und die ebenfalls transiente Verzögerung in der ersten G₁-Phase legen einen Zusammenhang zwischen beiden Beobachtungen

nahe. Vergleichbare Ergebnisse für Bystanderpopulationen nach Bestrahlung mit α -Teilchen sind bereits publiziert. [Azzam *et al.*, 2000].

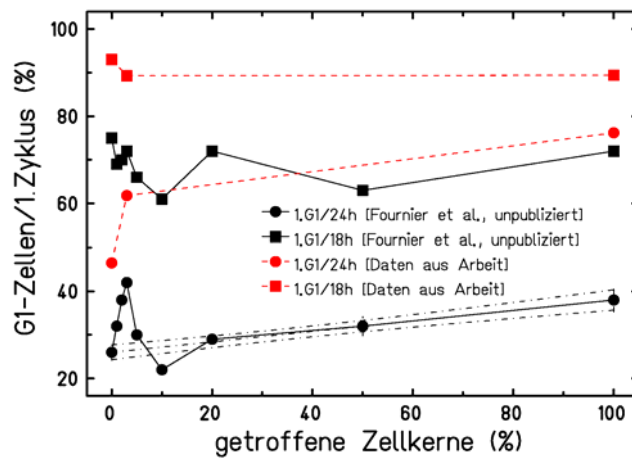


Abbildung 35: Vergleich des Prozentualen Anteils der G1-Zellen des 1. Zellzyklus 18 und 24 Stunden nach Wiederaussaat in Abhängigkeit der % getroffenen Zellkerne einer Population aus zwei Experimenten. Die gestrichelte Linie in der untersten Kurve entspricht einer hypothetischen linearen Wirkungsbeziehung, für die ein Konfidenzintervall von 68% aus den mittleren SEM-Werten des Experiments [Fournier *et al.*, unpubliziert] berechnet wurde. Die Messpunkte zwischen 1 % und 3 % bestrahlten Zellkernen in diesem Experiment liegen deutlich außerhalb dieses Intervalls, was einen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhten Anteil an G1-Zellen entspricht. Dies stimmt mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit überein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich biologische Effekte in Bystanderzellen in Abhängigkeit vom LET der verwendeten Strahlenart verändern. Hierzu wurden einzelne Zellen mit Uranionen bestrahlt, da diese bei fast gleicher Energie im Vergleich zu Kohlenstoffionen einen 100fach höheren LET-Wert haben. Die Zellen sind einer entsprechend 100-fach höheren Dosis ausgesetzt sind, was zu einer erhöhten lokalen Schadensdichte in der Zelle führt. Um die Ergebnisse mit denen von Kohlenstoff vergleichen zu können, wurden daher ebenfalls die Veränderungen in der Expression von Zellzyklusregulatoren (p53, p21) untersucht. Die bestrahlten und unbestrahlten Zellen standen auch im Rahmen dieser Experimente in direktem Kontakt zueinander, um sowohl eine Zellkommunikation (evtl. über gap-junctions) als auch einen mediumvermittelten Beitrag zu Bystandereffekten zu ermöglichen.

Die Induktion von p21 in Bystanderzellen ist bei Bestrahlung weniger Zellen mit Uranionen bereits nach 3 Stunden deutlich zu sehen. Daraus ist ersichtlich, dass selbst bei einer im Vergleich zu Kohlenstoff 100-fach höheren Dosis pro Ionendurchgang (12 Gy versus 0,12 Gy bei Kohlenstoffionen) eine Signalübermittlung von den direkt bestrahlten Zellen zu den Bystanderzellen stattfindet.

Die hohen Induktionswerte bei 1 % und 10 % und die niedrige Induktion bei 3 % bestrahlten Zellkernen wurden in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert (siehe *Ergebnisse*, Abbildung 18). Insbesondere das Ausmaß der p21-Induktion bei nur 1% der bestrahlten Zellkerne

ist unter Annahme eines Beitrags von Bystanderzellen zu dem Gesamtsignal zu erklären. Die niedrige Induktion bei 3 % bestrahlten Zellkernen, die im Gegensatz zur hohen Induktion bei 1 % und 10% der Zellkerne steht, könnten ein Hinweis auf die Überlagerung von zwei unabhängig voneinander ablaufenden biologischen Prozessen sein, die in unterschiedlicher Weise vom Anteil der bestrahlten Zellkerne abhängen.

Im Gegensatz zu der beschriebenen Induktion 3 Stunden nach Bestrahlung ist jedoch auffällig, dass 5 Stunden nach Bestrahlung nicht nur eine p21-Induktion, sondern auch eine deutliche Akkumulation von p53 stattfindet, die weder 3 Stunden nach Bestrahlung mit Uranionen noch mit Kohlenstoffionen zu beobachten ist. Diese ist vergleichbar mit der Akkumulation von p53 und der Induktion von p21, die 6 Stunden nach Uranbestrahlung mit einer Fluenz (2×10^6 T/cm²), bei der 98% der Zellkerne getroffen wurden maximale Werte erreichten [Fournier et al., 2004]. Da vergleichbare Werte für beide Proteine bereits gemessen wurden, wenn 86 % der Zellen getroffen sind (1×10^6 T/cm²), ist anzunehmen, dass die Expression beider Proteine nicht über den gesamten Bereich (bis 98 % getroffener Zellkerne) in linearer Abhängigkeit zur Zahl der getroffenen Zellkerne verläuft, sondern vorher ein Sättigungswert erreicht wird. Es ist also für die deutliche Zunahme von p21 und p53 5 Stunden nach Bestrahlung nicht auszuschließen, dass es sich um einen Effekt in den direkt bestrahlten Zellen handelt.

Zur Frage, ob bei Hoch-LET-Bestrahlung Bystandereffekte beobachtet werden können, kann bis jetzt zusammenfassend gesagt werden, dass es nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in Bystanderzellen zu einer p21-Induktion und einer transienten Verzögerung im Zellzyklus kommt. Dies wird allerdings nicht von einer intrazellulären Erhöhung von p53 begleitet, obwohl das p21-Gen neben den Genen für viele weitere Signalproteine der Zellzyklusregulation ein Target-Gen von p53 ist. Eine Bystanderinduktion von p21 wurde ebenfalls nach Bestrahlung mit Uranionen beobachtet. In beiden Fällen war durch die Bestrahlung von einzelnen Zellen innerhalb eines konfluenten Monolayers sowohl direkter Kontakt zwischen den Zellen als auch eine Signalübermittlung durch lösliche Faktoren möglich.

In der Literatur finden sich vergleichbare Untersuchungen mit α -Teilchen, die die Beteiligung von gap junctions als Möglichkeit der direkten Zell-Zell-Kommunikation genauer untersucht haben, als es im Rahmen dieser Diplomarbeit möglich war. Untersuchungen in Wildtypzellen (Connexin^{+/+} Fibroblasten der Maus) zeigen einen Bystandereffekt für eine p21-Induktion, der mit entsprechenden Knock-out-Zellen (Connexin^{-/-} Fibroblasten der Maus) nicht mehr beobachtet werden konnte [Azzam et al., 2000]. Wurden Inhibitoren der Gap-junction-Funktionen (z.B. Lindan) eingesetzt, war ein vorher gezeigter Bystandereffekt nicht mehr sichtbar [Azzam et al., 2001; Shao & Furusawa, 2003]. Dies spricht zumindest für α -Teilchen für eine Beteiligung von gap junctions an Bystandereffekten. Ebenso wurden in den Arbeiten zu Bystandereffekten mit

α -Teilchen durch Immunfluoreszenz-Analyse Bereiche mit besonders erhöhtem p21-Gehalt beobachtet [Azzam *et al.*, 1998 und 2000]. Dies konnte aber in vorläufigen Immunfluoreszenzversuchen [Fournier *et al.*, unpubliziert] für Kohlenstoffbestrahlung nicht bestätigt werden. Da aber aus den publizierten Daten eine Beteiligung von gap junctions an der Bystander-Antwort hervorgeht, sollte die Frage geklärt werden, wie wichtig der direkte Kontakt zwischen den Zellen für eine Bystander-Antwort nach Hoch-LET-Bestrahlung ist.

2 Vermittlung der Expression von Zellzyklusregulatoren in Bystanderzellen über lösliche Faktoren

Um die Bedeutung eines direkten Kontakts zwischen den Zellen für eine Bystander-Antwort zu untersuchen, wurde im dritten Teil dieser Arbeit die Expression von Zellzyklusregulatoren (p53 und p21) in unbestrahlten Zellen untersucht, die mit bestrahlten Zellen in einem Cokultivierungssystem über das umgebende Medium in Kontakt zueinander standen. Durch die Verwendung von Cokultivierungssystemen kann der Signaltransfer zwischen den Zellen über den gesamten Zeitraum des Versuchs gewährleistet werden. In diesem System werden die cokultivierten Zellen räumlich voneinander getrennt, sodass ein Effekt aufgrund der direkten Zell-Zell-Kommunikation ausgeschlossen werden kann. Das Zellkulturmedium wird über Poren einer Membran zwischen beiden Zelltypen ausgetauscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Effekte für Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen in unbestrahlten Bystander-Fibroblasten (Akzeptorzellen) nach Cokultivierung mit bestrahlten Zellen (Donorzellen) untersucht. Als Donor- und Akzeptorzellen wurden Fibroblasten des gleichen Typs verwendet.

Zuerst konnten in dieser Diplomarbeit bereits publizierte Daten zur p21-Expression in den unbestrahlten Akzeptorzellen nach Röntgenbestrahlung bestätigt werden. Nach 5 Stunden Cokultivierung mit bestrahlten Akzeptorzellen wurde eine leichte Erhöhung (bis max. zweifach) des zellulären p21-Gehalts in Akzeptorzellen festgestellt (mittels Western-Blot). Yang *et al.* (2005) fanden bei vergleichbarem Versuchsaufbau und unter Verwendung der gleichen Fibroblastenzellen mittels Immunfluoreszenz eine Verdopplung der Anzahl p21-positiver Akzeptorzellen, wenn sie mit bestrahlten Donorzellen (0,1 Gy bis 10 Gy) cokultiviert worden waren.

Die Erhöhung der Anzahl p21-positiver Akzeptorzellen wurde bei Yang *et al.* in Zellen nachgewiesen, die als asynchrone Zellpopulation vorlagen, während im Rahmen dieser Arbeit nur unter Verwendung von konfluenten Zellen (bestehend zu über 80% aus G₁-Phase-Zellen) gleiche Ergebnisse erzielt wurden. Es gilt zu bedenken, dass im Western-Blot ein mittlerer Proteingehalt für die gesamte Zellpopulation gemessen wird. Da der zelluläre p21-Gehalt und auch die Induktion des Proteins in keiner Zellzyklus-Phase so deutlich sind wie in der G₁-Phase [Cai & Dynlacht,

1998] ist eine Erhöhung des p21-Gehaltes in einer asynchronen Population eventuell weniger deutlich als in einer relativ synchronen G₁-Population.

Nachdem unsere Ergebnisse für Röntgenbestrahlung vergleichbar mit den Daten von Yang *et al.* waren, wurde im nächsten Schritt der Effekt von Kohlenstoffionen untersucht. Mit dem gleichen Kokultivierungssystem wurde nach Bestrahlung über einen großen Dosisbereich (0,0014 Gy bis 5,44 Gy) die p21-Expression in Akzeptorzellen untersucht. In den Akzeptorzellen wurde keine über das Medium vermittelte Induktion von p21 festgestellt. Hingegen zeigte sich eine deutliche Induktion von p21 in den parallel untersuchten Donorzellen, und zwar auch dann, wenn aufgrund der niedrigen Fluenz nur wenige Zellkerne innerhalb der Donorzellpopulation bestrahlt worden waren. Dies bestätigt eine erhöhte p21-Induktion in Bystanderzellen bei direktem Kontakt zu bestrahlten Zellen (siehe *Ergebnisse* 1.1) unter veränderten experimentellen Bedingungen, die sich aus der Verwendung des Kokultivierungssystems ergeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit keine über lösliche Faktoren vermittelte p21-Induktion in Akzeptorzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen beobachtet wurde. Eine Studie zur über lösliche Faktoren vermittelten Proteinexpression in Akzeptorzellen nach Bestrahlung mit α -Teilchen zeigte sogar ein Absinken der intrazellulären Menge von p53 und p21 [Iyer & Lehnert, 2000]. Diese und unsere Daten weisen möglicherweise auf einen mechanistischen Unterschied bezüglich der Bystander-Antwort zwischen Strahlung mit hohem und mit niedrigem LET hin. Während bei Niedrig-LET-Bestrahlung lösliche Faktoren nachweisbar eine Rolle bei Bystandereffekten spielen, sind diese bei Hoch-LET-Bestrahlung von geringerer oder keiner Bedeutung.

3 Einfluss löslicher Faktoren auf das klonogene Überleben von Fibroblasten

Einen Beitrag zur Untersuchung von mediumvermittelten Effekten nach Röntgenbestrahlung liefern die Ergebnisse von Mothersill und Seymour (1997), die ein reduziertes Überleben von Fibroblasten nach Transfer des Mediums von bestrahlten Keratinozyten beobachtet haben. Bei Verwendung von Fibroblasten als Donorzellen zeigte sich nur ein geringer Effekt im Überleben der Akzeptorzellen. Der Aspekt, dass ein anderer Zelltyp als Donorzelle in der unmittelbaren Nachbarschaft der Akzeptorzellen ebenfalls einen Einfluss auf zelluläre Reaktionen der Akzeptorzellen hat, war auch im Rahmen dieser Diplomarbeit von Interesse. Das klonogene Überleben hat als biologischer Endpunkt allerdings einen anderen Stellenwert als die Zellzyklusregulation, da ein vermindertes Überleben nur eine Aussage darüber macht, inwieweit weniger Zellen proliferieren. Eine veränderte Zellzyklusregulation hat jedoch potentiell Einfluss

auf Reparaturprozesse und Differenzierung und damit auf die genetische Stabilität der nachfolgenden Zellgenerationen [Morgan, 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des klonogenen Überlebens in Akzeptorzellen das von Mothersill und Seymour verwendete Protokoll beibehalten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mothersill und Seymour wurde kein reduziertes Überleben in unbestrahlten Fibroblasten (AG01522) beobachtet, wenn ihnen das Medium von röntgenbestrahlten Keratinozyten transferiert wurde (siehe *Ergebnisse* 3). Das klonogene Überleben der im gleichen Experiment direkt bestrahlten Fibroblasten ist gut vergleichbar mit den Werten, die für diese Zellen bereits publiziert wurden (siehe Abbildung 36).

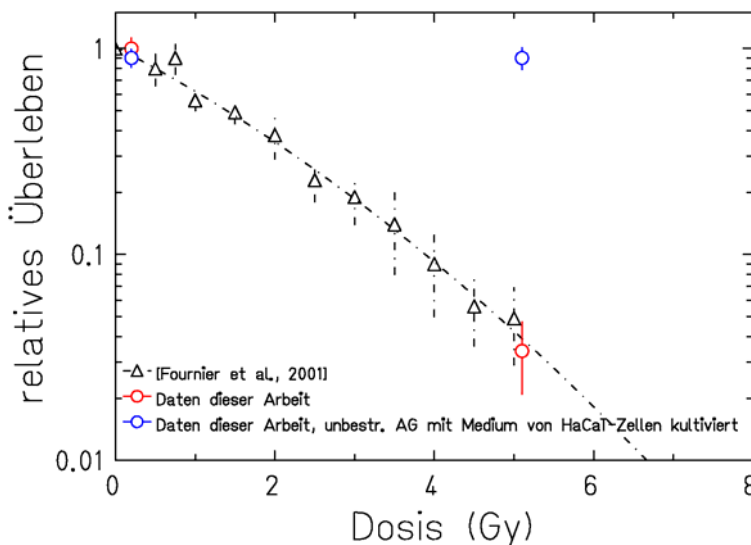


Abbildung 36: Relatives Überleben von AG01522 Fibroblasten in Abhängigkeit von der Röntgendosis [Fournier *et al.*, 2001]. Hinzugefügt wurden Daten dieser Arbeit für das Überleben von unbestrahlten und 5 Gy direkt bestrahlten Fibroblasten (○) sowie unbestrahlten Fibroblasten, die mit dem Medium von Keratinozyten (0 Gy und 5 Gy) kultiviert wurden (○), Vergleiche Abbildung 26.

Die verwendeten Fibroblastenzellen könnten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Mothersill und Seymour haben Fibroblasten der Zelllinie MSU-1 verwendet, die immortalisiert, aber nicht transformiert waren. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden normale Fibroblasten der Zelllinie AG01522 verwendet. In diesem Experiment kann eindeutig festgehalten werden, dass der Einfluss löslicher Faktoren zu keiner Verminderung des klonogenen Überlebens führt, wenn Keratinozyten als Donorzellen verwendet werden. Zu klären bleibt die Frage, inwieweit bestrahlte Keratinozyten über lösliche Faktoren Einfluss auf den Zellzyklus und dessen Regulation in Fibroblasten haben.

4 Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies nach Bestrahlung

In der Diskussion über die Mechanismen von mediumvermittelten Bystandereffekten wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vorgeschlagen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die intrazelluläre ROS-Bildung nach Bestrahlung untersucht. Eine weitere Motivation

war, dass sich im Laufe der Experimente herausstellte, dass eine erhöhte intrazelluläre p53-Menge in Bystanderzellen meist nicht nachweisbar war und p21 aufgrund von erhöhten intrazellulären ROS unabhängig von p53 induziert werden kann [O'Reilly, 2005]. Daher wurde nach direkter Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlen sowie schweren Ionen die intrazelluläre Bildung von ROS in den Zellen gemessen.

Sofort direkter Bestrahlung mit Röntgen wurde ein linearer Anstieg der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der applizierten Röntgendosis (0,25 Gy bis 5 Gy) beobachtet (siehe *Ergebnisse* 4). In Übereinstimmung wurde ein linearer Fluoreszenzanstieg direkt nach Bestrahlung in Abhängigkeit der verwendeten Dosis für γ -Strahlen [Wan *et al.*, 2005, 163:232-240] und Protonenstrahlen [Wan *et al.*, 2005, 163:364-368] in den Dosisbereichen zwischen 0,0015 Gy und 2 Gy beobachtet. Yang *et al.* (2005) haben nach Röntgenstrahlung auch zu späteren Zeiten (30 Stunden) eine intrazelluläre ROS-Bildung festgestellt. Allerdings konnten im Zeitraum von wenigen Stunden bis zu 3 Tagen nach Bestrahlung in den in dieser Diplomarbeit verwendeten Zellen keine intrazellulär gebildeten Radikale mehr detektiert werden. Bei Cokultivierung von unbestrahlten Akzeptorzellen mit röntgenbestrahlten Donorzellen wurde nach 3 Tagen eine Verdopplung des intrazellulären ROS-Gehaltes in den Akzeptorzellen gemessen [Fournier *et al.*, unpubliziert]. Letzteres weist ebenso wie die Ergebnisse von Yang *et al.* (2005), die nach 30 Stunden auch in Akzeptorzellen eine erhöhte ROS-Bildung beobachtet haben, auf eine mediumvermittelte Antwort in Akzeptorzellen zu späteren Zeitpunkten hin, die eine intrazelluläre Radikalbildung mit einschließt.

Direkt nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Uranionen wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Anstieg der ROS-Fluoreszenz über einen dem Röntgenexperiment vergleichbaren Dosisbereich beobachtet. Wan *et al.* (2005) haben nach direkter Bestrahlung mit hochenergetischen Eisenionen (1 und 5 GeV/u), die ebenso wie die verwendeten Kohlenstoffionen einen LET von 155 keV/ μ m haben, weniger intrazellulär gebildete ROS gemessen als nach Röntgenstrahlung. Dies könnte bedeuten, dass für die intrazelluläre ROS-Bildung eine homogene Verteilung der Schäden im Zellkern von Bedeutung ist, was bei hochenergetischen Eisenionen annähernd eher der Fall ist als bei Kohlenstoff. Die intrazelluläre ROS Bildung zu späteren Zeitpunkten nach Bestrahlung war teilweise leicht erhöht. Sie wurde aber für Kohlenstoffionen nur für höhere Fluenzen beobachtet. Interessant ist, dass es zum gleichen Zeitpunkt bei Uranionen zu einer deutlichen Induktion von p21 in den Bystanderzellen kam. Dies könnte in diesem Fall auf einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und einer erhöhten p21-Induktion hinweisen.

In Cokultivierungsversuchen (siehe *Ergebnisse* 4) parallel zur Proteinexpression wurde untersucht, ob es in Akzeptorzellen zu einer erhöhten intrazellulären ROS-Bildung nach der Bestrahlung mit schweren Ionen kommt. Dies ist für Kohlenstoffionen weder direkt noch wenige Stunden nach

Bestrahlung der Fall. Entsprechend wurde für Kohlenstoffionen keine Induktion von p21 wenige Stunden nach Bestrahlung festgestellt. Für Uranionen konnte sogar für einen Zeitraum bis zu 3 Tagen nach Bestrahlung keine erhöhte intrazelluläre ROS-Bildung beobachtet werden. Dies stimmt nicht mit Daten für α -Teilchen überein, die etwa 1 Tag nach der Cokultivierung eine Verdopplung des intrazellulären ROS-Gehaltes zeigen [Narayanan *et al.*, 1997].

Ein besonders auffälliger Unterschied zwischen Röntgen- und Hoch-LET-Bestrahlung ist die intrazelluläre Radikalbildung während und direkt nach der Bestrahlung, die bei Röntgenstrahlung sehr deutlich und nach Hoch-LET-Bestrahlung überhaupt nicht feststellbar war. Nach den vorläufigen Ergebnissen dieser Arbeit tritt nach der Bestrahlung mit schweren Ionen sowohl bei direktem Zellkontakt als auch in der Cokultivierung eine erhöhte intrazelluläre ROS-Bildung immer dann auf, wenn auch eine p21-Induktion sichtbar ist. Dies ist für Röntgenstrahlung nach den Daten dieser Arbeit nicht eindeutig der Fall, wird jedoch in der Literatur beschrieben.

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurde eindeutig gezeigt, dass für die p21-Induktion ein mechanistischer Unterschied zwischen Röntgen und Hoch-LET in Bezug auf die Abhängigkeit von direktem Zell-Zell-Kontakt und dem Transfer über lösliche Faktoren für Bystandereffekte besteht. Ob dies ebenso auf die intrazelluläre ROS-Bildung nach Bestrahlung zutrifft, wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Lewis J., Ralf M., Roberts K., Watson J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, Third Edition*

Azzam E.I., de Toledo S.M., Gooding T., Little J.B. (1998). Intercellular Communication is involved in the Bystander Regulation of Gene Expression in Human Cells Exposed to Very Low Fluences of Alpha Particles. *Radiat. Res.* 150:497-504

Azzam E.I., de Toledo S.M., Waker A.J., Little J.B. (2000). High and Low Fluences of α -Particles Induce a G1 Checkpoint in Human Diploid Fibroblasts. *Cancer Res.* 60:2623-2631

Azzam E.I., de Toledo S.M., Little J.B. (2001). Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from α -particle irradiated to non-irradiated cells. *PNAS* Vol.98, No.2:473-478

Azzam E.I., De Toledo S.M., Spitz D.R., Little J.B. (2002). Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res.* 62(19):5436-5442

Azzam E.I., de Toledo S.M., Little J.B. (2004). Stress signalling from irradiated to non-irradiated cells. *Curr. Cancer Drug Targets* 4(1):53-64

Bauchinger M. (1995). Cytogenetic Research after Accidental Radiation Exposure. *Stem Cells* 13, 1:182-190

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106(3):761-771

Carr A.M. (2000). Cell cycle, piecing together the p53 puzzle. *Science* 287:1765-1766

Cai K., Dynlacht B.D. (1998). Activity and nature of p21^{WAF1} complexes during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:12254-12259

Coates P.J., Lorimore S.A., Wright E.G. (2004). Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutat. Res.* 568:5-20

Cucinotta F.A., Schimmerling W., Wilson J.W. (2001). Space radiation cancer risks and undercertainties for Mars missions. *Radiat. Res.* 156:682-688

Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.J., Xiong Y., Wang X.F. (1995), Transforming growth factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:5545-5549

Diegelmann R. F. (1997). Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. *J. Urology* 157:298-302

Di Leonardo A., Linke S.P., Clarkin K., Wahl G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development* 8:2540-2551

Fei P., el-Deiry W.S. (2003). P53 and radiation response. *Oncogene* 22:5774-4783

- Fournier C., Scholz M., Kraft-Weyrather W., Rodemann H.P., Kraft G. (2001). Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* Vol. 77, No. 6:713-722
- Fournier C., Brons S., Taucher-Scholz G. (2003). Quantification of chemiluminescent signals using photon-sensitive films or a CCD camera. *BioTechniques* Vol. 35 No. 2
- Fournier C., Wiese C., Taucher-Scholz G. (2004). Accumulation of the Cell Cycle Regulators TP53 and CDKN1A (p21) in Human Fibroblasts after Exposure to Low- and High-LET Radiation. *Radiat. Res.* 161:675-684.
- Hall E.J. (1994). Radiobiology for the Radiologist. *J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 4th Edition*
- Hall E.J. (2003). The Bystander Effekt. *Health Phys.* Vol.85, No.1:31-35
- Harper J.W., Adami G.R. Wie N., Keyomarsi K., Elledge S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependant kinases. *Cell* 75:805-816
- Herrmann T., Baumann M. (1997). Klinische Strahlenbiologie – kurz und bündig. *Urban & Fischer Verlag, Jena, 3. Auflage*
- Iyer R., Lehnert B.E. (2000). Factors Underlying the Cell Growth-related Bystander Responses to α Particles. *Cancer Res.* 60:1290-1298
- Kraft G. (1987). Radiobiological effects of very heavy ions: inactivation, induction of chromosome aberrations and strand breaks. *Nuclear Science Applications.* 3:1-28
- Krämer M., Kraft G. (1994). Track structure and DNA damage. *Adv. Space Res.* Vol. 14, No. 10:151-159
- Kraft G. (1997). Radiobiology of heavy charged particles. In: Amaldi U., Larsson B., Lemoigne Y. (Hrg.) *Advances in Hadrontherapy*, Elsevier, Amsterdam
- Kraft G., Kraft-Weyrather W., Taucher-Scholz G., Scholz M. (1997). What kind of radiobiology should be done at hadrontherapy centre? In: Amaldi U., Larsson B., Lemoigne Y. (Hrg.) *Advances in Hadrontherapy*, Elsevier, Amsterdam
- Kraft-Weyrather W., Kraft G., Ritter S., Scholz M., Stanton J.A. (1989). The preparation of biological targets for heavy-ion experiments up to 20 MeV u^{-1} . *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* 282:22-27
- Lorimore S.A., Mc Ilrath J.M., Coates P.J., Wright E.G. (2005). Chromosomal instability in unirradiated hemopoietic cells resulting from a delayed in vivo bystander effect of gamma radiation. *Cancer Res.* 65(13):5668-73
- Luger T.A., Schwarz T. (1990). Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* 95:100-104
- Luger T.A., Schwarz T. (1996). Epidermal Growth Factors and Cytokines. *Marcel Dekker Inc.* New York, Basel, Hong Kong
- Maas-Szabowski N., Shimotoyodome A., Fusenig N.E. (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblasts cocultures via a double paracrine mechanism. *J. Cell Sci.* 112:1843-1853

- Martin M., Lefaix J.-L., Crechet F., Dubaron F. (1993). Temporal modulation of TGF- β 1 and β -actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation. *Radiat. Res.* 134:63-70
- McDonald III E.R., El-Deiry W.S. (2001). Checkpoint genes in cancer. *Ann Med.* 33:113-122
- Meek D.W. (2004). The p53 response to DNA damage. *DNA repair* 3:1049-1056
- Mole R.H. (1953). Whole body irradiation: radiobiology or medicine? *Br. J. Radiol.* 26:234-241
- Morgan W.F. (2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat. Res.* 159(5):567-580
- Mothersill C., Seymour C. (1997). Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* Vol.71, No.4:421-427
- Mothersill C., Seymour C. (1998). Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat. Res.* 149:256-262
- Munro T. R. (1970). The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.* 42 (3):451-470
- Narayanan P.K., Goodwin E.H., Lehnert B.E. (1997). Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* 57(18):3963-3971
- O'Reilly M. (2005). Redox Activation of p21^{Cip1/WAF1/Sdi1}: A Multifunctional Regulator of Cell Survival and Death. *Antioxid Redox Signal.* Vol. 7, No. 1&2:108-118
- Prise K.M., Folkard M., Michael B.D. (2003). Bystander responses induced by low LET radiation. *Oncogene* 22:7043-7049
- Prise K.M., Schettino G., Folkard M., Held K.D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet. Oncol.* 6:520-528
- Puck T.T., Marcus O.I. (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41:432-437
- Qin J., Li L. (2003). Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints. *Radiat. Res.* 159:139-148
- Rodemann H.P., Peterson H.P., Schwenke K., von Wangenheim K.H. (1991). Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc.* 514:1135-1143
- Russo T., Zambrano N., Esposito F., Ammendola R., Cimino F., Fiscella M., Jackman J., O'Connor P.M., Anderson C.W., Apella E. (1995). A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem.* 270 (49):29386-91
- Schimmerling W., Cucinotta F.A., Wilson J.W. (2003). Radiation risk and human space exploration. *Adv. Space Res.* 31 (1):27-34
- Schröder J. M. (1995). Cytokine networks in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 105:20-24

- Seymour C., Mothersill C. (1997). Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment. *Radiat. Oncol. Investig.* 5(3):106-10
- Seymour C., Mothersill C. (1999). Cell communication and the "bystander effect". *Radiat. Res.* 151(4):505-6
- Shao C, Furusawa Y, Aoki M, Ando K. (2003). Role of gap junctional intercellular communication in radiation-induced bystander effects in human fibroblasts. *Radiat. Res.* 3:318-23
- Sherr C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677
- Spitz D.R., Azzam E.I., Li J.J., Gius D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 23:311-322
- Wan X.S., Zhou Z., Ware J.H., Kennedy A.R. (2005). Standardization of a Fluorometric Assay for Measuring Oxidative Stress in Irradiated Cells. *Radiat. Res.* 163:232-240
- Wolff S. (1991). Biological dosimetry with cytogenetic endpoints. *Prog Clin Biol Res.* 372:351-62
- Yang H., Asaad N., Held K.D. (2005). Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* 24:2096-2103

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CASY	Zellzähl- und Analyse-System der Firma Schärfe Systems
CPD	kumulative Populationsverdopplungen (cumulative population doubling)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCF	Dichlorofluorescein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EK	Endkonzentration
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward-scattering)
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung
LET	Linearer Energietransfer
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PE	Plattierungseffizienz bei Koloniebildungstest
PFA	Paraformaldehyd
PVDF-Membran	Polyvinyliden-Difluorid-Membran
RBE	Relative biologische Wirksamkeit
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side-scattering)
PET-Membran	Polyethylen Terephthalat Membran
UNILAC	Universaler Linearbeschleuniger der GSI
W.a.	Wiederaussaat

Anhang

1 Verwendete Materialien

1.1 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Sigma
AEBSF (4-[2-Aminoethyl]- Benzenesulfonyl Fluoride, Hydrochlorid)	Sigma
Acryl-Bis-30% (Acrylamide/ bis-Acrylamide)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Aprotinin (1,5 mg prot./ml)	Sigma
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophneolsulfophtalein)	Serva
5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	Serva
CASYTON Messlösung	Schärfe System
Coomassie-Brilliant-Blue G250	Serva
DAPI	Serva
Desinfektionsmittel Heiland	HLZ Logistik GmbH
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	Biochrom AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Na ₂ (EDTA)-Lösung (0,1%)	Sigma
EDTA Titriplex®III Ethyldinitrotetraessigsäure	Merck
EDTA-Trypsin-Lösung Fibroblasten-Zellen (0,05% Trypsin, 0,1% EDTA)	PAN Biotech GmbH
EDTA-Trypsin-Lösung HaCat-Zellen (0,05% Trypsin 0,02% EDTA)	PAN Biotech GmbH
EMEM with EBSS (Bio Whittaker™)	Cambrex Bio Science Verviers
Eisessig	LS Labor Service GmbH
Ethidiumbromid	Sigma
Ethanol	Merck
Fetal Bovine Serum (FCS) Fibroblasten	Biochrom AG
Fetal Bovine Serum (FCS) Hamsterzellen	Biochrom AG
Formaldehydlösung (mind. 37% säurefrei)	Merck
Glutamin (N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine 200 mM)	Biochrom AG
Glycin (Elektrophorese Reagenz)	Sigma
Glycerin	Sigma
Höchst 33258 Färbelösung [2' (4 hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5' bi-1H-benzimidazole]	Sigma
Igepal CA-630(NP 40)	Sigma
Kaliumhydroxid	Merck
Methanol	LS Labor Service GmbH
Methylenblaulösung (Löffler)	Merck
Natriumchlorid	LS Labor Service GmbH
Natrium-deoxycholat (5β-Cholan-24-oic acid-3α, 12α-diol)	Sigma
Natriumfluorid	Sigma Ultra
Neomycin/Bacitracin (1 mg/ 50 U/ ml)	Biochrom AG
PBS ⁻ Dulbecco (ohne Calcium und Magnesium)	Biochrom AG
PBS ⁺⁺ Dulbecco (mit Calcium und Magnesium)	Biochrom AG
Penicillin / Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml)	Biochrom AG
Rinderserumalbumin (BSA)	Firma Sigma, Fraktion V
RNase	Roth
Roti®-Quant Coomassie Brilliant Blue Dye G250	Roth
Salzsäure (37%, rauchend)	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Triton X-100	Appli Chem
Tris-Base (Sigma 7-9® Tris-[hydroxymethyl]- aminomethan)	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate)	Sigma

1.2 Zellkulturmedien und Lösungen

1.2.1 Zellkultur

Tabelle 5: BSA-Lösung (0,4%)

Menge	Chemikalie
0,2 g	BSA
50 ml	PBS (ohne Calcium und Magnesium)
	Lösen bei 37°C im Wasserbad

Tabelle 6: DAPI-Gebrauchslösung (1 µg/ml)

Menge	Chemikalie
50 µl	DAPI-Stammlösung (1 mg/ml)
50 ml	PBS (ohne Calcium und Magnesium)
	In Alufolie verpacken (lichtempfindlich), bei 4°C lagern

Tabelle 7: EDTA-Lösung (0,1%) für Subkultivierung von Keratinozyten

Menge	Chemikalie
0,1 g	EDTA
100 ml	PBS (ohne Calcium und Magnesium)

Tabelle 8: Kryomedium für Fibroblasten

Menge	Chemikalie
500 ml	EMEM Basis Medium mit EBSS
100 ml	FCS Fibroblasten (EK 20%)
50 ml	Glycerin (EK 10%)
5 ml	L-Glutamin (EK 1%)
5 ml	Penicillin/Streptomycin oder Neomycin/Bacitracin (EK 1%)

Tabelle 9: Kryomedium für Keratinozyten

Menge	Chemikalie
500 ml	DMEM Basis Medium High Glucose
50 ml	FCS-Hamsterzellen (EK 10%)
50ml	DMSO (EK 10%)
5 ml	Penicillin/Streptomycin oder Neomycin/Bacitracin (EK 1%)

Tabelle 10: Kulturmedium für Fibroblasten

Menge	Chemikalie
500 ml	EMEM Basis Medium mit EBSS
50 ml	FCS Fibroblasten (EK 10%)
5 ml	L-Glutamin (EK 1%)
5 ml	Penicillin/Streptomycin oder Neomycin/Bacitracin (EK 1%)

Tabelle 11: Kulturmedium für Keratinozyten

Menge	Chemikalie
500 ml	DMEM Basis Medium High Glucose
50 ml	FCS-Hamsterzellen (EK 10%)
5 ml	Penicillin/Streptomycin oder Neomycin/Bacitracin (EK 1%)

Tabelle 12: Methylenblaulösung (3x)

Menge	Chemikalie
300 ml	Löfflers Methylenblau
90 ml	0,1% Kaliumhydroxid
50 ml	Methanol
	Auffüllen mit Millipore auf 1l, filtrieren über Faltenfilter

Tabelle 13: Paraformaldehydlösung (3,7%)

Menge	Chemikalie
1 ml	Paraformaldehyd (37%)
9 ml	PBS (ohne Calcium und Magnesium)

Tabelle 14: Triton X (0,5%)

Menge	Chemikalie
5 ml	Triton X-100 10%
100 ml	PBS (ohne Calcium und Magnesium)

1.2.2 Biochemische Methoden

Tabelle 15: Ammoniumpersulfat (10%)

Menge	Chemikalie
0,03 g	APS
300 µl	Millipore

Tabelle 16: Blocking Puffer

Menge	Chemikalie
2,5 g	Milchpulver (low fat)
50 ml	TBST (1fach)

Tabelle 17: Coomassie Entfärbelösung

Menge	Chemikalie
800 ml	Millipore
50 ml	Methanol (100%, p.a.)
70 ml	Eisessig
	Auffüllen mit Millipore auf 1l

Tabelle 18: Coomassie Färbelösung

Menge	Chemikalie
900 ml	Millipore
800 ml	Methanol (100%, p.a.) (EK 40%)
140 ml	Eisessig (EK 7%)
0,5 g	Coomassie-Brilliant-Blue 2250 (EK 0,025%)
	Auffüllen mit Millipore auf 2l

Tabelle 19: Laufpuffer (10x)

Menge	Chemikalie
142,6 g	Glycin
30,3 g	Tris-Base
10 g	SDS
	Auffüllen mit Millipore auf 1l; 1x Laufpuffer = 1:10 Verdünnung mit Millipore

Tabelle 20: RIPA-Puffer

Menge	Chemikalie
1 ml	2% Igepal- Puffer (EK 1%)
500 µl	2% Natriumdeoxycholat (EK 0,5%)
220 µl	Millipore
200 µl	500 mM NaF (EK 50 mM)
20 µl	100 mM AEBSF (EK 1 mM)
20 µl	1,5 mg/ml Aprotinin (EK 1 µg/ml)
20 µl	100 mM Natrium-Orthovanadate (EK 1 mM)
20 µl	10% SDS (EK 0,1%)

Tabelle 21: Sammelgelpuffer (3,2%)

Menge	Chemikalie
6,06 g	Tris-Base
80 ml	Millipore
	Titration mit Salzsäure auf pH 6,7
4 ml	SDS (10%)
	Auffüllen mit Millipore auf 100 ml

Tabelle 22: Sammelgel

Menge	Chemikalie
1080 µl	Acryl-Bis 30%
6,34 ml	Millipore
2,54 ml	Sammelgel-Puffer (3,2%)
100 µl	APS (10%)
10 µl	Temed

Tabelle 23: SDS-Sample Puffer

Menge	Chemikalie
0,035 g	Bromphenolblau
7 ml	Glycerol (100%)
6 ml	SDS (10%)
1 ml	1M Tris-Puffer (pH 6,7)
	180 µl SDS-Sample Puffer werden 20 µl 2-Mercaptoethanol zugegeben

Tabelle 24: Stripping Puffer

Menge	Chemikalie
714 µl	2-Mercaptoethanol
6 ml	1M Tris-Puffer (pH 6,7)
20 ml	SDS (10%)
74 ml	Millipore

Tabelle 25: TBST Puffer (10x)

Menge	Chemikalie
500 ml	NaCl (3M)
100 ml	1M Tris-Puffer (pH 8.3)
5 ml	Tween 20 (100%)
	Auffüllen mit Millipore auf 1l
	1x TBST Puffer = Verdünnung 1:10 mit Millipore

Tabelle 26: Transferpuffer

Menge	Chemikalie
1155 ml	Millipore
30 ml	1M Tris-Puffer (pH 8,3)
15 ml	SDS (10%)
16,9 g	Glycin
	2-4 h vor Gebrauch Zugabe von 300 ml Methanol

Tabelle 27: 1M Tris Puffer (pH 8,3)

Menge	Chemikalie
121,1 g	Tris-Base
800 ml	Millipore
	Titration mit Salzsäure auf pH 8,3; Auffüllen mit Millipore auf 1l

Tabelle 28: 1M Tris Puffer (pH 6,7)

Menge	Chemikalie
121,1 g	Tris-Base
800 ml	Millipore
	Titration mit Salzsäure auf pH 6,7; Auffüllen mit Millipore auf 1l

Tabelle 29: Trenngelpuffer (4x)

Menge	Chemikalie
18,2 g	Tris-Base
80 ml	Millipore
	Titration mit Salzsäure auf pH 8,8
4 ml	SDS (10%)
	Auffüllen mit Millipore auf 100 ml

Tabelle 30: Trenngel (12%)

Menge	Chemikalie
8 ml	Acryl-Bis 30%
7 ml	Millipore
5 ml	Trenngel-Puffers (4x)
100 µl	APS 10%
10 µl	Temed

1.3 Sonstige Materialien

Tabelle 31: Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und ihre Bezugsquellen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor® 488 FluoroNanogold™ Fab' Fragment gebunden an Anti-Maus IgG (Ziege)	Molecular Probes
Dispenser (5, 10, 25 ml)	TPP
Einmalpipetten Cellstar®	Greiner bio-one
Eppendorf Gefäße (0,5 / 2 ml)	Eppendorf
Kryoröhrchen Cellstar® Cryo.s	Greiner
Laborwischtücher Kimwipes® Lite 100	Kimberly-Clark®
Nitrilhandschuhe Rotiprotect Nitril	ROTH
Pipettenspitzen	Brand
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell
Filtereinheit Nalgene (250 ml)	Nalge Nunc International
Zellkultureinsätze 6well	FALCON®
Zellkultureinsätze ThinCerts™ 6well	Greiner bio-one
Zellkulturplatte Cellstar® 6-well	Greiner bio-one
Zellkulturplatte Multiwell™ 6-well-	FALCON®
Zellkulturflaschen (12,5 cm ² , 25 cm ² , 75 cm ²)	FALCON™
Zellkulturschalen (ø 35 mm, ø 60 mm)	Nunc
Zellzählgefäße (10 ml)	Schärfe System
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	TPP und Greiner

Tabelle 32: Verbrauchsmaterialien für biochemische Arbeiten und ihre Bezugsquellen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Entwickler G153 Curix 60 for x-ray film processing	Amersham Biosciences
Eppendorfgefäße (0,5/2 ml)	Eppendorf
Fixierer G354 for x-ray film processing	Amersham Biosciences
Full Range Rainbow™ Markerprotein RPN800	Amersham Biosciences
Mikrotiterplatte 96well	FALCON®
Parafilm Laboratory Film	ROTH
p53 (Ab-6) Erst-Antikörper (Maus, 100 µg/ml)	Firma Oncogene™ Research Products
p21 Erst-Antikörper (Maus, anti-Cip1/WAF1 Mab, 250 µg/ml)	BD Transduction Laboratoire™
Schwämme	Biorad
Transfer-Membran Immobilon™ (0,45 µm)	Millipore
Tubulin-Antikörper (monoklonaler anti- α , Klon B512)	Sigma
Whatmanpapier GB 200	Schleicher & Schuell
Zellschaber	Falcon
Zentrifugenröhrchen (15,50 ml)	TPP und Greiner
Zweit-Antikörper (Anti-Maus IgG Antikörper-Schaf, gekoppelt mit Meerrettich- Peroxidase)	Firma Amersham Biosciences

1.4 Geräte

Tabelle 33: Verwendete Geräte und deren Hersteller

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
26 G-Spritze	Omnifix [®] + Sterican [®]	Braun
Abstandshalter	1 mm	Biorad
Autoklav	Autoklav EL	Tutthauer Systec
Autoradiographischer Fotofilm	Hyperfilm [™] ECL, 18x24 cm	Amersham Biosciences
Durchflusszytometer	Partec PAS III Particle Analysing System	Partec
Dosimeter	SN4	PTW Freiburg
ECL Plus [™]	RPN2132	Amersham Biosciences
Einschweißgerät	Futura-Jr. Patent-AF	Audionelektra
ELISA-Reader	ELx 800	Bio-Tek Instruments Inc.
Entwicklerautomat	Curix 60	AGFA
Fluoreszenzreader	Cytofluor [™] 2300	Millipore
Inkubatoren	Brutschrank BBD-6220	Heraeus Instruments
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -80°C		Heraeus Instruments
Gelelektrophoreseapparatur	Mini-PROTEAN [®] II	Biorad
Glasplatten	1 mm	Biorad
Glasröhrchen		Du Pont Instruments
Heizblock	Wealtec Corp. HB-2	Peolab
Kämme	1 mm	Biorad
Laser-Densitometer	FIPS [®] Plus	PTW-Freiburg
Magnetrührer	Combimas RCT	Janke & Kunkel IKA [®]
Mikroskope	Inverses Fluoreszenz/Vis Mikroskop DMIL mit digitaler Videokamera	Leica
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Pipetten (Glas)		Hirschmann [®] EM Techcolor
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences
Referenzbelichter	Densonorm 21	Pehamed Geräte GmbH
Röntgenfilmkassette	Hyperkassette [™] RPN13642	Amersham Biosciences
Röntgenröhre	Isovolt DS1	Seifert
Schüttler	IKA [®] -Schüttler MTS4	Janke & Kunkel IKA [®] Labortechnik
Schweißfolie		Jencons Scientific Limited
Spannungsregler	Elektrophoresis Power Supply E844 Consort 400V – 400 mA	Biorad
Sterilisator		Heraeus Instruments
Stickstoffbehälter	Locator 8 Plus	Thermolyne
Transferzelle	Mini Trans-Blot Cell	Biorad
Wasserbäder	ISOTEP 215	Fisher Scientific
Werkbänke	Herasafe HSP 12	Kendro/Heraeus Instruments
Zellzählung	CASY [®] 1 Modell TT Cell Counter and Analyzer System, Frequenz: 1MHz Coulter [®] Z2 Particle Count & Size Analyzer	Schärfe System GmbH Beckmann Coulter
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R Biofuge fresco Tischzentrifuge	Kendro/Heraeus Laboratory Products Heraeus Fisherbrand [®]

Danksagung

Mein allererster Dank geht an Prof. Dr. Gerhard Kraft, der mich in die Abteilung Biophysik bei der GSI Darmstadt aufgenommen und somit den Grundstein für meine Diplomarbeit gelegt hat.

Mein größter Dank geht an meine Betreuerin Dr. Claudia Fournier, die mit enorm kompetenter und fachlicher Betreuung diese Arbeit begleitet hat. Ihre große Diskussionsbereitschaft ebenso wie die vielen Anregungen, die sie mir für die Erstellung dieser Diplomarbeit gab, waren eine sehr große Motivation für mich.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Sylvia Ritter, Dr. Gisela Taucher-Scholz und Dr. Michael Scholz, die mit ihrer großen Kompetenz die Diskussionsrunden rund um meine Diplomarbeit bereichert haben. In diesem Rahmen möchte ich auch den beiden „Mit-Diplomanden“ Cläre und Annemarie danken, die in unseren Diplomandentreffen neue Ideen für meine Diplomarbeit mit einbrachten.

Dr. Jana Topsch möchte ich vor allem für die Einführungen in die FACS-Analyse danken, ebenso wie Doktorand Marcus Winter und Franziska Knauf, die mir die Raffinessen der Western-Blot-Analyse näher brachten und mir immer wertvolle Tipps vermittelt haben.

Ein großer Dank gilt auch Petra Hessel, die mich als Neuling geduldig in die Arbeitsmethoden und Laborabläufe einwies und mir immer tatkräftig zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich auch der ganzen Abteilung Biophysik für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Mein Dank geht auch an meine beiden Referenten Prof. Dr. Dieter Pollet (1. Referent) und Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer (2. Referent) für ihre Bereitschaft, diese externe Diplomarbeit zu betreuen. Prof. Dr. Dieter Pollet möchte ich desweiteren danken, da er die Kooperation mit der Abteilung Biophysik ermöglichte.

Mein größter Dank gebührt jedoch nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Studienzeit und vor allem während der Diplomarbeit mit Rat, Tat und vor allem Geduld unterstützt haben.

Diese Diplomarbeit wurde über Mittel des BMBF (02S8203) finanziert.

Ich versichere, dass ich die Diplomarbeit selbstständig verfasst habe, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Darmstadt, den