

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum  
Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

# **Apoptoseinduktion und Zellzyklusarretierung nach Bestrahlung mit Photonen oder Kohlenstoffionen**



**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Elisabeth Theresa Bonifer**

aus Dieburg

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 26.11.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent:	Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic
1. Korreferent:	Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Meinen Eltern

---

## Abkürzungsverzeichnis

A549	Humane Adenokarzinomzelllinie der Lunge
ACTB	Actin beta
ATCC	American Type Culture Collection
B2M	Beta-2-microglobulin
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/ lymphoma 2
BIRC5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleic acid
E	Energiedosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Fluenz
FCS	Fetales Kälberserum
GADD45A	Growth arrest and DNA damage-inducible, alpha
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gy	Gray
IAP	Inhibitorisches Apoptoseprotein
LET	Linearer Energietransfer
LQ-Modell	Linear-quadratisches Modell

m	Mutated
MPF	Mitosis promoting factor
mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma/ cancer
p	Signifikanzniveau
PBGD	Porphobilinogen deaminase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Plating efficiency
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	Quantitative Real-Time reverse transcriptase polymerase chain reaction
Rb	Retinoblastoma protein
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
REST	Relative Expression Software Tool
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonucleic acid
SF	Surviving fraction
SOBP	Spread out Bragg Peak
TAE	Tris-Acetat-EDTA
wt	Wildtyp

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1 Strahlenbiologische Grundlagen.....	10
1.1.1 Linearer Energietransfer, Energiedeposition und relative biologische Wirksamkeit.....	10
1.1.2 Dosis-Effekt-Beziehung.....	13
1.2 Die Apoptose.....	15
1.2.1 Morphologie und Aktivierung der Apoptose.....	15
1.2.2 Apoptoseregulation.....	15
1.3 Der Zellzyklus.....	17
1.3.1 Der G <sub>1</sub> /S-Kontrollpunkt.....	18
1.3.2 Der G <sub>2</sub> /M-Kontrollpunkt.....	19
1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....	20
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Zellkultur.....	22
2.1.1 Zelllinie A549.....	22
2.1.2 Kultivierungsbedingungen.....	22
2.1.3 Wachstumskurve.....	23
2.2 <i>in vivo</i> -Modell.....	23
2.3 Bestrahlung und Dosimetrie.....	23
2.3.1 Photonenbestrahlung der Monolayerkulturen.....	24
2.3.2 Bestrahlungsexperimente mit Kohlenstoffionen.....	24
2.3.2.1 <sup>12</sup> C -Bestrahlung der Monolayer.....	24
2.3.2.2 Bestrahlung der A549-Xenografttumoren.....	25

---

2.3.3 Bestrahlungsexperimente in der Übersicht.....	26
2.4 Koloniebildungstest .....	28
2.5 RNA-Isolation .....	29
2.6 Quantifizierung und Qualitätsprüfung der RNA.....	29
2.7 cDNA-Synthese.....	30
2.8 Genexpressionsanalyse .....	31
2.8.1 Primerdesign und Präanalytik .....	31
2.8.2 Wahl der Referenzgene .....	32
2.8.3 Durchführung der qRT-PCR .....	33
2.8.4 Überprüfung der Spezifität des Amplifikats.....	34
2.8.5 Auswertung und Statistik.....	36
2.8.6 Darstellung der Expressionsanalysen .....	37
2.9 Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	38
2.9.1 Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung .....	38
2.9.2 Annexin V/PI-Assay .....	40
2.10 Ermittlung von Zellkernflächen und Kerntreffern .....	42
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.1 Wachstumsverhalten von A549-Zellen.....	43
3.2 Dosis-Effekt-Kurve von A549-Zellen .....	44
3.3 Zellkernflächen und Kerntreffer nach <sup>12</sup> C-Bestrahlung.....	45
3.4 Genexpressionsanalysen nach Bestrahlung.....	47
3.4.1 Übersicht über die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen .....	47
3.4.2 Expressionsanalyse Apoptose-relevanter Gene.....	48
3.4.3 Expressionsanalyse Zellzyklus-relevanter Gene .....	53
3.5 Zellzyklusanalysen nach Bestrahlung.....	56
3.5.1 Zellzyklusanalyse exponentiell wachsender Zellen nach Photonen- bestrahlung.....	57

---

3.5.2 Zellzyklusanalyse von konfluent wachsenden Zellen nach Photonenbestrahlung.....	59
3.5.3 Zellzyklusanalyse exponentiell wachsender Zellen nach $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung...	62
3.5.4 Zellzyklusanalyse von wiederausgesäten Zellen nach $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung .....	63
3.6 Apoptosedetektion nach Bestrahlung .....	64
3.6.1 Apoptosedetektion nach Photonenbestrahlung .....	64
3.6.2 Apoptosedetektion nach Kohlenstoffionenbestrahlung.....	65
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1 Verdopplungszeit, $\alpha/\beta$ -Wert und RBW von Kohlenstoffionen in A549-Zellen....	67
4.2 Zellzyklusarrest nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen .....	69
4.3 Apoptoseinduktion nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen.....	72
4.4 Einfluss des Tumormikromilieus auf die Genexpression .....	75
4.5 Fazit und Ausblick .....	77
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>90</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>Summary .....</b>	<b>93</b>
<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>95</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>96</b>



# 1 Einleitung

Nach Kreislauferkrankungen stellen Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache von Menschen in der Bundesrepublik Deutschland dar. Unter diesen Erkrankungen ist das Bronchialkarzinom mit einer Inzidenz von etwa 45.000 Menschen jährlich in Deutschland sehr oft vertreten und ist eine der häufigsten Ursachen malignomassoziierter Mortalität (Gaber & Wildner, 2011).

Die Strahlentherapie ist neben der Chirurgie ein zentraler Baustein in der interdisziplinären Therapie des Bronchialkarzinoms. Ist keine Operation möglich, wird in der aktuellen Leitlinie in den Stadien I und II eines nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) eine Radiotherapie durchgeführt, welche heute bevorzugt mit einer stereotaktischen Photonenradiotherapie (Hof *et al.*, 2003) erfolgen sollte. In höheren Stadien des NSCLC ohne Fernmetastasen erfolgt bei Inoperabilität die definitive kombinierte cisplatinhaltige Radiochemotherapie (Goeckenjan *et al.*, 2010). Aufgrund der teils vorhandenen Strahlenresistenz der Bronchialkarzinomzellen besteht jedoch Bedarf nach neuen effizienten Therapieoptionen - wie der Kohlenstoffionentherapie.

Bereits 1946 beschrieb der Physiker Robert Wilson die viel versprechenden Eigenschaften von beschleunigten Protonen für die Tumorthherapie und gute 25 Jahre später erfolgte die erste Tumorbestrahlung mit schweren Ionen am Lawrence Berkeley Laboratory der University of California. Im Jahr 1994 wurde schließlich der erste Patient mit Kohlenstoffionen am National Institute of Radiological Sciences (NIRS) in Japan bestrahlt (Skarsgard, 1998).

Trotz der schon viele Jahre bekannten, potentiell nutzbaren Eigenschaften von beschleunigten Partikeln für die Tumorthherapie gibt es wenige klinische Daten für die Kohlenstoffionentherapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (Liao *et al.*, 2011; Ohno, 2013; Pijls-Johannesma *et al.*, 2010). Hierbei lieferten Partikel-Zentren in Japan mit guten lokalen 5-Jahreskontrollraten (> 90%) bei nur geringgradigen Nebenwirkungen (< 5% Grad 3 und Grad 4 Frühtoxizität) vielversprechende Daten (Jiang, 2012; Miyamoto *et al.*, 2007a; Miyamoto *et al.*, 2007b).

Die günstigen physikalischen Eigenschaften von Partikelstrahlung, die bisher vorliegenden klinischen Daten für die Kohlenstoffionentherapie des Bronchialkarzinoms und das zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Bau befindliche Partikeltherapiezentrum in Marburg gaben Anlass für die Durchführung der vorliegenden Dissertation, in der

Kohlenstoffionenstrahlung als mögliche Therapieoption des NSCLC auf strahlenbiologischer Ebene in einer Bronchialkarzinomzelllinie untersucht wurde.

## 1.1 Strahlenbiologische Grundlagen

Grundlegende Kenntnisse der physikalischen und biologischen Eigenschaften von Partikelstrahlung und Photonenstrahlung sind zum Verständnis der Wirkungsweise von Kohlenstoffionenstrahlung essentiell und werden im folgenden Kapitel kurz dargestellt.

### 1.1.1 Linearer Energietransfer, Energiedeposition und relative biologische Wirksamkeit

Als Strahlung kann jede freie Ausbreitung von Energie in einem Raum bezeichnet werden. Man unterscheidet zwischen Photonenstrahlung, die aus elektromagnetischen Wellen besteht, und Partikelstrahlung, die auch als Teilchen- oder Korpuskularstrahlung bezeichnet wird. Partikelstrahlung kann aus geladenen (z. B. Elektronen und Protonen) und ungeladenen Teilchen (z. B. Neutronen), aus komplexeren Gebilden wie Molekülen oder aus ionisierten Atomen wie den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kohlenstoffionen bestehen (Reiser *et al.*, 2006).

Man unterscheidet weiterhin anhand der Energieabgabe der Strahlung zwischen dünnionisierender Niedrig-LET-Strahlung ( $<20 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), wozu Protonen und Photonen gehören, und Hoch-LET-Strahlung ( $>100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), z. B. Neutronen und Kohlenstoffionen (Fokas *et al.*, 2009). Der LET, der lineare Energietransfer, gibt dabei an, wie viel Energie ein Primärstrahl pro zurückgelegter Wegstrecke an die umgebende Materie verliert (Zirkle & Tobias, 1953); als Einheit resultiert daher  $[\text{keV}/\mu\text{m}]$ .

Bei Photonenstrahlung ist das zentrale Maß für die absorbierte Energie in einer Masse die Energiedosis (D). Sie ist definiert als Quotient aus der in einem Volumen absorbierten Energie (E) und der Masse dieses Volumens (M) (Reiser *et al.*, 2006). Die SI-Einheit der Energiedosis ist das Gray [Gy] ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ). Im weiteren Text wird häufig der Begriff „Dosis“ verwendet, was mit Energiedosis gleichzusetzen ist.

Bei der Applikation von Partikelstrahlung ist die Dosis von der Anzahl an applizierten Teilchen abhängig. Das Maß für die Teilchendichte pro Fläche ist die Fluenz (F)  $[1/\text{m}^2]$ . Da in der vorliegenden Arbeit Effekte der Kohlenstoffionenstrahlung mit Effekten der Photonenstrahlung verglichen werden sollen, ist die Quantifizierung der Kohlenstoffionenstrahlung in der klinisch geläufigen Energiedosis D notwendig.

Aus der Fluenz und dem LET der Partikel lässt sich mit Hilfe folgender Formel die entsprechende Energiedosis berechnen (Conrad, 2007; Weyrather *et al.*, 1999):

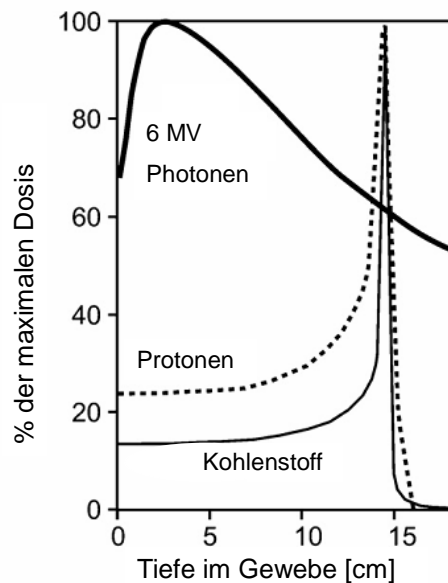
$$D = 1,602 \cdot 10^{-9} \cdot \text{LET} \cdot F \cdot \frac{1}{\rho}$$

D	:	Strahlendosis [Gy]
LET	:	Linearer Energietransfer [keV/μm]
F	:	Teilchenfluenz [1/cm <sup>2</sup> ]
ρ	:	Dichte des Bestrahlungsziels [g/cm <sup>3</sup> ]

Photonen- und Kohlenstoffionenstrahlung gehören wie oben dargestellt zu physikalisch verschiedenen Strahlenqualitäten. Daher differieren auch deren Energiedeposition sowie die Tiefendosisverläufe.

Die durch einen modernen Linearbeschleuniger erzeugte hochenergetische Photonenstrahlung erreicht ihr Dosismaximum in wenigen cm Tiefe und fällt im dahinter liegenden Gewebe exponentiell ab (**Abb. 1-1**). Dies kommt durch den so genannten Aufbaueffekt zustande: Durch Ionisationsprozesse entstehen Sekundärelektronen, die eine von der Energie der Primärstrahlung abhängige Reichweite haben. Je tiefer die Photonenstrahlung im Gewebe vordringt, desto geringer wird deren Energie und konsekutiv die Energie der Sekundärionen (Reiser *et al.*, 2006). Durch den Tiefendosisverlauf der Photonenstrahlung wird bei der Bestrahlung eines tief im Körper liegenden Tumors das Gewebe im Eintrittskanal mit einer relevanten Dosis exponiert.

Kohlenstoffionenstrahlung hat in Abhängigkeit von der Energie der Strahlung eine definierte Reichweite und verläuft aufgrund ihrer Masse auf einer linearen Spur im Gewebe (Allen *et al.*, 2011). Entlang dieser Spur findet auf engstem Raum eine hohe Zahl von Ionisationsvorgängen statt. Die entstehenden Sekundärelektronen haben allerdings eine sehr geringe kinetische Energie und konsekutiv eine geringere Reichweite als Sekundärelektronen der Photonenstrahlung (Jäkel, 2009). Durch Kollision mit Elektronen wird die Kohlenstoffionenstrahlung auf ihrem Weg in die Tiefe abgebremst. Mit abnehmender Geschwindigkeit der Partikel steigt die Energieabgabe und ist durch Elektronenaufnahme aus dem umliegenden Gewebe an einem definierten Punkt in der Tiefe maximal. Nach dem Erstbeschreiber Sir William Henry Bragg spricht man hierbei vom Bragg Peak (**Abb. 1-1**) (Kraft, 2000).



**Abb. 1-1: Tiefendosisprofile für Photonen, Protonen und Kohlenstoffionen.**

Die relative Dosis [%] ist gegen die Tiefe im Gewebe [cm] aufgetragen. Das Tiefendosisprofil von Protonen und Kohlenstoffionen zeigt einen Bragg Peak am Ende der Wegstrecke. Abbildung aus Allen *et al.* (2011).

In der klinischen Anwendung wird bei der Radiotherapie eines Tumors mit Photonen aus verschiedenen Richtungen bestrahlt, um im Zielgewebe eine ausreichend hohe Dosis zu erreichen und das umliegende Gewebe zu schonen.

Um ein Tumervolumen mit Kohlenstoffionenstrahlung homogen zu bestrahlen, werden Ionenströme verschieden hoher Energie benötigt, um in jeden Bereich des Tumors einen Bragg Peak zu legen. Dadurch entsteht ein so genannter Spread out Bragg Peak (SOBP) (Jäkel, 2009).

Aus der unterschiedlichen Art der Energiedeposition ergibt sich, dass die daraus resultierenden Schäden durch Photonen und Kohlenstoffionen differieren. Aufgrund der dichten Energieabgabe auf engstem Raum entstehen bei  $^{12}\text{C}$ -Strahlung wesentlich stärkere und komplexere Schäden im Zellkern (so genannte clustered damages), die schwerer zu reparieren sind als Photonen-induzierte Schäden (Fokas *et al.*, 2009). Dies führt wiederum zu qualitativen und quantitativen Unterschieden im biologischen Effekt der beiden Strahlenqualitäten.

Die relative biologische Wirksamkeit (RBW) ist ein Maß, um die biologische Effektivität der Strahlung zu charakterisieren. Sie ist definiert als das Verhältnis einer Referenzstrahlung  $D_{\text{ref}}$  (z. B. 250 keV-Photonenstrahlung) zur untersuchten Strahlung  $D_{\gamma}$ , bei der der gleiche biologische Effekt erreicht wird (Kraft, 2000):

$$RBW = \frac{D_{\text{ref}}}{D_Y}$$

Die RBW ist von vielen Einflussgrößen abhängig und muss für jedes Gewebe und jeden Endpunkt individuell ermittelt werden. Wichtige Einflussgrößen sind die Ionisationsdichte im Bestrahlungsziel (die wiederum vom LET abhängt), die Dosierung und Fraktionierung sowie die biologische Reparaturkapazität der Zellen (Fokas *et al.*, 2009; Weyrather *et al.*, 1999). Außerdem beeinflusst die Art des verwendeten Partikels bzw. deren Ordnungszahl die RBW (Kraft, 2000).

Protonen beispielsweise haben mit einer RBW von 1,1 nur eine minimal höhere RBW als Photonenstrahlung (RBW = 1) (Allen *et al.*, 2011; Lomax, 2009). Bei der Therapie mit Partikeln hat sich die Verwendung von <sup>12</sup>C-Kohlenstoffionen als besonders günstig erwiesen. Für Kohlenstoffionen ist die RBW im Anfangsbereich nahe dem Wert 1 und erreicht im Bragg Peak einen Wert von 2-3, wodurch das Gewebe in der Eingangsebene geschont wird und im Tumor eine hohe Energiedeposition erfolgt (Allen *et al.*, 2011; Jäkel, 2009).

### 1.1.2 Dosis-Effekt-Beziehung

Durch Ermittlung der Überlebensfraktionen nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (vgl. Kapitel 2.4) kann mit Hilfe des linear-quadratischen Modells eine zelltypspezifische Überlebenskurve erstellt werden, die weitere Parameter zur Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit von Zellen aufzeigt (Kellerer & Rossi, 1978).

Die Grundlage des linear-quadratischen Modells ist die molekulare Theorie der Strahlenletalität durch unreparierte Doppelstrangbrüche, welche durch die Spur eines oder mehrerer Sekundärionen verursacht werden können. Folgende Gleichung liegt dem Modell zugrunde:

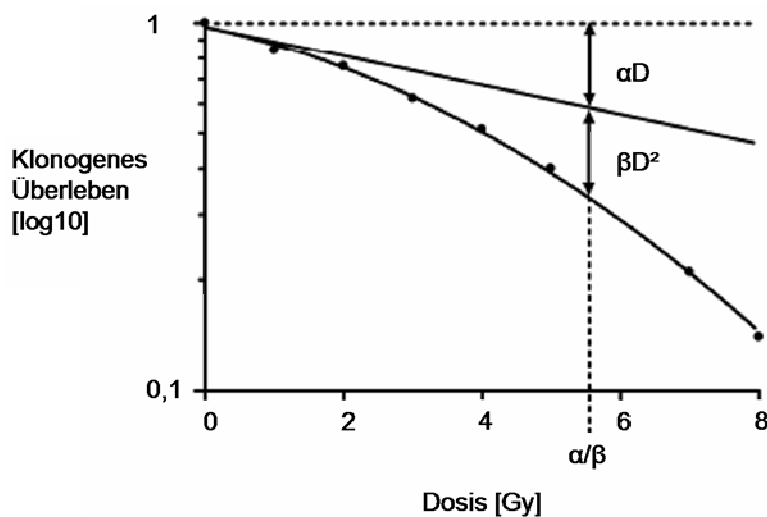
$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

SF	:	Surviving fraction = Überlebensfraktion
D	:	Applizierte Dosis [Gy]
$\alpha, \beta$	:	Zell- bzw. gewebsspezifische Konstanten [ $\text{Gy}^{-1}$ ] bzw. [ $\text{Gy}^{-2}$ ]

In der Gleichung wird durch den Term  $-\alpha D$  die Wahrscheinlichkeit eines Doppelstrangbruches durch ein einzelnes Sekundärion beschrieben (Single-Hit-Single-Target-Modell). Der Term  $-\beta D^2$  beschreibt wiederum die Wahrscheinlichkeit der Letalität durch das Zusammenspiel von mehreren subletalen Einzelstrangbrüchen, die durch mindestens zwei Sekundärionen entstanden sind (Multi-Hit-Single-Target-Modell) (Schulze, 2007).

Aus der Gleichung ergibt sich die zelltypspezifische Kurve mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Schulter im Anfangsbereich, die bei höheren Dosen in einen exponentiellen Kurvenabfall mündet. Zur graphischen Darstellung einer solchen Überlebenskurve wird das klonogene Überleben halblogarithmisch gegen die Dosis aufgetragen, was zu einer Streckung des unteren Kurvenabschnitts führt (**Abb. 1-2**).

Zur Beschreibung der Ausprägung der Schulter, welche die Fraktionierungsempfindlichkeit von Geweben beschreibt, dient der  $\alpha/\beta$ -Wert. Er gibt die Strahlendosis  $D$  an, bei der der subletale Strahlenschaden  $-\alpha D$  und der letale Strahlenschaden  $-\beta D^2$  den gleichen Anteil an der Zellabtötung haben. Ist der  $\alpha/\beta$ -Wert groß, überwiegt die lineare Komponente, d. h. die Schulter ist klein und es findet wenig Reparatur von Schäden statt.



**Abb. 1-2: Dosis-Effekt-Kurve nach dem linear-quadratischen Modell.** Darstellung einer Überlebenskurve und deren Anfangstangente mit der Steigung  $\alpha$ . Abbildung aus Schulze (2007).

## 1.2 Die Apoptose

### 1.2.1 Morphologie und Aktivierung der Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ wurde von Kerr *et al.* (1972) eingeführt, um einen spezifischen morphologischen Aspekt des Zelltodes zu charakterisieren. Die Apoptose ist ein Prozess, bei dem durch ein zelleigenes Todesprogramm das Absterben der Zelle eingeleitet wird. Zu den für die Apoptose typischen Charakteristika gehören neben der Schrumpfung des Zellkerns (Karyopyknose), der darauf folgenden Zellkernfragmentation (Karyorrhexis) auch Plasmamembranveränderungen wie die Translokation von Phosphatidylserin (Kerr *et al.*, 1972; Kroemer *et al.*, 2009).

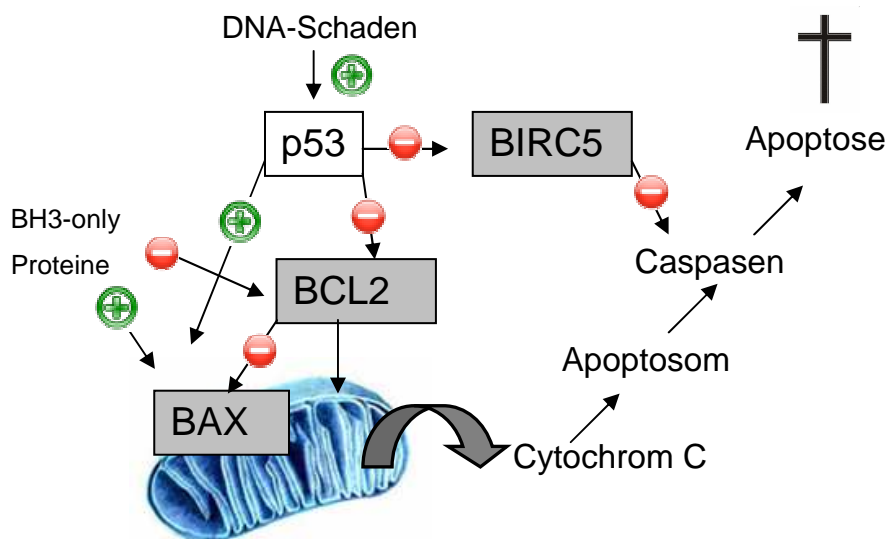
Die Apoptose kann über zwei Wege aktiviert werden. Die Aktivierung kann von außen über Todesrezeptoren vermittelt werden (extrinsischer Weg) oder sie wird über eine Aktivierungskaskade durch Mitochondrien eingeleitet (intrinsischer Weg) (Brenner & Mak, 2009). Im folgenden Abschnitt wird der intrinsische Aktivierungsweg dargestellt, da dieser bei der zellulären Strahlenantwort aktiviert wird.

Der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose wird nach DNA-Schäden eingeleitet und ist durch die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran charakterisiert. Hierdurch wird die Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren, darunter Cytochrom C, aus dem Intermembranraum gefördert. Cytochrom C bildet mit dATP, apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1) und Cysteine-dependent, aspartate specific protease 9 (Caspase-9) einen Komplex, das so genannte Apoptosom. Das Apoptosom führt wiederum zur Aktivierung von Caspasen, die Proteine spalten und zur Aktivierung von Zielproteinen wie Nukleasen führen (Brenner & Mak, 2009; Burz *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Apoptoseregulation

Der intrinsische Aktivierungsweg wird maßgeblich durch Mitglieder der B-cell CLL/lymphoma 2 Familie (BCL2-Familie) reguliert, welche aus drei Gruppen besteht. Die erste Gruppe beinhaltet anti-apoptische Proteine, darunter das der Proteinfamilie gleichnamige Protein BCL2. Die beiden anderen Gruppen umfassen pro-apoptisch fungierende Proteine, wobei die zweite pro-apoptische Gruppe, unter anderem das BCL2-associated X protein (BAX), durch Mitglieder der ersten pro-apoptischen Gruppe reguliert wird (Burz *et al.*, 2009). Die Aktivität der Mitglieder der BCL2-Familie wird über p53, ein Tumorsuppressorgen mit zentraler Rolle in der Vermittlung der zellulären Strahlenantwort, reguliert (Chipuk & Green, 2006).

Das der BCL2-Familie gleichnamige Protein BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) verdankt seinen Namen der erstmaligen Isolation in einem B-Zell-Lymphom (Tsujimoto & Croce, 1986). Für die anti-apoptotische Wirkung von BCL2 existieren drei mögliche Wege (**Abb. 1-3**) (Belka & Budach, 2002). Erstens kann BCL2 an BAX binden und dieses pro-apoptotische Protein dadurch inaktivieren (Oltvai *et al.*, 1993). Zwei weitere Möglichkeiten sind eine direkte stabilisierende Wirkung von BCL2 auf die Mitochondrienmembran (Hockenbery *et al.*, 1990) sowie die Beteiligung von BCL2 am Kalziumhaushalt von endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien, welcher eine Rolle bei der Apoptoseinduktion spielt (Belka & Budach, 2002). Die Aktivierung von p53 im Rahmen der Schadensantwort führt zu einer verminderten Expression von *BCL2* oder einer direkten Bindung von p53 an BCL2 mit nachfolgender Inhibierung des Proteins (Basu & Haldar, 1998; Chipuk & Green, 2006).



**Abb. 1-3: Die Rolle von BAX, BCL2 und BIRC5 in der Apoptoseaktivierung.**

Vereinfachte Darstellung der Funktion und Regulation der am intrinsischen Signalweg der Apoptose beteiligten Proteine BAX, BCL2 und BIRC5. Selbst erstellte Abbildung in inhaltlicher Anlehnung an Chipuk und Green (2006).

Das Apoptose-induzierende Protein BAX ist für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich, wodurch pro-apoptotische Faktoren ins Zytosol gelangen. BAX transloziert dabei in die äußere mitochondriale Membran (Brenner & Mak, 2009; Wei *et al.*, 2001). Die Aktivierung von BAX erfolgt durch Mitglieder der BH3-only Proteine (**Abb. 1-3**) (Wei *et al.*, 2001). Dabei wird eine direkte Bindung der pro-apoptotischen BH3-only Proteine an BAX oder ein wahrscheinlicherer, indirekter Weg, der eine Bindung der BH3-only Proteine an BCL2, das BAX inhibiert, diskutiert



(Brenner & Mak, 2009). *BAX* wurde als erstes Apoptose-Zielgen von p53 identifiziert (Miyashita & Reed, 1995), wobei p53 auch wie ein BH3-only Protein fungieren und dadurch *BAX* direkt aktivieren kann (Chipuk *et al.*, 2004).

Außer der oben geschilderten Apoptoseregulation durch Mitglieder der BCL2-Familie gibt es Proteine, die direkt die Aktivität der Caspasen inhibieren können: die inhibitorischen Apoptoseproteine (IAPs) (Burz *et al.*, 2009; Srinivasula & Ashwell, 2008). Eines der IAPs ist BIRC5 (baculoviral IAP repeat-containing 5), auch Survivin genannt. BIRC5 wird in Zellen fetaler Organe exprimiert, lässt sich aber in adultem Gewebe nicht mehr nachweisen. In einer Reihe von Tumorentitäten, darunter das Adenokarzinom der Lunge, wird *BIRC5* wieder exprimiert (Ambrosini *et al.*, 1997), da entartete Zellen über die Expression von Apoptoseinhibitoren ihren eigenen Untergang inhibieren können. Wie die Mitglieder der BCL2-Familie unterliegt BIRC5 der Regulation durch p53, wobei der Tumorsuppressor zu einer verminderten Transkription des Gens führt (**Abb. 1-3**) (Hoffman *et al.*, 2002).

### 1.3 Der Zellzyklus

Die Regulation des Zellzyklus findet über konsequent synthetisierte CDKs (cyclin-dependent kinases) und Cycline, deren Expression phasenspezifischen Schwankungen unterliegt, statt. Zum Fortschreiten des Zellzyklus bilden die Cycline mit den CDKs einen Komplex, wodurch diese aktiviert werden (Campbell *et al.*, 2006).

Wenn ein Schaden an der DNA entsteht, kommt es zu einer Verlangsamung oder einem permanenten Arrest des Zellzyklus, um Zeit für die Reparatur der Schäden zu erlangen beziehungsweise die Proliferation von schwer beschädigten Zellen zu vermeiden (Jeggo & Löbrich, 2006; Pawlik & Keyomarsi, 2004).

Es existieren mehrere Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus arretiert werden kann. Die am besten untersuchten Kontrollpunkte am G<sub>1</sub>/S- und am G<sub>2</sub>/M-Übergang und die daran beteiligten Gene *CDKN1A* und *GADD45A* werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

### 1.3.1 Der G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt

Entsteht während der G<sub>1</sub>-Phase ein Schaden an der DNA kann der Zellzyklus angehalten werden, wodurch verhindert wird, dass sich der Schaden durch die Duplikation der DNA in der S-Phase auf beiden Chromatiden manifestiert. Dieser Kontrollpunkt ist für das weitere Schicksal der Zellen wichtig, da hier entschieden wird, ob die Zelle den weiteren Zellzyklus durchläuft oder in einen permanenten G<sub>1</sub>-Arrest geht.

Der Übergang in die S-Phase wird dabei durch den CDK4/CDK6/Cyclin D-Komplex, den CDK2/Cyclin E-Komplex sowie durch den Phosphorylierungsgrad des retinoblastoma proteins (Rb) gesteuert. In der G<sub>1</sub>-Phase liegt Rb dephosphoryliert vor, wodurch Rb an den für den Übergang in die S-Phase benötigten Expressionsfaktor E2F binden kann und ihn dadurch inaktiviert. Im Laufe der G<sub>1</sub>-Phase wird das Rb-Protein von CDK/Cyclin-Komplexen phosphoryliert und somit inaktiviert, wodurch E2F frei vorliegt und die S-Phase eingeleitet werden kann (Deckbar *et al.*, 2011).

Nach strahleninduzierten DNA-Schäden in der G<sub>1</sub>-Phase kann ein schneller, kurz andauernder von einem verspäteten, länger andauernden G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrest unterschieden werden.

Cdc25-Phosphatasen sind für den schnell eintretenden und nur wenige Stunden andauernden Zellzyklusstopp zuständig, da hier auf Proteinebene modifiziert wird. Es kommt hier zu einer Inhibierung von Cdc25, wodurch die für den Übergang in die S-Phase benötigte Dephosphorylierung des CDK2/Cyclin E-Komplexes nicht durchgeführt werden kann.

Der Tumorsuppressor p53 ist wiederum für den verspäteten, länger oder permanent andauernden Arrest zuständig, wobei hier auf Genexpressionsebene reguliert wird (Kastan & Bartek, 2004; Lukas *et al.*, 2004). Es kommt zur Aktivierung einer Reihe von Zellzyklus-relevanten Genen, unter denen *CDKN1A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A) eine essentielle Rolle spielt (el-Deiry *et al.*, 1993).

Der erste identifizierte Cyclin/CDK-Inhibitor *CDKN1A* (Harper *et al.*, 1993) inhibiert Cyclin E, wodurch das Rb-Protein hypophosphoryliert bleibt. Dadurch wird der für den Übergang in die S-Phase benötigte Transkriptionsfaktor E2F beschlagnahmt (Cazzalini *et al.*, 2010). Dass *CDKN1A* für den G<sub>1</sub>/S-Arrest der Zelle maßgeblich ist, konnten Deng *et al.* (1995) durch einen fehlenden G<sub>1</sub>/S-Arrest nach DNA-Schäden in embryonalen Fibroblasten aus p21-Knock-out-Mäusen zeigen.

### 1.3.2 Der G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt

Der G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt verhindert das Eintreten von geschädigten Zellen in die Mitose und somit die Weitergabe von veränderter Erbinformation an beide Tochterzellen. Hierbei kann der DNA-Schaden während der G<sub>2</sub>-Phase oder bei unterlassener Aktivierung des G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkts in der vorausgegangenen S- oder G<sub>1</sub>-Phase aufgetreten sein (Lukas *et al.*, 2004).

Der Eintritt in die Mitose wird über den CDK1/Cyclin B-Komplex gesteuert, der auch als mitosis promoting factor (MPF) bezeichnet wird. Der MPF ist durch Phosphorylierung von CDK1 inaktiviert. Dephosphoryliert und aktiviert wird der Komplex durch Mitglieder der Cdc25-Familie (Deckbar *et al.*, 2011).

Die Aktivierung des G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunktes verläuft ähnlich wie die des G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunktes und beinhaltet einen schnellen, transienten und einen verspäteten, permanenten Arrest (Pawlik & Keyomarsi, 2004).

Der schnelle, dosisunabhängige Aktivierungsweg wird bei Schäden, die während der G<sub>2</sub>-Phase eintreten, aktiviert. Hierbei werden wie beim kurzlebigen G<sub>1</sub>/S-Arrest über Zwischenschritte Cdc25-Phosphatasen inhibiert.

Der langsamere, dosisabhängige Aktivierungsweg des G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkts wird bei Schäden, die in einer früheren Zellzyklusphase entstanden sind, aktiv. In wt-p53-Zellen erfolgt die Aktivierung von p53, wodurch wiederum unter anderem die Expression von *GADD45A* (Growth arrest and DNA damage-inducible, alpha) induziert wird.

Dieses Protein ist maßgeblich am G<sub>2</sub>/M-Arrest beteiligt (Wang *et al.*, 1999) und gehört zu einer aus fünf Genen bestehenden Familie, deren Mitglieder bei DNA-Schäden induziert werden (Siafakas & Richardson, 2009). *GADD45A* kann an CDK1 binden, wodurch der CDK1/Cyclin B-Komplex inaktiviert wird (Zhan *et al.*, 1999). Eine hohe Expression von *GADD45A* kann somit als Hinweis auf einen G<sub>2</sub>/M-Arrest interpretiert werden (Hollander & Fornace, 2002). Des Weiteren ist *GADD45A* während des G<sub>2</sub>/M-Arrests an der Nukleotidexzisionsreparatur von DNA-Schäden beteiligt (Hollander & Fornace, 2002). *GADD45A* ist für den G<sub>2</sub>/M-Arrest nach Zellstress wie UV-Strahlung verantwortlich, scheint aber nicht wesentlich für den durch ionisierende Strahlung induzierten G<sub>2</sub>/M-Arrest zu sein (Hollander & Fornace, 2002; Wang *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 1999). Die Expression von *GADD45A* kann sowohl p53-abhängig als auch unabhängig von p53 induziert werden (Kastan *et al.*, 1992).

## 1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die hohe relative biologische Wirksamkeit sowie der charakteristische Tiefendosisverlauf mit steilem Dosisabfall hinter dem Bragg-Peak führen zu dem großen Interesse an Kohlenstoffionenstrahlung als Therapieoption für maligne Tumoren. Aufgrund der hohen tumorbedingten Mortalität, der häufigen Inoperabilität der Patienten und der bekannten partiellen Resistenz gegenüber Photonenstrahlung stellt gerade das Bronchialkarzinom einen potentiellen Anwendungsbereich für diese Therapieform dar. Hierbei ist aufgrund deren biologischen Eigenschaften besonders der histologische Subtyp der Adenokarzinome ein wirkungsvolles Ziel für die Kohlenstofftherapie (Ohno, 2013), weshalb für die Untersuchungen dieser Arbeit die humane Adenobronchialkarzinomzelllinie A549 ausgewählt wurde.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung von dicht-ionisierender Kohlenstoffionenstrahlung im Vergleich zu dünn-ionisierender Photonenstrahlung in A549-Zellen. Um den Effekt von physikalisch äquivalenten und biologisch äquivalenten Bestrahlungsdosen in den Zellen zu analysieren, erfolgten in allen Experimenten Bestrahlungen mit unterschiedlich hohen Partikel- und Photonendosen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Untersuchung der Apoptoseinduktion und der Zellzyklusarretierung in A549-Zellen, da diese beiden Prozesse im Rahmen der strahlenbiologischen Antwort wesentlich für das weitere Schicksal der Zellen sind.

Zunächst wurde mit Hilfe eines Koloniebildungstests die relative biologische Wirksamkeit von Kohlenstoffionen im Vergleich zu Photonenstrahlung in den verwendeten A549-Zellen ermittelt.

Um über die vermehrte oder verminderte Expression von beteiligten Genen Rückschlüsse auf die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarretierung zu ziehen, erfolgten mittels quantitativer Real-Time RT-PCR Expressionsanalysen von beteiligten Genen. Hierbei wurden als Apoptose-relevante Gene *BCL2*, *BAX* und *BIRC5* und als Zellzyklus-relevante Gene *CDKN1A* und *GADD45A* ausgewählt. Um die vielfältigen Einflüsse des Tumormikromilieus auf die Tumorbestrahlung *in vivo* zu berücksichtigen, wurden zusätzliche Genexpressionsanalysen der oben genannten Gene in einem dreidimensionalen Xenografttumor nach Bestrahlung durchgeführt.

Ergänzend zu den Genexpressionsanalysen erfolgten außerdem durchflusszytometrische Untersuchungen der A549-Zellen nach Exposition mit Hoch- oder Niedrig-LET-Strahlung. Mittels PI-Anfärbung der DNA wurde unter Berücksichtigung

---

der zeitlichen Kinetik die Zellzyklusproliferation post radiationem überprüft und mit Hilfe eines Annexin V-FITC/Propidiumiodid-Assays die strahleninduzierte Apoptoseeinleitung anhand morphologischer Kriterien untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zelllinie A549

Die für die Experimente der vorliegenden Arbeit genutzte humane Zelllinie A549 (ATCC CCL-185) entstammt einem humanen Adenokarzinom der Lunge. A549-Zellen haben Eigenschaften von Pneumozyten Typ 2 (Surfactantproduktion und Teilungsfähigkeit) und wurden 1972 von einem 58-jährigen, männlichen Patienten isoliert (Giard *et al.*, 1973). Mit 58-66 Chromosomen ist A549 hypotriploid und besitzt eine Modalzahl (d. h. die häufigste gemeinsame Chromosomenzahl) von 66. A549-Zellen exprimieren p53 als Wildtyp und weisen eine K-ras-Mutation auf (Valenzuela & Groffen, 1986).

#### 2.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei 37 °C und mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in wassergesättigter Atmosphäre im Brutschrank Function line (Heraeus instruments, Hanau) inkubiert. Arbeiten an der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank Hera safe (Heraeus instruments, Hanau) durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturgefäßen der Firma Sarstedt.

Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM/ Ham's F-12 Medium mit Zusatz von 1% Non Essential Amino Acids (MEM NEAA), 1% MEM Vitamins, 1% Penicillin/ Streptomycin (100x) sowie 10% fetales Kälberserum (FCS) verwendet. Alle Produkte zur Zellkultivierung wurden über die PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen.

Im Abstand von drei bis vier Tagen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens erfolgte die Subkultivierung und Aussaat in neue Kulturgefäße. Dazu wurden die adhärensten Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA (Trypsin-Ethylen-diamintetraessigsäure) überschichtet und dessen Wirkung nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank durch Zugabe von Medium abgestoppt. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) wurden die Zellen in der Routinekultur mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät.

### 2.1.3 Wachstumskurve

Zur Erfassung des Wachstumsverhaltens wurde das Wachstum der A549-Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen über eine Bestimmung der Gesamtzellzahl in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche in Petrischalen ausgesät und die Zellzahl zweimal täglich mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Für die Bestimmung der Populationsverdopplungszeit wurde die ermittelte Zellzahl pro Quadratzentimeter Wachstumsfläche halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und die Verdopplungszeit anhand der Steigung im exponentiellen Teil der Kurve berechnet.

## 2.2 *in vivo*-Modell

Um den Einfluss des Tumormikromilieus auf die zelluläre Strahlenantwort zu untersuchen, wurde die Änderung der Genexpression in einem subkutanen Xenograftmodell der Maus untersucht. Für die Analysen wurde Tumormaterial aus unserer Arbeitsgruppe (AZ.V54-19c 20-15 (1) GI 20/10 Nr. 36/2012) nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen von Frau Dr. Florentine Subtil (geb. Kamlah), Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Marburg, bereitgestellt.

Für die Generierung von Xenograft-Tumoren des humanen Adenokarzinoms wurden durch Frau Dr. Subtil A549-Karzinomzellen subkutan in den Oberschenkel immunsupprimierter BALB/C nu/nu Mäusen unter sterilen Bedingungen injiziert (Kamlah, 2007). Da die Nacktmäuse keinen Thymus und konsekutiv auch keine T-Lymphozyten besitzen, stoßen sie humane Tumorzelllinien nicht ab.

Vier Stunden nach der Bestrahlung (vgl. Kapitel 2.3.2.2) wurden die Nacktmäuse durch eine Überdosis des Narkotikums Pentobarbital getötet, die Tumoren extrahiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80$  °C gelagert. Aus dem Tumorgewebe wurden Gewebeschnitte angefertigt, aus denen die RNA isoliert wurde (vgl. Kapitel 2.5).

## 2.3 Bestrahlung und Dosimetrie

Die als Monolayerkultur wachsenden A549-Zellen und der in der Nacktmaus etablierte A549-Xenograft wurden jeweils mit Photonen oder mit Kohlenstoffionen bestrahlt. Für jeden untersuchten Zeitpunkt existierte eine unbehandelte Kontrolle. Die Kontrollen wurden zu den jeweiligen Bestrahlungsplätzen mitgenommen, verblieben während der Applikation aber abgeschirmt außerhalb des Bestrahlungsfeldes.

### 2.3.1 Photonenbestrahlung der Monolayerkulturen

Photonenexperimente erfolgten an einem im Regelbetrieb für die Strahlentherapie eingesetzten 6 MV-X Linearbeschleuniger Elekta Supernova (Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg).

Die durch den Aufbaueffekt bedingte Verschiebung des Dosismaximums in die Tiefe wurde beim experimentellen Aufbau zur Zellkulturbestrahlung berücksichtigt. Um die maximale Dosis in der Zellschicht zu positionieren, passierte die Photonenstrahlung eine 1,5 cm dicke Kunststoffplatte aus Polymethylmethacrylat, bevor sie auf die Zellen in den Petrischalen traf. Dazu wurde die um 360° schwenkbare Gantry so weit gedreht, dass die Strahlung von unten auf die Kunststoffplatte traf. Die entstehende Streustrahlung wurde durch Auflegen einer 3 cm dicken Platte aus Polymethylmethacrylat bei der Dosimetrie berücksichtigt.

### 2.3.2 Bestrahlungsexperimente mit Kohlenstoffionen

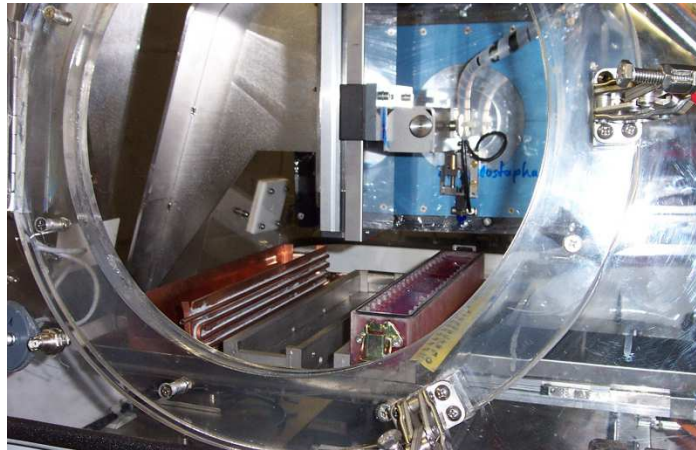
Alle Kohlenstoffionenbestrahlungen erfolgten am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt durch unsere Arbeitsgruppe.

#### 2.3.2.1 $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung der Monolayer

Die Monolayer-Bestrahlungen wurden mit dem 120 m langen Linearbeschleuniger Universal Linear Accelerator (UNILAC) durchgeführt, der die Ionen auf bis zu 20% Lichtgeschwindigkeit beschleunigt. Am Niederenergie-Strahlplatz X6 der UNILAC-Experimentierhalle wurden die auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm wachsenden Zellen mit einem automatisierten Vakuum-Greifer-System im Strahl positioniert und nach Bestrahlung wieder in das mit Zellkulturmedium gefüllte Magazin abgesenkt (**Abb. 2-1**). Die Kalibrierung des Strahls erfolgte über CR39-Spurdetektoren.

Die Energie der Ionen im Zielvolumen ist gegenüber der vom Beschleuniger gelieferten Primärenergie von 11,4 MeV/u geringer, da sie durch die Folien des Austrittsfensters und des Transmissions-Monitors sowie durch die Luftstrecke und durch den Boden der Kulturflasche vermindert wird. Dies wurde bei der Dosisbestimmung im Zielvolumen (Zellschicht) berücksichtigt. Die Energie der Kohlenstoffionen lag bei 9,8 MeV/u in der Zielschicht bei einem linearen Energietransfer (LET) von 170 keV/μm.





**Abb. 2-1: Kohlenstoffionenbestrahlung am UNILAC des GSI Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung.** Geöffnete Expositions-kammer mit Blick auf ein mediumgefülltes Magazin mit Zellkulturschalen am Niederenergie-Strahlplatz X6 in der UNILAC-Experimentierhalle. Abbildung aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Andrea Arenz, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Marburg.

### **2.3.2.2 Bestrahlung der A549-Xenografttumoren**

Die Bestrahlung der Xenograftmodelle in der Maus wurde in dem für die Patientenbestrahlung vorgesehenen Bestrahlungsraum Cave M in einer speziellen Apparatur durchgeführt. Die benötigten Ionen wurden mit dem Synchrotron SIS, der für Akzelerationen bis zu 90% Lichtgeschwindigkeit entwickelt wurde, beschleunigt.

Zur Bestrahlung der subkutanen Tumoren wurde ein Spread out Bragg Peak von 4 cm, aufgeteilt in 20 Schichten zu je 2 mm, über den Tumor gelegt. Die Energie der Strahlung lag in den einzelnen Schichten zwischen 122 MeV/u und 183 MeV/u und der LET betrug im Bragg Peak im Mittel 55 keV/ $\mu\text{m}$ .

Zum Zeitpunkt der Bestrahlung mit Photonen bzw. Kohlenstoffionen hatten die Tumoren ein Volumen von etwa 90 bis 200 mm<sup>3</sup> erreicht (**Tabelle 2-1**). Für die Genexpressionsanalysen wurden insgesamt neun Mäuse in die Untersuchung einbezogen. Jeweils drei Tumoren wurden mit 2 Gy Kohlenstoffionen oder mit 6 Gy Photonen bestrahlt. Weitere drei Tumoren dienten als Kontrolle.

**Tabelle 2-1:** Volumina der Tumoren vor der Bestrahlung.

<b>Maus-Nr.</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Tumorzvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>
1	Kontrolle (1)	129,96
2	Kontrolle (2)	133,96
3	Kontrolle (3)	127,80
4	Kohlenstoffionen [2 Gy] (1)	88,84
5	Kohlenstoffionen [2 Gy] (2)	88,48
6	Kohlenstoffionen [2 Gy] (3)	89,93
7	Photonen [6 Gy] (1)	115,25
8	Photonen [6 Gy] (2)	181,68
9	Photonen [6 Gy] (3)	202,80

### 2.3.3 Bestrahlungsexperimente in der Übersicht

Die folgende Tabelle (**Tabelle 2-2**) gibt eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bestrahlungsexperimente.

**Tabelle 2-2:** Übersicht aller durchgeführten Bestrahlungsexperimente

<b>Experiment</b>	<b>Photonen</b>	<b><sup>12</sup>C</b>
<b>Monolayer</b>		
<b>Koloniebildungstest</b>	0,5 Gy	0,5 Gy
	1 Gy	1 Gy
	1,5 Gy	2 Gy
	2 Gy	
	4 Gy	
	6 Gy	
	8 Gy	
<b>Genexpressionsanalysen</b>	2 Gy	2,5 Gy
	4 Gy	4,5 Gy
	6 Gy	
	7,5 Gy	
<b>Zellzyklusarrest- exponentiell</b>	2 Gy	2 Gy
	4 Gy	4 Gy
	6 Gy	
<b>Zellzyklusarrest- konfluent</b>	2 Gy	
	4 Gy	
	6 Gy	
	7,5 Gy	
<b>Zellzyklusarrest- Wiederaussaat</b>		2 Gy
		4 Gy
		6 Gy
		8 Gy
<b>Apoptosedetektion</b>	2 Gy	2 Gy
	6 Gy	4 Gy
	10 Gy	
<b>Xenograft</b>		
<b>Genexpressionsanalysen</b>	6 Gy	2 Gy

## 2.4 Koloniebildungstest

Die Daten des Koloniebildungstests wurden durch unsere Arbeitsgruppe erhoben (Kamlah *et al.*, 2011) und sind nicht von der Autorin dieser Arbeit eigenständig durchgeführt worden.

Durch strahleninduzierte DNA-Schäden nimmt die Teilungsfähigkeit der Zellen ab und es kommt zum reproduktiven Zelltod. Die Klonogenität nach Bestrahlung wurde mit Hilfe des Koloniebildungstest nach Puck und Marcus (Puck & Marcus, 1956) untersucht.

Die ausgesäte Zellzahl wurde der Bestrahlungsdosis derart angepasst, dass zum Auswertungszeitpunkt etwa 50 gebildete Kolonien pro Petrischale vorhanden waren. Die dafür erforderlichen Zelleinsaatensind in Vorversuchen ermittelt worden. Es galten nur Kolonien mit einer Mindestgröße von 50 Tochterzellen als überlebend. 16 h nach Aussaat erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit Dosen von 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy Photonen ( $n = 3$  mit je drei Petrischalen pro Kondition). Die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen erfolgte aufgrund des limitierten Zugangs zur Partikelstrahlung nur mit 0,5, 1 und 2 Gy Kohlenstoffionen ( $n = 1$  mit je fünf Petrischalen pro Kondition).

Neun bis zwölf Tage später wurde die Koloniebildung und damit das zelluläre Überleben überprüft. Zur makroskopischen Auswertung wurden die Zellen mit einer Lösung bestehend aus 0,1% Kristallviolett und 10% Formaldehyd für 10 min angefärbt, anschließend gewaschen und luftgetrocknet.

Die Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen in Kultur wurde über zwei Parameter ermittelt. Zunächst wurde aus dem Quotienten der beobachteten Koloniezahl und der Anzahl der ausgesäten Zellen die Plattierungseffizienz (plating efficiency = PE) berechnet. In weiteren Versuchen konnte dann das relative Zellüberleben (SF = surviving fraction) nach Bestrahlung ermittelt werden, indem die PE der behandelten Zellen über die PE unbehauelter Zellen normiert wurde.

Nach Auswertung der Daten mit dem Programm DOSE (Dr. Christa Baumstark-Khan, Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt, Köln) wurde mit Hilfe des linear-quadratischen Modells (LQ-Modell) (vgl. Kapitel 1.1.2) anhand der ermittelten Überlebensfraktionen eine Zellüberlebenskurve für Photonen und Kohlenstoffionen erstellt.

## 2.5 RNA-Isolation

Es wurde bei allen Arbeiten mit RNA sichergestellt, dass RNase freie Geräte und Lösungen verwendet wurden. Für RNA- und PCR-Arbeiten wurden ausschließlich Dual Filter T.I.P.S. Pipetten (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Alle verwendeten Lösungen wurden mit RNase-freiem DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser) hergestellt. Dazu wurde dem Wasser 0,1% DEPC zugesetzt, die Lösung mindestens 30 min geschüttelt und zur Inaktivierung des DEPC anschließend autoklaviert.

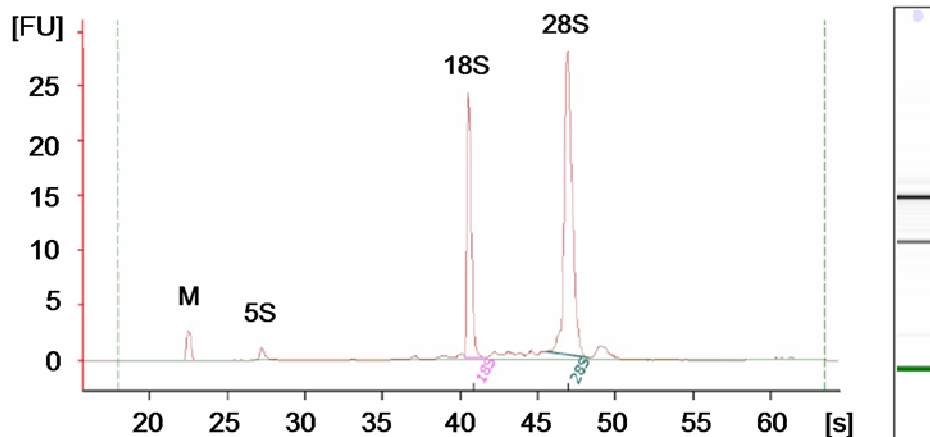
Die RNA der Monolayerproben wurde mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Nach der RNA-Isolation erfolgte ein DNase-Verdau auf der Ionenaustauscher-Säule nach Herstellerangaben.

Für die Isolation der RNA aus den Xenografttumoren wurden jeweils 50-100 mg Gewebe aus Gefrierschnitten aus dem Tumorzentrum in 1 ml Trifast aufgenommen. Die RNA-Extraktion erfolgte im Anschluss daran mit peqGold Trifast (PeqLab, Erlangen) nach Herstellerangaben, basierend auf einer Einschritt-Flüssigphasen-Separation.

## 2.6 Quantifizierung und Qualitätsprüfung der RNA

Die Überprüfung der Integrität der RNA und deren exakte Quantifizierung erfolgte mit einem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Zuhilfenahme von RNA 6000 Nano LabChips desselben Herstellers. Die von diesem Gerät verwendete Lab-on-a-chip Technologie basiert auf dem Prinzip der Mikrofluidik. Dabei werden kleinste Mengen mit Farbstoff markierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert.

Über einen in die Software integrierten Algorithmus wurde jede Probe mit einer RNA-Integritätsnummer (RIN) versehen, die unter Berücksichtigung der gesamten Elektrophoresespur einen vergleichbaren, reproduzierbaren Parameter zur Beurteilung der RNA-Qualität liefert. Vollständig degradierte RNA hat eine RIN von 1, komplett intakte RNA eine RIN von 10. Für die weiteren Arbeiten wurde ausschließlich mit RNA gearbeitet, die mindestens eine RIN von 8,5 hatte, was einer sehr guten RNA-Integrität entspricht (Fleige & Pfaffl, 2006). **Abbildung 2-2** zeigt ein exemplarisches, repräsentatives Elektropherogramm von intakter RNA. Für die Ermittlung der RNA-Konzentration wurde ein Größenstandard (RNA 6000 Ladder, Ambion, Huntingdon, UK) parallel mitgeführt.



**Abb. 2-2: Exemplarisches Elektropherogramm (links) und „Gel-like Image“ (rechts) von intakter RNA.** Die Analyse im Bioanalyzer ermittelte eine RIN von 10 und eine RNA-Konzentration von 194 ng/ $\mu$ l.

**M=** Marker, **5S=** 5S rRNA, **18S=** 18S rRNA, **28S=** 28S rRNA, [FU]= Geräte-spezifische Fluoreszenzeinheit

## 2.7 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der isolierten einzelsträngigen Total-RNA in cDNA erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München), der eine modifizierte reverse Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) beinhaltet und ein Gemisch aus Random Hexamers und Oligo-dT-Primern enthält.

Die eingesetzte Menge an RNA lag zwischen 500 und 1000 ng pro Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l. Nach einem Denaturierungsschritt bei 65 °C wurde das Protokoll nach Herstellerangaben durchgeführt. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine so genannte RT-minus-Kontrolle aus gepoolter RNA ohne Zugabe des Enzyms reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese mitgeführt. Eine negative RT-minus-Kontrolle stellt sicher, dass das PCR-Produkt nicht aus genomischer DNA als Matritze amplifiziert wurde.

## 2.8 Genexpressionsanalyse

Die zur Genexpressionsanalyse durchgeführte quantitative Real-Time RT-PCR (kurz: qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für doppelsträngige Nukleinsäuren, die auf einer Polymerasekettenreaktion basiert und eine Quantifizierung des ursprünglich vorhandenen Amplifikats schon während des PCR-Vorgangs ermöglicht.

Während der Durchführung der PCR wurde die Fluoreszenzentwicklung des interkalierenden Farbstoffes SYBR-Green in Echtzeit gemessen. Die Fluoreszenz stieg im exponentiellen Teil der PCR proportional mit der Menge des gebildeten doppelsträngigen Amplifikats an. Um Rückschlüsse auf die Startmenge des Amplifikats ziehen zu können, wurde ein Schwellenwert - ein so genannter CT-Wert (Cycle Threshold Wert) - ermittelt. Der CT-Wert beschreibt den Zyklus, in dem die Fluoreszenz des Amplifikats die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Je geringer die Menge an enthaltenem Startmaterial in einer Probe war, desto höher war der CT-Wert, da mehr Zyklen benötigt wurden, um die nötige Fluoreszenz für den Schwellenwert zu erreichen.

### 2.8.1 Primerdesign und Präanalytik

Die verwendeten Primer (**Tabelle 2-3**) wurden nach im Labor etablierten Sequenzen erstellt und über Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Die erstellten Primer wurden anschließend im Bezug auf ihre Annealingtemperatur, Annealingzeit und die Primerkonzentration im MyIQ Thermal Cycler (Bio-Rad, München) optimiert und die Spezifität der Primer über eine Sequenzierung des PCR-Produkts bzw. einen analytischen Restriktionsverdau in Vorversuchen sichergestellt.

**Tabelle 2-3:** Sequenz, Annealing-Temperatur (Temp.), Amplikonlänge (Länge) und Nummer des Gendatenbankeintrags (NCBI) der für die Genexpressionsanalyse verwendeten Primer, bp= Basenpaare

Genname	Sequenz 5´- 3´	Temp. [°C]	Länge [bp]	NCBI
<b>Referenzgene</b>				
<i>ACTB</i>	fwd CAAGATCATTGCTCCTCCTGA rev AGTCCGCCTAGAAGCATTTG	60	155	NM_001101
<i>GAPDH</i>	fwd CAATGACCCCTTCATTGACC rev GATCTCGCTCCTGGAAGATG	60	146	NM_002046
<i>PBGD</i>	fwd CAGCTTGCTCGCATACAGAC rev GAATCTTGTCCCCTGTGGTG	60,4	106	NM_000190
<i>B2M</i>	fwd GGCTATCCAGCGTACTCCAAA rev CCAGTCCTTGCTGAAAGACAA	60	184	NM_004048
<b>Zielgene</b>				
<i>CDKN1A</i>	fwd.:GGACAGCAGAGGAAGACCATGT rev: TGGAGTGGTAGAAATCTGTCATGC	60	150	NM_000389
<i>GADD45A</i>	fwd GAGAG CAGAAGACCG AAAGGA rev CACAACACCACGTTATCGGG	61,9	145	NM_001924
<i>BIRC5</i>	fwd: GTTGC GCTTTCTTTCTGTC rev: TCTCCG CAGTTTCTCAAAT	58,5	141	NM_001168
<i>BAX</i>	fwd: GGGGACGAACTGGACAGTAA rev: CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	61,3	122	NM_004324
<i>BCL2</i>	fwd: TCGTTGCCTTATGCATTTGT rev: TCTTTATTT CATGAGGCACGTT	59,1	144	NM_000633

### 2.8.2 Wahl der Referenzgene

Bei der relativen Quantifizierung der Genexpression wurde die Expression des Zielgens über die Expression des Referenzgens oder eines Referenzgenindex, welcher sich aus mehreren Referenzgenen zusammensetzt, normalisiert. Der Vorteil dieser Normalisierung lag darin, dass die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert wurde, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkription Zielgene und Referenzgene gleichermaßen betrafen. Bei der nachfolgenden Berechnung des Expressionsunterschiedes heben sich diese Effekte wieder auf (siehe Kapitel 2.8.5). Ein ideales Referenzgen sollte auch unter Bestrahlung stabil exprimiert werden. Nach



Möglichkeit sollte es nicht aktiv reguliert werden und auf annähernd gleichem Niveau wie das Zielgen exprimiert werden. Da ein ideales Referenzgen nicht existiert (Thellin *et al.*, 1999), wurde für jedes qRT-PCR-Experiment die Expression von vier Referenzgenen (**Tabelle 2-4**) nach Bestrahlung untersucht.

Anschließend wurde mit dem Excel-basierten Programm BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) die Stabilität der vier Referenzgene unter den verschiedenen Konditionen ermittelt und im Programm GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) die optimale Kombination der Referenzgene für die Berechnung des Normalisierungsfaktors bestimmt.

**Tabelle 2-4:** Eigenschaften der verwendeten Referenzgene

<b>Gen</b>	<b>Eigenschaften</b>
<b>ACTB</b> Actin beta	Strukturprotein des Zytoskeletts, Aufgaben im Bereich Mobilität, Struktur und Integrität
<b>B2M</b> Beta-2-microglobulin	Bestandteil des MHC1- Proteins, befindet sich auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen
<b>GAPDH</b> Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat in der aeroben Glykolyse
<b>PBGD</b> Porphobilinogen deaminase	Enzym der Hämoglobinsynthese, in vielen humanen Tumoren erhöht

### 2.8.3 Durchführung der qRT-PCR

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time RT-PCR wurde ein MyiQ-Cycler mit weißen 96-Multiply PCR-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) und dazu passenden, optisch klaren, flachen Deckeln (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Als Template für die qRT-PCR wurden 10 ng cDNA in 2 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die qRT-PCR wurde mit einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermix zeigt **Tabelle 2-5**.

**Tabelle 2-5:** Zusammensetzung des Mastermix für 25  $\mu$ l Reaktionsvolumen

Reagenzien	Volumen je Probe
2x Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Thermo Fisher Scientific, Epsom, Surrey, UK)	12,5 $\mu$ l
Wasser (Aqua ad iniectionem, B. Braun, Melsungen)	10 $\mu$ l
Forward Primer (0,2 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l
Reverse Primer (0,2 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l

Alle Analysen erfolgten in Triplikaten. Es wurde bei jedem qRT-PCR-Lauf eine No-Template-Control, die Wasser anstatt von cDNA enthält, und eine RT-minus-Kontrolle (s. o.) in Duplikaten mitgeführt.

Folgendes Protokoll wurde durchgeführt:

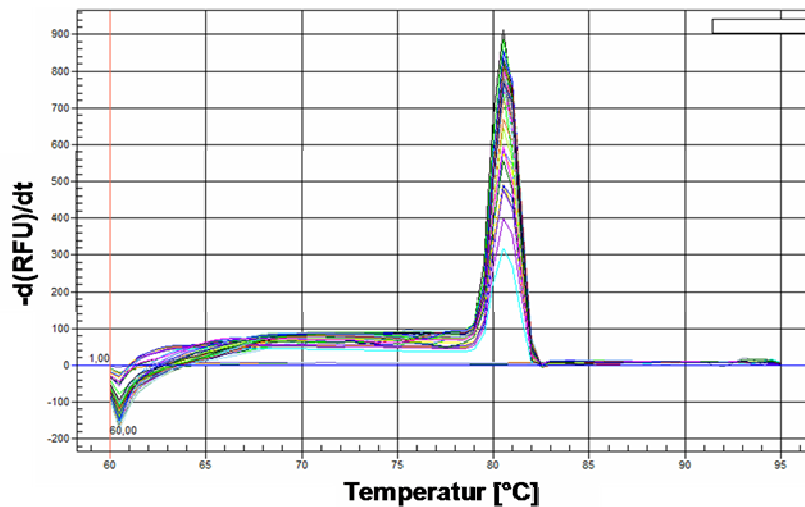
- einmalig 15 min                      95 °C: Aktivierung der HotStart Polymerase
- 1. 15 sec                                95 °C: Denaturierung
- 2. 30 sec                                Primer-Annealing-Temperatur (vgl. Tabelle 2-3)
- 3. 30 sec                                72 °C: Elongation

Die Schritte 1.-3. erfolgten in einer Wiederholung von 40 Zyklen.

#### 2.8.4 Überprüfung der Spezifität des Amplifikats

Im Anschluss an den qRT-PCR-Lauf wurden im MyIQ Thermal Cycler Schmelzkurvenanalysen im Temperaturbereich von 60 °C bis 95 °C durchgeführt, um die Spezifität des Amplifikats nachzuweisen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen unter Freisetzung des SYBR-Farbstoffes, wodurch es zu einer deutlichen Abnahme der gemessenen Fluoreszenz kommt.

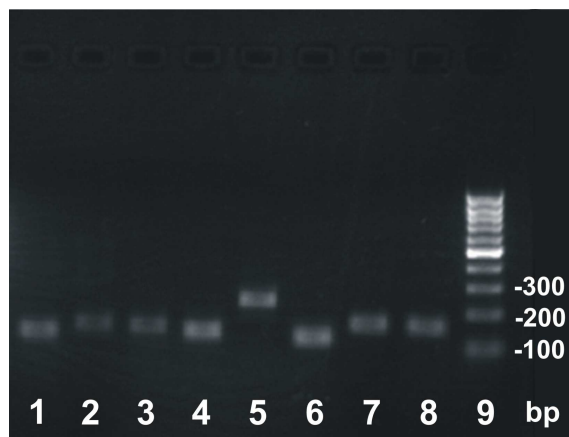
Trägt man die Fluoreszenz gegen die Temperatur auf, ergibt sich dadurch ein abnehmendes Signal. Aus der Steigung dieser Kurve lassen sich über die erste negative Ableitung ( $-d\text{Signal}/d\text{Zeit}$ ) spezifische Temperaturmaxima für die verschiedenen Amplifikate in Abhängigkeit von deren Länge berechnen (**Abb. 2-3**). Würden weitere Peaks in der Schmelzkurve auftreten, wäre dies ein Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe, unspezifische Amplifikation oder eine Primerdimer-Bildung.



**Abb. 2-3: Schmelzkurvenanalyse des qRT-Amplifikats.** Die erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit ist gegen die Temperatur aufgetragen. Die Abbildung zeigt mehrere spezifische Amplifikate eines Laufs mit jeweils typischem Peak.

Ergänzend zu den Schmelzkurvenanalysen wurde nach jedem Experiment für jedes Gen aus einer gepoolten Probe die zu erwartende Amplifikatlänge über eine Gelelektrophorese (**Abb. 2-4**) nachgewiesen. Dazu wurde ein 2%iges, Ethidiumbromidhaltiges (4  $\mu$ l Ethidiumbromid 10 mg/ml auf 100 ml) Agarosegel gegossen und mit TAE-Laufpuffer (s. u.) überschichtet. Für die aufzutrennenden Proben wurden je 10  $\mu$ l der qRT-PCR-Probe (gepoolt aus allen Konditionen) und 2  $\mu$ l 6x Loading-Dye (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Als Referenz wurde ein 100-Basenpaar-Leiter (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

**TAE-Puffer** (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) (50x für 500 ml): 121 g Tris-Base, 28,55 ml Eisessig, 50 ml 0,5M EDTA + Einstellen mit Kaliumhydroxid auf pH 8,0



**Abb. 2-4: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate.** Dargestellt ist eine Gelelektrophorese einer Reihe untersuchter Gene auf einem 2%igen Agarosegel.

**1** = *BAX*, 122 bp, **2** = *BCL2*, 144 bp, **3** = *BIRC5*, 141 bp, **7** = *CDKN1A*, 150 bp, **8**= *GADD45A*, 145 bp, **9** = 100 bp Ladder. bp= Basenpaare.

### 2.8.5 Auswertung und Statistik

Die relative Genexpression wurde mit der Software REST© (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl *et al.*, 2002) berechnet, die auf dem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell nach Pfaffl (2006) basiert. Die Software fasst zunächst die CT-Werte der dreifach durchgeführten Proben zu Mittelwerten zusammen. Dem Modell liegt folgende Formel zugrunde:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta \text{CT}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta \text{CT}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Ratio = Relatives Expressionsverhältnis

$E_{\text{Zielgen}}$  = Effizienz der Amplifikation des Zielgens

$E_{\text{Referenzgen}}$  = Effizienz der Amplifikation des Referenzgens

$\Delta \text{CT}_{\text{Zielgen}}$  = CT Differenz Kontrolle – Behandlung des Zielgens

$\Delta \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$  = CT Differenz Kontrolle – Behandlung des Referenzgens

Hierbei wird jeweils der CT-Wert der behandelten Probe vom CT-Wert der Kontrolle abgezogen und dies über das Referenzgen bzw. den Referenzgenindex normalisiert. In der obigen Rechnung sollte im Idealfall – wenn das Referenzgen stabil exprimiert

wird - der Nenner den Wert eins ergeben, wodurch die relative Expression nur noch vom Zielgen abhängig wäre.

Zur Berechnung der Effizienz und Linearität der Reaktion wurde eine Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA hergestellt. Trägt man die eingesetzte Menge cDNA in einer logarithmischen Funktion gegen die CT-Werte auf, so kann aus der Steigung dieser Kurve mit der Formel  $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$  die Effizienz der Reaktion berechnet werden. Die Linearität wurde über die Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten, der sich aus der Regressionsgeraden berechnen lässt, überprüft.

Die Statistik der REST-Software beruht auf einem von der Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test©) (Pfaffl *et al.*, 2002).

Für die Genexpressionsanalysen der Maustumoren wurden die mittels qRT-PCR für die verschiedenen Konditionen ermittelten CT-Werte mit jeweils drei Tieren pro Kondition für die Analyse in REST© zusammengefasst.

### 2.8.6 Darstellung der Expressionsanalysen

Die Darstellung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgt zum besseren Verständnis der Abbildungen als Logarithmus zur Basis 2. Bei einer linearen Darstellung würde ein Wert von +1 den unveränderten Zustand darstellen, +0,5 wäre eine Halbierung und +2 eine Verdopplung, wodurch die Werte +2 und +0,5 unterschiedlich weit von der Ausgangsebene entfernt wären. Würde man als Konsequenz daraus den Wert 0,5 reziprok ( $1/0,5 = -2$ ) darstellen, wäre der Bereich zwischen +1 und -1 nicht definiert. Die Lösung dieses Problems stellt eine Darstellung als Logarithmus zur Basis 2 dar. Wenn ein Gen in der  $\log_2$ -Darstellung um +2 hochreguliert wird, entspricht dies einer Hochregulierung um den Faktor 4 ( $2^2$ ); ein Wert von -1 auf der  $\log_2$  Achse stellt eine Halbierung ( $2^{-1}$ ) dar.

In den Abbildungen in Kapitel 3.4 stellen Werte zwischen +1 und -1 auf der  $\log_2$ -Achse, das heißt eine Regulation zwischen 0,5-fach bis 2-fach, natürliche Schwankungen in der Genregulation dar. Ermittelt wurde dieser natürliche Schwankungsbereich durch eine Analyse der CT-Werte der unbehandelten Kontrollen zu den verschiedenen Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt). Die Markierung „\*“ zeigt signifikante ( $p < 0,05$ ) Genexpressionsänderungen an, die mittels Randomisierungstest mit der Software REST© (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl *et al.*, 2002), ermittelt wurden (vgl. Kapitel 2.8.5).

## 2.9 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die für die Zellzyklusanalyse und Apoptosedetektion verwendete Durchflusszytometrie ermöglicht es, Zellpopulationen auf ihre Morphologie, Granularität und Fluoreszenzintensität hin zu untersuchen.

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen durch einen Laserstrahl (Argon 488 nm) angeregt und emittieren dabei optische Signale, die detektiert werden. Dazu werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln den Laserstrahl. Dabei streuen sie das einfallende Licht in verschiedene Richtungen, was mittels Detektoren nachgewiesen wird. Hierbei kann über Vorwärtsstreulicht (FCS= *Forward Scatter*) eine Aussage über das Volumen der Zellen und über Seitwärtsstreulicht (SSC= *Sideward Scatter*, gemessen 90° zu einfallendem Laserstrahl) ein geänderter Brechungsindex an Grenzflächen (Zellmembran, Zellkern, Granula, etc.) erfasst werden.

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am BD LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Die Datenakquisition erfolgte mit BD FACSDiva und mit der Software FlowJo 7.5 (Tree Star Inc., Ashland, USA; <http://www.flowjo.com>) wurde die Auswertung vorgenommen.

### 2.9.1 Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung

Eine Analyse der Zellzyklusverteilung der mit Photonen oder Kohlenstoffionen bestrahlten Zellen erfolgte mit Hilfe von Propidiumiodid (PI)-Färbung im Durchflusszytometer. Es wurden im Photonenexperiment vergleichend bestrahlte exponentiell wachsende Zellen und bestrahlte konfluent wachsende Zellen nach Wiederaussaat untersucht. Im Kohlenstoffexperiment erfolgten ausschließlich Analysen exponentiell wachsender Zellen post radiationem.

Die Zellzyklusverteilung exponentiell wachsender Zellen wurde nach Photonenbestrahlung mit Dosen von 2, 4 und 6 Gy zu den Zeitpunkten 6, 12, 20, 26, 39, 48 und 64 h ermittelt. Die konfluent wachsenden A549-Zellen wurden mit 2, 4, 6 und 7,5 Gy Photonen exponiert und 12, 20, 26, 39, 48 und 66 h post radiationem untersucht. Die Zellzyklusanalysen nach Kohlenstoffionenbestrahlung mit Dosen von 2, 4, 6 und 8 Gy erfolgten zu den Zeitpunkten 6, 12, 18, 24, 36, 48 und 68 h.

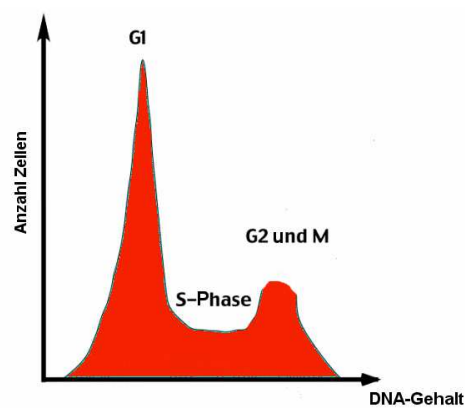
Zur Zellzyklusanalyse wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung die Zellen und deren Überstand mit 3 ml Accutase trypsiniert und in 7 ml 100%iges Ethanol (Endkonzentration 70% Ethanol) auf dem Vibromischer aufgenommen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Für die Zellzyklusanalyse erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C über 30 min mit einem RNase-haltigen Propidiumiodidpuffer, der Triton zur Permeabilisierung der Zellmembran enthält. PI interkaliert zwischen die Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren und ermöglicht so die Messung des relativen DNA-Gehalts der Zellen.

**Propidiumiodidpuffer:** 20 µg/ml Propidiumiodid, 200 µg/ml RNase A, 0,1% Triton

Für die Zellzyklusanalyse wurden 20.000 Zellen im BD LSR II gemessen. Die PI-Intensität wurde über den PE-Kanal (Exzitationsmaximum 496 nm bis 564 nm, Emissionsmaximum 578 nm) erfasst. Alle gemessenen Zellen wurden in einem Dot Plot (FCS gegen SCC) dargestellt und mit Hilfe eines Gates wurden Zellfragmente und -trümmer aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Zur Quantifizierung der Zellzyklusverteilung wurde die Anzahl der Zellen gegen die Fluoreszenzintensität, die dem DNA-Gehalt entspricht, als Histogramm (**Abb. 2-5**) dargestellt. Die Phasen G<sub>2</sub> und M lassen sich aufgrund ihres identischen DNA-Gehaltes nicht getrennt aufführen. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden mit einer reduzierten Anzahl von Proben drei Wiederholungen für die exponentiell wachsenden und zwei Wiederholungen für konfluent wachsende und erneut ausgesäten Zellen durchgeführt.



**Abb. 2-5: Schematische Histogrammdarstellung der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation.** Die Anzahl der Zellen wurde gegen deren DNA-Gehalt aufgetragen, wodurch sich die quantitative Verteilung im Zellzyklus darstellen lässt. Abbildung von Frau Dr. Andrea Arenz, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Marburg.

### 2.9.2 Annexin V/PI-Assay

Bei der Apoptose-Detektion mit Annexin V-FITC macht man sich zunutze, dass Annexin V mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, einen Bestandteil der Zellmembran, bindet. Phosphatidylserin befindet sich bei vitalen Zellen nur in der inneren Lipidschicht der Zellmembran und transloziert zu Beginn der Apoptose zur äußeren Schicht. Annexin V kann somit als empfindlicher Marker für die Phosphatidylserin-Exposition auf der Membranaußenseite aller exprimierenden apoptotischen Zellen eingesetzt werden und ist daher zur Detektion apoptotischer Zellen in Zellgemischen geeignet (Vermees *et al.*, 1995).

Da nekrotische Zellen durch den Verlust ihrer Membranintegrität ebenfalls Annexin V binden, allerdings schon über dem frühen Apoptosestadium hinaus nekrotisch sind, wurden zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose die Zellen außerdem mit PI inkubiert. PI kann lediglich die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren, früh-apoptotische Zellen werden daher nicht angefärbt. Die gleichzeitige Anwendung von Annexin V-FITC und PI gestattete somit die Diskriminierung spät-apoptotischer/nekrotischer von früh-apoptotischen Zellen im Annexin V positiv gefärbten Zellcluster.

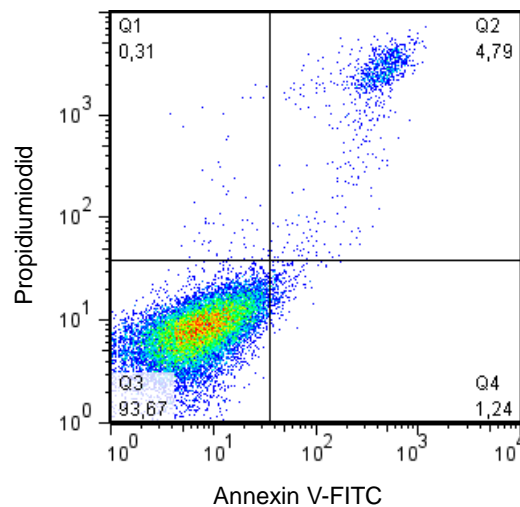
Die Apoptosedetektion wurde mit dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Positivkontrolle für Apoptose wurden Zellen 45 min mit Staurosporin (1 µg/ml) inkubiert (Daten nicht gezeigt).

Propidiumiodid wurde im PerCP-Kanal (Exzitationsmaximum 482 nm, Emissionsmaximum 678 nm) gemessen, Annexin V-FITC im FITC-Kanal (Exzitationsmaximum 494 nm, Emissionsmaximum 519 nm).

In **Abbildung 2-6** ist der Propidiumiodid-Kanal gegen den Annexin V-FITC-Kanal in der Mehrquadrantenanalyse aufgetragen und erlaubt die Diskriminierung von vitalen, früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen.

Vitale Zellen mit intakter Zellmembran sind Annexin V-negativ und PI-negativ (Q3), apoptotische Zellen mit Phosphatidylserintranslokation Annexin V-positiv und PI-negativ (Q4) und apoptotisch/nekrotische Zellen mit poröser Membran sowohl Annexin V-positiv als auch PI-positiv (Q2).





**Abb. 2-6: Apoptosedetektion mittels Annexin V-Anfärbung.** Exemplarische Intensitätsverteilung der Fluoreszenzsignale von Propidiumiodid und Annexin V-FITC. Zur Quantifizierung der Zellen wurde der Dot-Plot in vier Regionen unterteilt. **Q3:** Annexin V negativ/ PI negativ (vitale Zellen) **Q4:** Annexin V positiv/ PI negativ (früh-apoptotische Zellen) **Q2:** Annexin V positiv/ PI positiv (spät-apoptotische/ nekrotische Zellen).

Um den Quadranten Q1, der Annexin V-negative und PI-positive Zellen enthält, aus der weiteren Berechnung auszuschließen erfolgte für die Quadranten Q2 bis Q4 eine Rekalkulation der Prozentangaben nach folgender Formel:

$$X_{\text{korr.}} = \frac{X_{\text{inkl.Q1}}}{V + A + N} \cdot 100$$

$X_{\text{korr.}}$  = Messwert des jeweiligen Quadranten unter Ausschluss von Q1 [%]

$X_{\text{inkl.Q1}}$  = Messwert des jeweiligen Quadranten unter Berücksichtigung von Q1 [%]

V = Annexin V- und PI- negative Zellen des jeweiligen Messwertes [%]

A = Annexin V-positive und PI- negative Zellen des jeweiligen Messwertes [%]

N = Annexin V- und PI- positive Zellen des jeweiligen Messwertes [%]

Auch ohne Bestrahlung findet sich in einer Zellpopulation ein geringer Prozentsatz an apoptotischen beziehungsweise nekrotischen Zellen. Um diesen Umstand zu berücksichtigen, erfolgte mit Hilfe folgender Formel eine Normierung der gemessenen Werte auf die zu jedem Messzeitpunkt durchgeführte unbehandelte Kontrolle:

$$\Delta X_{xGy} = \frac{X_{xGy} - X_{0Gy}}{100 - X_{0Gy}} \cdot 100$$

$\Delta X_{xGy}$  = Prozentsatz der strahleninduzierten apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen normiert auf die unbehandelte Kontrolle

$X_{xGy}$  = Prozentsatz der strahleninduzierten apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen ohne Berücksichtigung der unbehandelten Kontrolle

$X_{0Gy}$  = Prozentsatz der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen der unbehandelten Kontrolle

## 2.10 Ermittlung von Zellkernflächen und Kerntreffern

Durch Kenntnis der Zellkernflächen lässt sich die mittlere Trefferzahl pro Zellkern bei der Bestrahlung mit Ionen errechnen. Dabei wird über eine Poisson-Verteilung berechnet, wie oft bei  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung unterschiedlicher Fluenzen der Zellkern als biologisch relevantes Ziel getroffen wird.

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms Quick Poisson Distribution Calculator (Nelson, 2003), das auf Excel basiert und unter Berücksichtigung der Fluenz, des LET und der Kernfläche durchschnittliche Trefferzahlen pro Kern ermittelt.

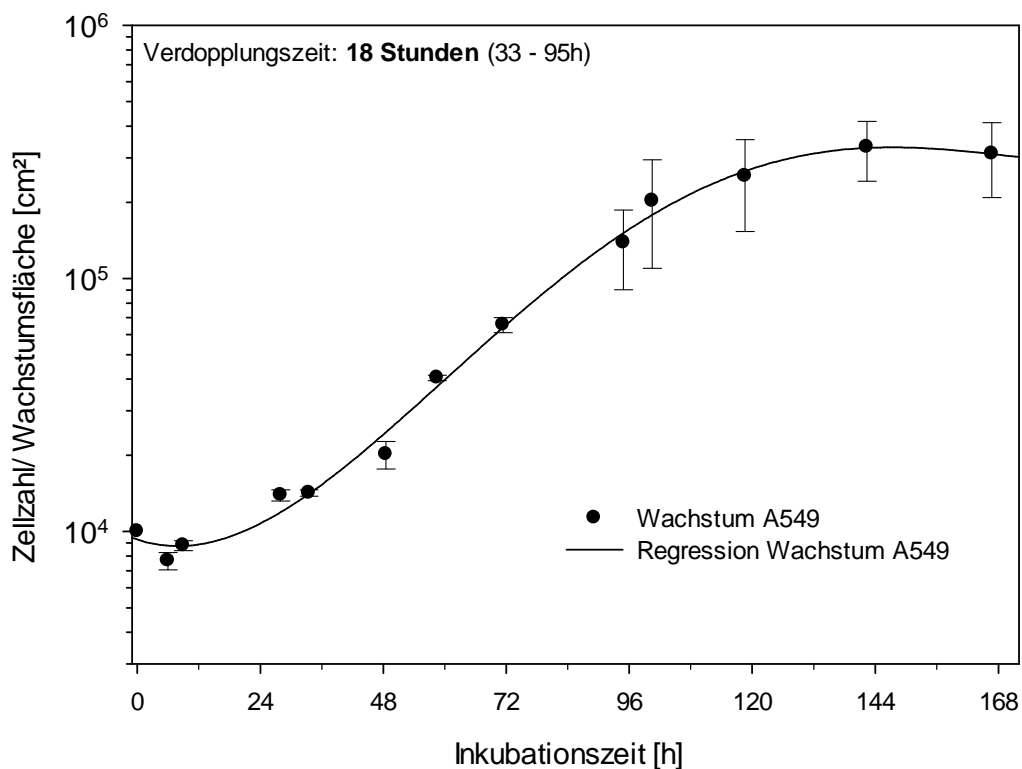
Die Zellkerngrößen von je 150 konfluent und subkonfluent (50–70% Konfluenz) wachsenden Zellen wurde nach 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung (DAPI-Färbung) mit Hilfe eines Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Göttingen) unter Verwendung eines 100er-Objektivs planimetrisch bestimmt.

DAPI färbt die DNA und damit den Inhalt der Zellkerne. Für die Färbung wurden die auf Objektträgern ausgesäten Zellen einmal in DAPI-Methanol (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gewaschen und anschließend 15 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zellen mit Methanol gewaschen wurden, wurden sie luftgetrocknet und in Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg) eingebettet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumsverhalten von A549-Zellen

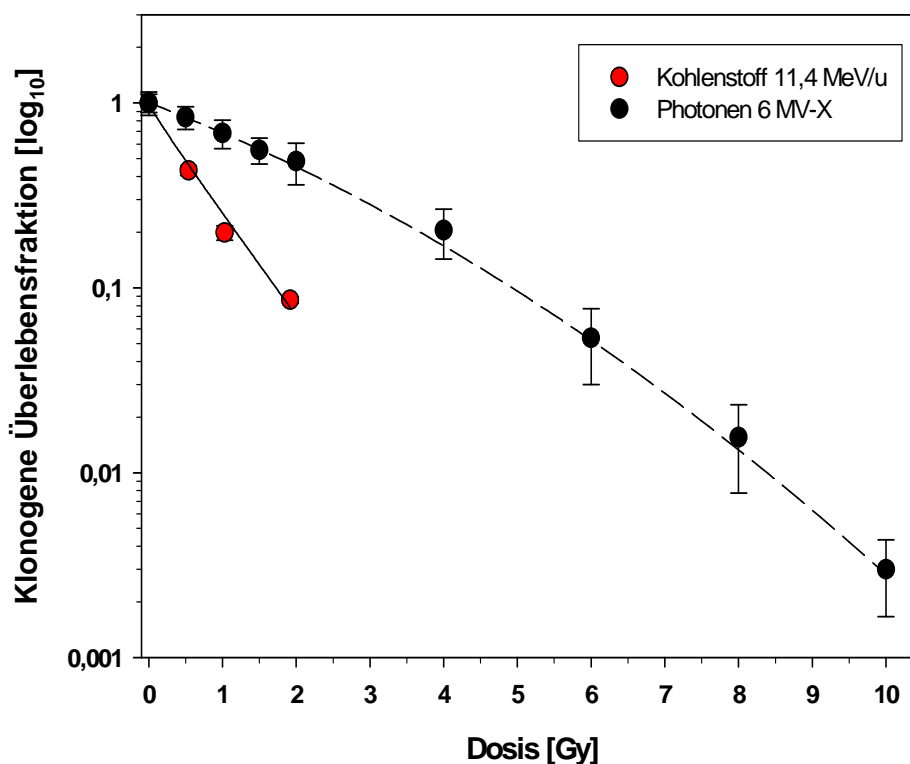
Für die Durchführung und Interpretation von weiterführenden Experimenten wie Zellzyklusanalysen im Zeitverlauf war es notwendig, die Verdopplungszeit der A549-Zellen in dem verwendeten Medium (siehe Kapitel 2.1.2) zu ermitteln. Die sigmoidal verlaufende Wachstumskurve (**Abb. 3-1**) zeigte bei einer Aussaatdichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche nach einer kurzen lag-Phase von weniger als 24 h einen linearen Verlauf mit exponentiellem Wachstum der Zellen, welcher etwa 5 Tage nach Aussaat der Zellen in eine stationäre Phase mit Plateau überging. Die Verdopplungszeit von 18 h wurde anhand der Steigung der Regressionsgeraden innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase berechnet.



**Abb. 3-1: Wachstumskurve der A549-Zelllinie.** Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der ermittelten Zellzahlen (ZZ) pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche über die Inkubationszeit in Stunden (n=2). Aus der Steigung der Regressionsgeraden im Bereich 33 – 95 h ergibt sich eine Verdopplungszeit von 18 h.

### 3.2 Dosis-Effekt-Kurve von A549-Zellen

In den Dosis-Effekt-Kurven ist das klonogene Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen halblogarithmisch gegen die Dosis aufgetragen. Aus diesen Werten ließ sich mit Hilfe des Linear-quadratischen Modells (Kellerer & Rossi, 1978) eine Zellüberlebenskurve errechnen (vgl. Kapitel 1.1.2). Die Überlebenskurve für Photonen resultiert aus drei unabhängigen Experimenten mit je drei Petrischalen pro Kondition und die Kurve für  $^{12}\text{C}$  aus einem Experiment mit fünf Petrischalen pro Dosis (vgl. Kapitel 2.4).



**Abb. 3-2: Dosis-Effekt-Kurve von A549-Zellen nach Photonen- und  $^{12}\text{C}$  – Bestrahlung.** Dargestellt ist das klonogene Überleben als  $\log_{10}$  nach Bestrahlung mit 6 MV Photonen ( $n=3$ ) und Kohlenstoffionen ( $n=1$ ) mit einer Energie von 9,8 MeV/u und einem LET von 170 keV/ $\mu\text{m}$  in der Zielschicht (Kamlah *et al.*, 2011).

Der Verlauf der Überlebenskurve nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen unterscheidet sich deutlich von dem Verlauf der Überlebenskurve nach Photonenbestrahlung (**Abb. 3-2**). Die Photonenkurve zeigt zu Beginn eine Schulter und insgesamt einen deutlich flacheren Verlauf bis 10 Gy, wohingegen die Kohlenstoffionenkurve bereits bei den dargestellten Dosen bis 2 Gy steil abfällt.

Die relative biologische Wirksamkeit der Kohlenstoffionen wurde anhand der Überlebenskurven für verschiedene Überlebenslevels berechnet. Für ein Überlebensniveau von 50% betrug die RBW nach Kohlenstoffionenbestrahlung 3,5 und für einen Überlebensbereich von 10% war die errechnete RBW 2,88.

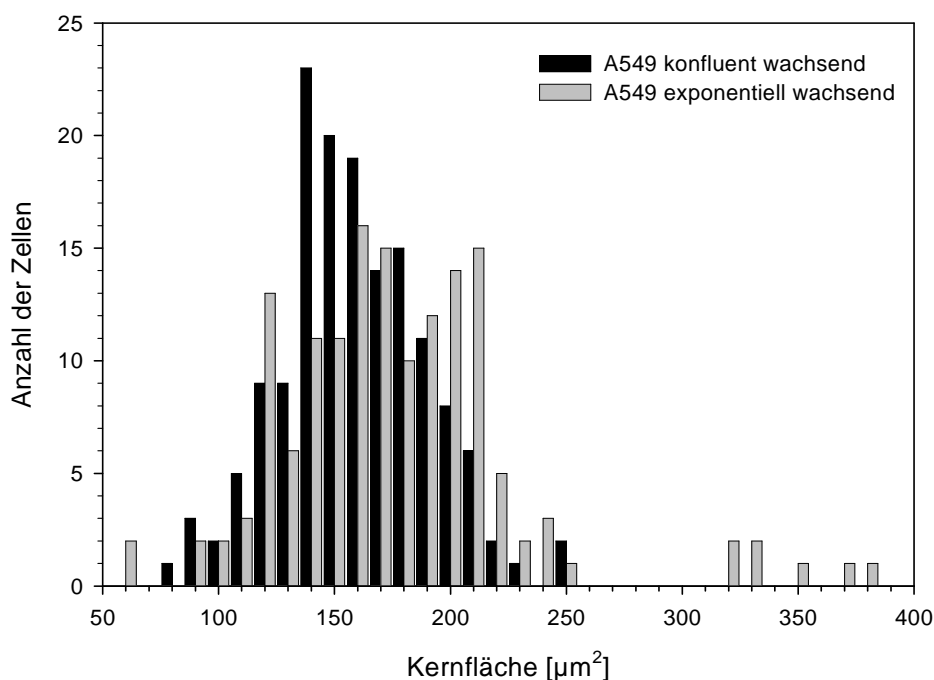
Der mit Hilfe des Linear-quadratischen-Modells ermittelte  $\alpha/\beta$ -Wert nach Photonenbestrahlung lag bei 14,83. Die Berechnung eines  $\alpha/\beta$ -Werts für A549-Zellen nach Kohlenstoffionenbestrahlung war nicht möglich. Die Kurve nach Kohlenstoffionenbestrahlung verläuft konsequent linear fallend und wird konsekutiv fast ausschließlich durch die lineare Komponente  $-\alpha D$  beschrieben. Für die quadratische Komponente  $-\beta D^2$  ergab sich mit -0,12 ein negativer Wert.

### 3.3 Zellkernflächen und Kerntreffer nach $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung

Für die Bewertung der biologischen Wirkung von Teilchenstrahlung ist die Anzahl der Teilchendurchgänge pro Zelle von Interesse, da bei Exposition mit kleinen Fluenzen niederenergetischer Partikelstrahlung möglicherweise nicht alle Zellkerne als biologisch relevantes Ziel der Strahlung getroffen werden.

Um die Anzahl der durchschnittlichen Kerntreffer in Abhängigkeit von der Dosis zu berechnen, wurden nach DAPI-Färbung je 150 Kerne von exponentiell und konfluent wachsenden Zellen planimetrisch bestimmt, wobei sich zeigte, dass die Kernflächen der exponentiell wachsenden Zellen mit  $180 \mu\text{m}^2$  im Durchschnitt etwas größer waren als die der konfluent wachsenden Zellen mit im Mittel  $163 \mu\text{m}^2$  (**Abb. 3-3**).

Mit dem Quick Poisson Distribution Calculator (Nelson, 2003) ließen sich unter Berücksichtigung der Fluenz und des LET der Kohlenstoffionenstrahlung sowie der ermittelten Kernfläche die Wahrscheinlichkeiten der durchschnittlichen Kerntreffer für verschiedenen Kohlenstoffionendosen berechnen (vgl. Kapitel 2.10).



**Abb. 3-3: Größenverteilung der Kernflächen von exponentiell und konfluent wachsenden A549-Zellen.** Dargestellt ist die Anzahl der Zellen gegen die Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ].

**Tabelle 3-1** zeigt die über die Poisson-Funktion errechnete wahrscheinliche mittlere Trefferzahl pro Zellkern, sowie die Verteilung getroffener und ungetroffener Kerne für unterschiedliche Dosen und Fluenzen in exponentiell wachsenden A549-Bronchialkarzinomzellen. Dosen von über 0,2 Gy Kohlenstoffionen lassen mindestens einen Treffer pro Kern erwarten, wobei bei dieser Dosis lediglich 73% der Zellen einmal getroffen werden. Ab einer Dosis von 1,5 Gy werden voraussichtlich 100% der Zellen im Schnitt 10-mal getroffen. Um sicher alle Zellkerne als biologisch relevantes Ziel der Strahlung zu treffen, wurde aus diesem Grund für die Genexpressions- und die durchflusszytometrischen Untersuchungen mit Kohlenstoffionendosen  $>2$  Gy gearbeitet. Durch die höchste in dieser Arbeit verwendete Kohlenstoffionendosis von 8 Gy im Rahmen der Zellzyklusanalysen sind durch die berechneten 53 Kerntreffer große Zellkernschäden zu erwarten.

**Tabelle 3-1:** Errechnete Trefferwahrscheinlichkeiten nach Kohlenstoffionenbestrahlung: Durchschnittliche Anzahl der Treffer pro Kern sowie Verteilung getroffener ( $\geq 1$  Treffer/Kern) und ungetroffener Kerne für verschiedene Dosen und Fluenzen in exponentiell wachsenden A549-Zellen.

$^{12}\text{C}$ -Dosis [Gy]	Fluenz [ $1/\text{cm}^2$ ]	Treffer/Kern	Anteil getroffener Kerne [%]	Anteil ungetroffener Kerne [%]
0,1	$3,67 \cdot 10^5$	0,7	48,3	51,7
0,2	$7,34 \cdot 10^5$	1,3	73,3	26,7
0,5	$1,84 \cdot 10^6$	3,3	96,4	3,6
1,0	$3,67 \cdot 10^6$	6,6	99,9	0,1
1,5	$5,5 \cdot 10^6$	9,9	100	0
2,0	$7,34 \cdot 10^6$	13,2	100	0
2,5	$9,18 \cdot 10^6$	17	100	0
4,0	$1,47 \cdot 10^7$	26,5	100	0
4,5	$1,65 \cdot 10^7$	29,7	100	0
6,0	$2,20 \cdot 10^7$	39,6	100	0
8,0	$2,94 \cdot 10^7$	52,9	100	0
10,0	$3,67 \cdot 10^7$	66,1	100	0

### 3.4 Genexpressionsanalysen nach Bestrahlung

#### 3.4.1 Übersicht über die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

Alle Expressionsanalysen der untersuchten Apoptose- und Zellzyklusgene wurden nach dem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell nach Pfaffl berechnet (vgl. Kapitel 2.8.5), wobei die Expression in den unbehandelten Zellen berücksichtigt und über stabil exprimierte Referenzgene normalisiert wurde.

Die Darstellung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgt zum besseren Verständnis als Logarithmus zur Basis 2. Ist ein Gen in der  $\log_2$ -Darstellung um +2 hochreguliert, entspricht dies einer Hochregulierung um den Faktor 4 ( $2^2$ ); ein Wert von -1 auf der  $\log_2$  Achse entspricht einer Halbierung ( $2^{-1}$ ) (vgl. Kapitel 2.8.6).

Werte zwischen +1 und -1 auf der  $\log_2$ -Achse stellen natürliche Expressionschwankungen dar (vgl. Kapitel 2.8.6).

**Tabelle 3-2** gibt eine Übersicht über die durchgeführten und im folgenden Kapitel vorgestellten Genexpressionsanalysen.

**Tabelle 3-2:** Durchgeführte Genexpressionsanalysen und ihre Darstellung im folgenden Kapitel

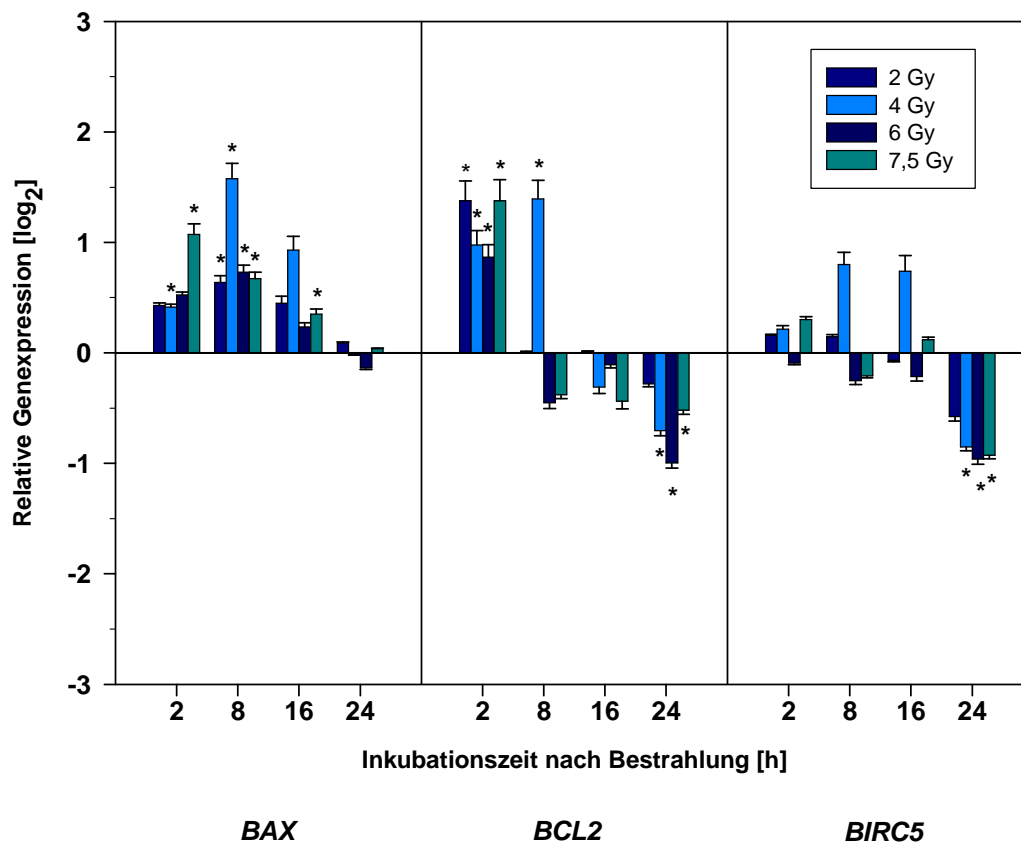
Experiment	Photonen-Monolayer	Kohlenstoffionen-Monolayer	Xenograftmodell
Wachstumsbedingungen	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Darstellungsfarbe	blau	grün	orange
Bestrahlung	Photonen: 2, 4, 6, 7,5 Gy	$^{12}\text{C}$ : 2,5, 4,5 Gy	$^{12}\text{C}$ : 2 Gy Photonen: 6 Gy
Isolationszeitpunkte	2, 8, 16, 24 h	2, 8, 16, 24 h	jeweils 4 h

### 3.4.2 Expressionsanalyse Apoptose-relevanter Gene

Um der Frage nachzugehen, ob und in welchem Maße Strahlung unterschiedlicher Qualität in A549-Zellen Apoptose induzieren kann, wurde das Expressionsprofil der Apoptose-relevanten Gene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* nach Exposition mit Photonen- und Kohlenstoffionenstrahlung untersucht.

**Abbildung 3-4** zeigt die relative Expression der Apoptosegene 2, 8, 16 und 24 h nach Bestrahlung mit 2, 4, 6 oder 7,5 Gy Photonen in Monolayerkulturen.





**Abb. 3-4: Relative Expression der Apoptosegene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* im Photonen-bestrahlten Monolayer.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* nach Bestrahlung mit 2, 4, 6 oder 7,5 Gy Photonen. Isolation der RNA nach 2, 8, 16 und 24 h.

\* = signifikante Genexpressionsänderung ( $p < 0,05$ )

Das pro-apoptotische Gen *BAX* wurde relativ zur unbestrahlten Kontrolle vom ersten Untersuchungszeitpunkt 2 h bis 16 h post radiationem unterschwellig hochreguliert und zeigte lediglich 8 h nach Bestrahlung mit 4 Gy eine signifikante, überschwellige Hochregulierung um den Faktor 3,0 ( $\log_2 > 1,58 \pm 0,14$ ).

Die Regulation des anti-apoptotischen Gens *BCL2* fällt nach Photonenbestrahlung zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich aus. Nach 2 und 8 h wurde *BCL2* mäßig heraufreguliert, wobei dieser Effekt nur zu dem früheren Zeitpunkt 2 h für alle Dosen signifikant war (Faktor 1,8 [ $\log_2 > 0,87 \pm 0,11$ ] bis 2,6 [ $\log_2 > 1,38 \pm 0,19$ ]). Nach 8 h fand sich nur nach Bestrahlung mit der Dosis 4 Gy eine signifikante Hochregulation um den Faktor 2,6 ( $\log_2 > 1,39 \pm 0,17$ ). Acht Stunden nach Bestrahlung mit 6 Gy oder 7,5 Gy Photonen sowie bei allen applizierten Dosen zu den Zeitpunkten 16 und 24 h

war eine innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite liegende Herunterregulierung zu beobachten.

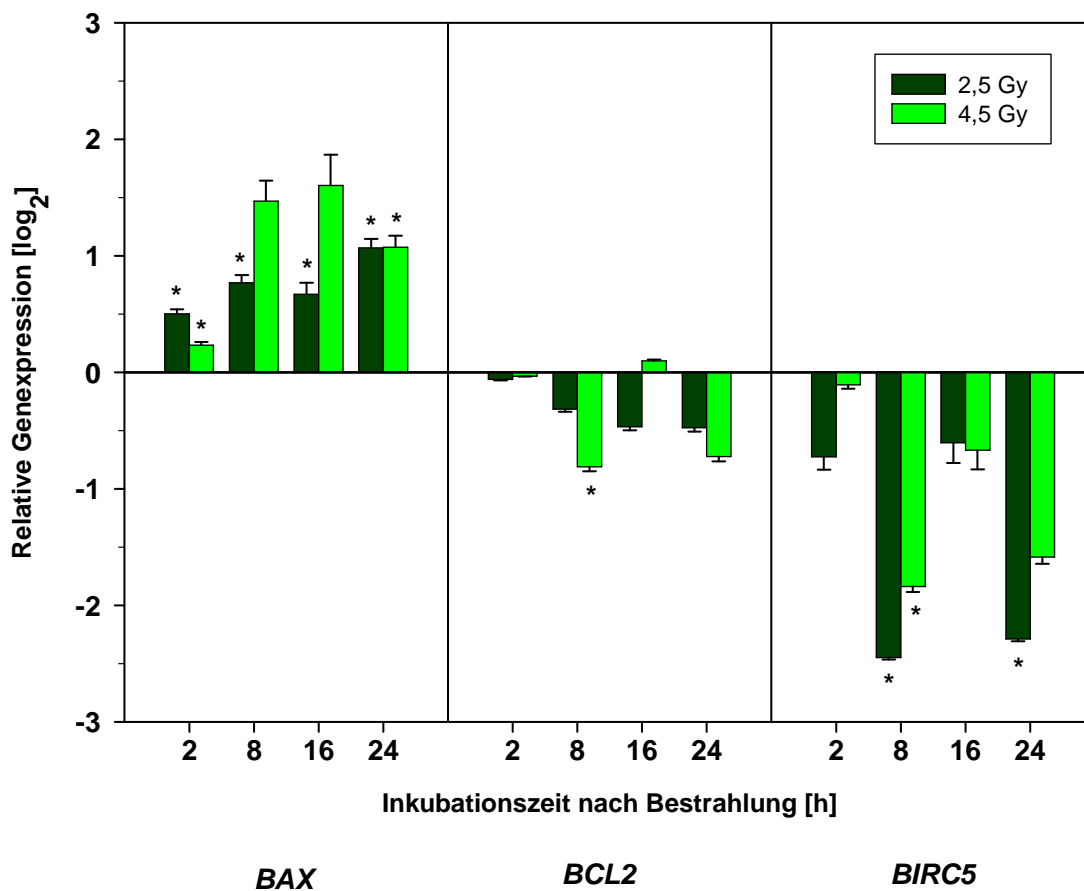
*BIRC5* zeigte zum Zeitpunkt 2, 8 und 16 h nach Photonenbestrahlung Genexpressionsänderungen in beide Richtungen innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite. Zum spätesten Analysezeitpunkt 24 h nach Bestrahlung konnte bei Dosen ab 4 Gy eine signifikante Herunterregulierung gerade oberhalb der natürlichen Schwankungsbreite beobachtet werden.

Die mit 2,5 oder 4,5 Gy  $^{12}\text{C}$  bestrahlten Monolayerzellen zeigten im Vergleich zu den mit Photonen bestrahlten Monolayerzellen eine deutlichere Heraufregulierung des pro-apoptotischen *BAX*-Gens und eine konsequentere Herunterregulierung von *BIRC5* (**Abb. 3-5**).

*BAX* wurde später als nach Photonenexposition (erst nach 8 und 16 h) und zunächst nur bei der höheren Dosis von 4,5 Gy überschwellig, aber nicht signifikant 2,8-fach ( $\log_2 > 1,47 \pm 0,18$ ) bzw. 3-fach ( $\log_2 > 1,60 \pm 0,26$ ) hochreguliert. Zum späteren Zeitpunkt 24 h post radiationem war die Heraufregulierung des pro-apoptotischen Gens nach Exposition mit beiden Dosen mit einer jeweils 2,1-fachen Erhöhung ( $\log_2 > 1,07 \pm 0,08$  bzw.  $0,10$ ) gleich hoch und signifikant.

*BCL2* wurde im gesamten Untersuchungszeitraum nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung leicht vermindert transkribiert, wobei die Regulation innerhalb des natürlichen Schwankungsniveaus lag.

*BIRC5* wurde nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung anders als nach Photonenexposition im gesamten Zeitverlauf herunterreguliert und zeigte hierbei einen zweigipfligen zeitlichen Verlauf. Nach 2 und 16 h war die Herunterregulierung nur unterschwellig. Zu den Zeitpunkten 8 und 24 h nach Bestrahlung zeigte sich dagegen eine deutliche Herabregulierung, wobei die Ausprägung bei der geringeren Dosis von 2,5 Gy jeweils stärker ausgeprägt war als bei 4,5 Gy  $^{12}\text{C}$ . Beispielsweise wurde *BIRC5* zum Zeitpunkt 8 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy Kohlenstoffionen signifikant um den Faktor 0,18 [ $\log_2 > -2,45 \pm 0,02$ ] herabreguliert und nach Bestrahlung mit der höheren Dosis von 4,5 Gy nur signifikant um den Faktor 0,3 [ $\log_2 > -1,84 \pm 0,05$ ].

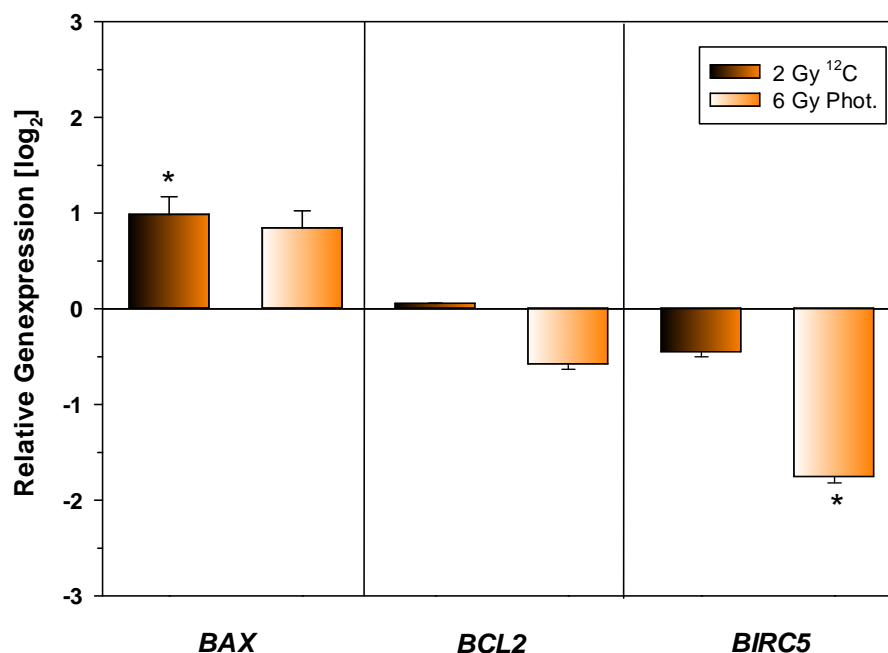


**Abb. 3-5: Relative Expression der Apoptosegene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* im <sup>12</sup>C-bestrahlten Monolayer.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* nach Bestrahlung mit einem LET von 170 keV/μm und Kohlenstoffionen-Fluenzen von  $9,17 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$  (= 2,5 Gy) oder  $1,66 \cdot 10^7 / \text{cm}^2$  (= 4,5 Gy). Isolation der RNA nach 2, 8, 16 und 24 h.

\* = signifikante Genexpressionsänderung (p < 0,05)

Im *in vivo* Xenograftmodell, in dem Bestrahlungen mit 2 Gy Kohlenstoffionen oder 6 Gy Photonen durchgeführt wurden (**Abb. 3-6**), war eine deutlich überschwellige Genexpressionsänderung lediglich bei *BIRC5* nach Photonenbestrahlung zu beobachten.

*BAX* wurde nach 2 Gy <sup>12</sup>C-Bestrahlung signifikant und gerade überschwellig um den Faktor 2,0 ( $\log_2 > 0,98 \pm 0,19$ ) hochreguliert, zeigte also eine ähnliche Expressionsänderung wie in den Monolayerkulturen (vgl. Abb. 3-5). Die Exposition mit 6 Gy Photonenstrahlung konnte *in vivo* keine überschwellige Expressionsänderung von *BAX* bewirken, was sich mit der geringen Regulation in Monolayerkulturen nach Photonenbestrahlung (vgl. Abb. 3-4) deckt.



**Abb. 3-6: Relative Expression der Apoptosegene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* im <sup>12</sup>C- und Photonen-bestrahlten Xenograftmodell.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* nach Bestrahlung mit einer Kohlenstoffionen-Fluenz von  $2,27 \cdot 10^7 / \text{cm}^2$  und einem LET von  $55 \text{ keV}/\mu\text{m}$  (= 2 Gy) oder mit 6 Gy Photonen. Isolation der RNA nach 4 h.

\* = signifikante Genexpressionsänderung ( $p < 0,05$ )

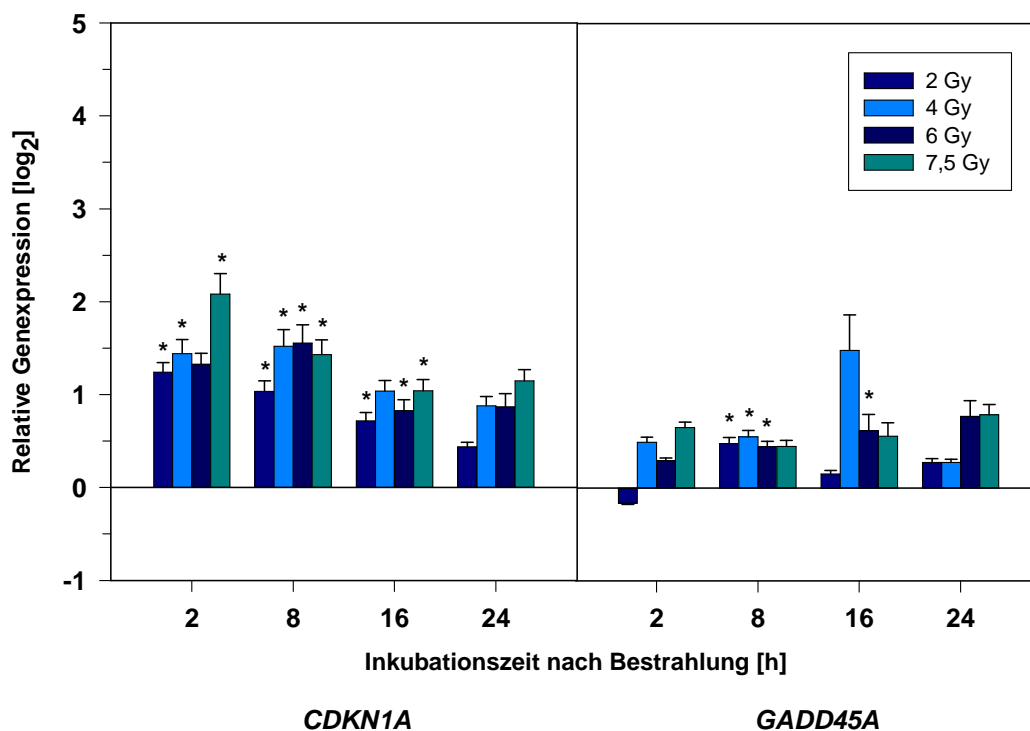
Die relative Genexpression von *BCL2* *in vivo* zeigte nach <sup>12</sup>C-Bestrahlung fast keine Genexpressionsänderung, was sich auch im *in vitro* Experiment zeigte (vgl. Abb. 3-5). Auch nach 6 Gy Photonenexposition war *in vivo* keine überschwellige Genexpressionsänderung zu beobachten, wohingegen im Monolayerexperiment (vgl. Abb. 3-4) zu den vergleichbaren Zeitpunkten 2 und 8 h eine erhöhte Expression von *BCL2* nachgewiesen werden konnte.

*BIRC5* wurde nach <sup>12</sup>C-Bestrahlung im Xenograftmodell lediglich leicht vermindert transkribiert, obgleich sich im <sup>12</sup>C-bestrahlten Monolayer nach 8 und 24 h eine sehr deutliche Herabsetzung der Expression zeigte (vgl. Abb. 3-5). Nach Exposition mit 6 Gy Photonen war die relative Genexpression von *BIRC5* 4 h nach Bestrahlung *in vivo* signifikant und deutlich herabreguliert (Faktor 0,3 [ $\log_2 > -1,76 \pm 0,05$ ]), während im Monolayer (vgl. Abb. 3-4) nach Photonenexposition nur 24 h nach Bestrahlung eine verminderte Expression von *BIRC5* zu verzeichnen war.

### 3.4.3 Expressionsanalyse Zellzyklus-relevanter Gene

Durch die schädigende Wirkung von Photonen- und Kohlenstoffionenstrahlung auf DNA-Strukturen werden Reparaturvorgänge in der Zelle aktiviert, wofür die Zelle ihren Zellzyklus abstoppen kann. Der untersuchte Zellzyklusinhibitor *CDKN1A* ist am G<sub>1</sub>/S-Übergang beteiligt, während am G<sub>2</sub>/M-Übergang *GADD45A* eine wichtige Rolle spielt (vgl. Kapitel 1.3). Über die Untersuchung der Transkription dieser beiden Gene lassen sich somit Rückschlüsse auf das Vorliegen eines Zellzyklusarrests ziehen.

**Abbildung 3-7** zeigt die Expression beider Zellzyklusgene in Monolayerkulturen nach Photonenbestrahlung mit 2, 4, 6 oder 7,5 Gy im Beobachtungszeitraum 2 bis 24 h nach Bestrahlung.



**Abb. 3-7: Relative Expression der Zellzyklusgene *CDKN1A* und *GADD45A* im Photonen-bestrahlten Monolayer.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene *CDKN1A* und *GADD45A* nach Bestrahlung mit 2, 4, 6 oder 7,5 Gy Photonen. Isolation der RNA nach 2, 8, 16 und 24 h.

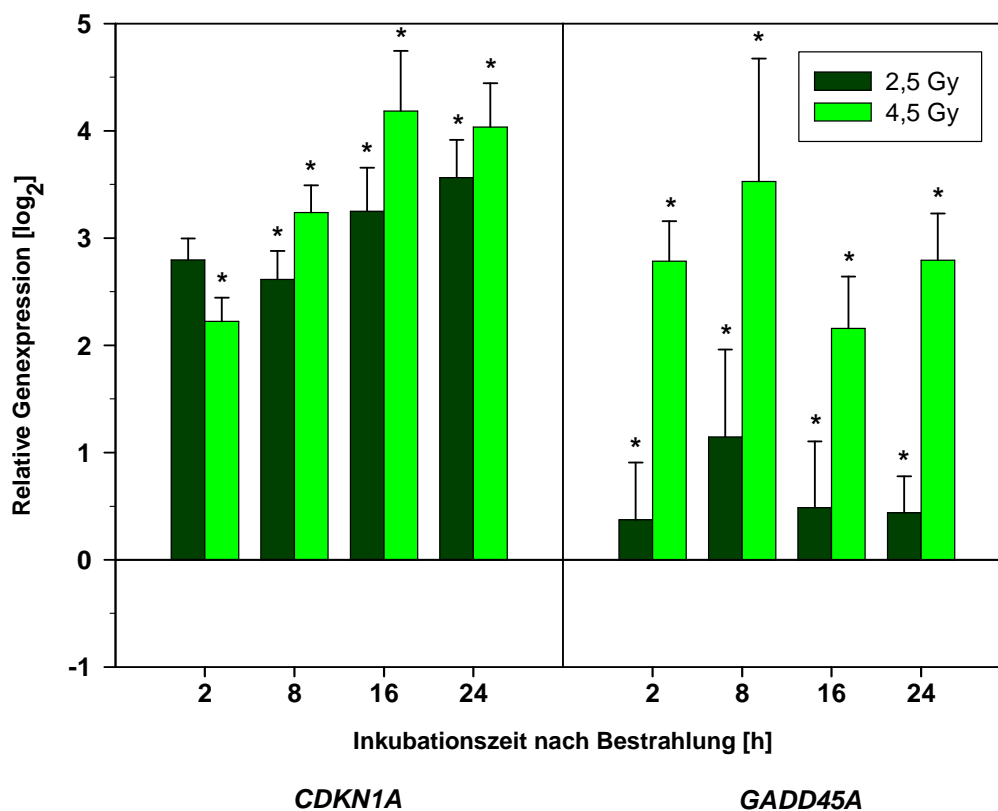
\* = signifikante Genexpressionsänderung ( $p < 0,05$ )

Zu den beiden frühen Zeitpunkten 2 h und 8 h ließ sich bei allen Dosen (außer 6 Gy nach 2 h) eine signifikante Hochregulierung von *CDKN1A* um den Faktor 2,1 ( $\log_2 >$

1,04 ± 0,11) bis 4,2 ( $\log_2 > 2,08 \pm 0,22$ ) beobachten. Nach 16 und 24 h lag die gering erhöhte Expression im Bereich der natürlichen Schwankungsbreite.

*GADD45A* wurde im Photonen-bestrahlten Monolayer nur unterschwellig hochreguliert und wies lediglich nach Photonenbestrahlung mit 4 Gy zum Zeitpunkt 16 h eine überschwellige, aber nicht signifikante Expressionserhöhung auf (2,8-fach [ $\log_2 > 1,48 \pm 0,38$ ]).

Nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung mit 2,5 oder 4,5 Gy war im Monolayer eine im Vergleich zu den Photonen-bestrahlten Zellen um ein Vielfaches höhere Heraufregulierung der Genexpression zu den äquivalenten Untersuchungszeitpunkten zu beobachten (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8: Relative Expression der Zellzyklusgene *CDKN1A* und *GADD45A* im  $^{12}\text{C}$ -bestrahlten Monolayer.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene *CDKN1A* und *GADD45A* nach Bestrahlung mit einem LET von 170 keV/ $\mu\text{m}$  und Kohlenstoffionen-Fluenzen von  $9,17 \cdot 10^6/\text{cm}^2$  (= 2,5 Gy) oder  $1,66 \cdot 10^7/\text{cm}^2$  (= 4,5 Gy). Isolation der RNA nach 2, 8, 16 und 24 h.

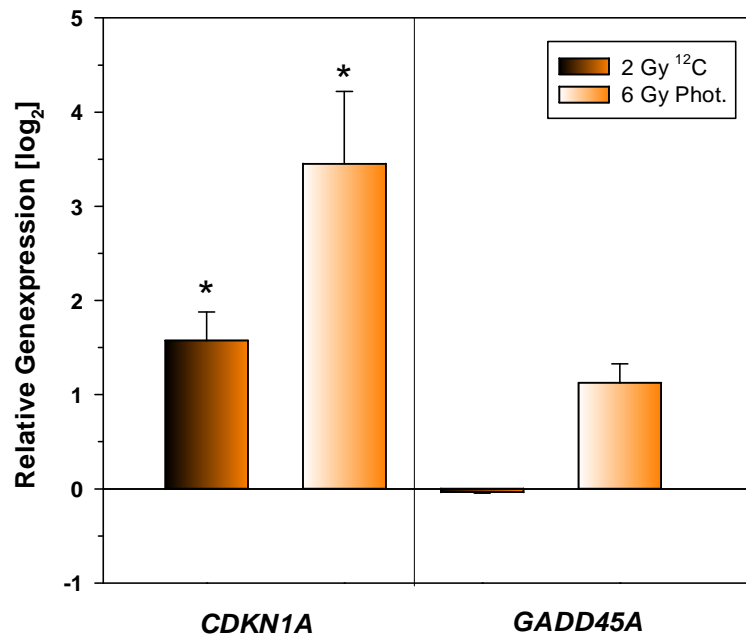
\* = signifikante Genexpressionsänderung ( $p < 0,05$ )

*CDKN1A* wurde nach  $^{12}\text{C}$ -Exposition im gesamten Zeitverlauf signifikant und sehr stark hochreguliert, wobei die Expression nach 4,5 Gy zum Untersuchungszeitpunkt 8, 16 und 24 h etwas höher war als nach 2,5 Gy. Außer zum Zeitpunkt 2 h nach Exposition mit 2,5 Gy waren alle Regulationen von *CDKN1A* signifikant. Im beobachteten Zeitverlauf stieg die relative Expression von *CDKN1A* an und zeigte 16 h nach Bestrahlung mit 4,5 Gy Kohlenstoffionen mit einer 18-fachen Hochregulierung ( $\log_2 > 4,18 \pm 0,56$ ) ein Maximum innerhalb der untersuchten Zeitpunkte.

Auch *GADD45A* wurde nach  $^{12}\text{C}$ -Exposition sehr viel stärker heraufreguliert als nach Photonenbestrahlung. Die geringere Dosis von 2,5 Gy führte nur zum Zeitpunkt 8 h post radiationem zu einer signifikanten, leicht überschwelligeren Hochregulierung. Im Gegensatz dazu führten 4,5 Gy Kohlenstoffionen zu allen untersuchten Zeitpunkten zu einer deutlichen, signifikanten Steigerung der Genexpression zwischen 4,5-fach ( $\log_2 > 2,16 \pm 0,48$ ) nach 16 h und 11,6-fach ( $\log_2 > 3,53 \pm 0,81$ ) nach 8 h.

Auch im *in vivo* Xenograftmodell (**Abb. 3-9**) wurde *CDKN1A* zum Untersuchungszeitpunkt 4 h stark exprimiert. Auffällig war hierbei, dass nach Photonenbestrahlung mit 6 Gy die deutlichste, signifikante Expressionsänderung zu finden war (10,9-fach [ $\log_2 > 3,45 \pm 0,77$ ]), wohingegen im Monolayer sogar nach höherer Photonenexposition mit 7,5 Gy lediglich eine maximal 4,2-fache ( $\log_2 > 2,08 \pm 0,22$ ) Steigerung der Genexpression zu beobachten war (vgl. Abb. 3-7). Die Expressionssteigerung von *CDKN1A* war nach 2 Gy  $^{12}\text{C}$ -Exposition im Xenograftmodell geringer ausgeprägt als in den untersuchten Monolayerkulturen zu den vergleichbaren Zeitpunkten 2 h und 8 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2,5 Gy (vgl. Abb. 3-8).

Bei der Betrachtung der Expression von *GADD45A* ist hervorzuheben, dass im Xenograftmodell unter  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung zum Untersuchungszeitpunkt 4 h praktisch keine Genexpressionsänderung nachweisbar war, wohingegen die Expressionsänderung von *GADD45A* im  $^{12}\text{C}$ -bestrahlten Monolayer mit der vergleichbaren Dosis 2,5 Gy eine etwa 2-fache Heraufregulierung bewirkte (vgl. Abb. 3-8). 6 Gy Photonen verursachten im Xenograftmodell eine höhere, aber nicht signifikante Heraufregulierung von *GADD45A*, die vergleichbar mit dem Ergebnis der Expressionsänderung in der Monolayerkultur ist (vgl. Abb. 3-7).



**Abb. 3-9: Relative Expression der Zellzyklusgene *CDKN1A* und *GADD45A* im <sup>12</sup>C- und Photonen-bestrahlten Xenograftmodell.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene *CDKN1A* und *GADD45A* nach Bestrahlung mit einer Kohlenstoffionen-Fluenz von  $2,27 \cdot 10^7 / \text{cm}^2$  und einem LET von  $55 \text{keV} / \mu\text{m}$  (= 2 Gy) oder 6 Gy Photonen. Isolation der RNA nach 4 h.

\* = signifikante Genexpressionsänderung ( $p < 0,05$ )

### 3.5 Zellzyklusanalysen nach Bestrahlung

Zur Untersuchung der strahleninduzierten Arretierung des Zellzyklus wurden exponentiell wachsende A549-Zellen mit Photonen oder Kohlenstoffionen bestrahlt, fixiert und mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Kapitel 2.9.1). Da in einem Tumor *in vivo* gleichzeitig exponentielles Wachstum in die Peripherie und Konfluenz der Zellen im Inneren vorliegt, wurden zum Vergleich der Auswirkung des Tumorwachstums sowohl Zellen im exponentiellen Wachstum als auch in konfluentem Zustand bestrahlt.

Die folgenden Abbildungen zeigen unter anderem Histogramme, in denen die relative Zellzahl [%] gegen den relativen DNA-Gehalt aufgetragen ist. Der erste Gipfel der Kurve stellt dabei die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, der zweite Gipfel die Zellen der G<sub>2</sub>/M-Phase dar. Die dazwischen liegende Fläche unter der Kurve bezeichnet die S-Phase.



In manchen Histogrammen beträgt die Summe der einzelnen Zellzyklusphasen nicht 100%. Dies ergibt sich durch die hier nicht separat dargestellten Sub-G<sub>1</sub>- und Hyper-G<sub>2</sub>-Fraktionen, die Kernfragmenten bzw. Zellen mit einem hyperploiden DNA-Gehalt entsprechen.

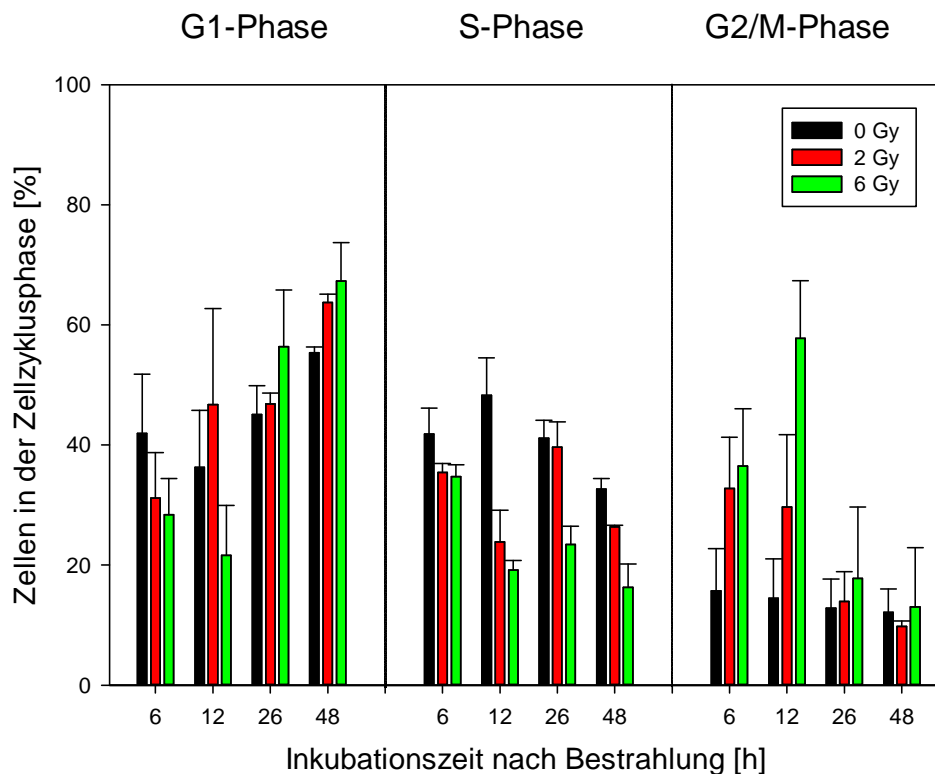
### 3.5.1 Zellzyklusanalyse exponentiell wachsender Zellen nach Photonenbestrahlung

Die Zeitkinetik der Zellzyklusverteilung von exponentiell wachsenden Zellen wurde in drei unabhängigen Experimenten zu den vier Zeitpunkten 6, 12, 26 und 48 h nach Bestrahlung mit 2 oder 6 Gy Photonen untersucht (**Abb. 3-10**). Zur differenzierten Zellzyklusanalyse wurde in einem Experiment zusätzlich mit der Dosis 4 Gy bestrahlt und die Zeitkinetik bis 64 h post radiationem beobachtet (**Abb. 3-11**).

Die **Abbildungen 3-10** und **3-11** zeigen, dass die exponentiell wachsenden Zellen nach Bestrahlung mit Photonen sowohl in der G<sub>1</sub>- als auch in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus in Abhängigkeit von der applizierten Dosis arretierten.

In **Abb. 3-10** lässt sich ein deutlicher strahleninduzierter G<sub>2</sub>/M-Arrest erkennen. Zu den Zeitpunkten 6 und 12 h nach Bestrahlung mit 2 Gy oder 6 Gy befanden sich deutlich mehr Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, als es in der unbehandelten Kontrolle der Fall war. Im Zeitverlauf reduzierte sich dieser Arrest und ließ sich 26 h nach Bestrahlung nur noch in geringer Ausprägung nachweisen. 48 h nach Bestrahlung war er komplett verschwunden, d. h. der Prozentsatz an G<sub>2</sub>/M-Phase-Zellen unterschied sich zwischen bestrahlter und unbestrahlter Population nicht mehr.

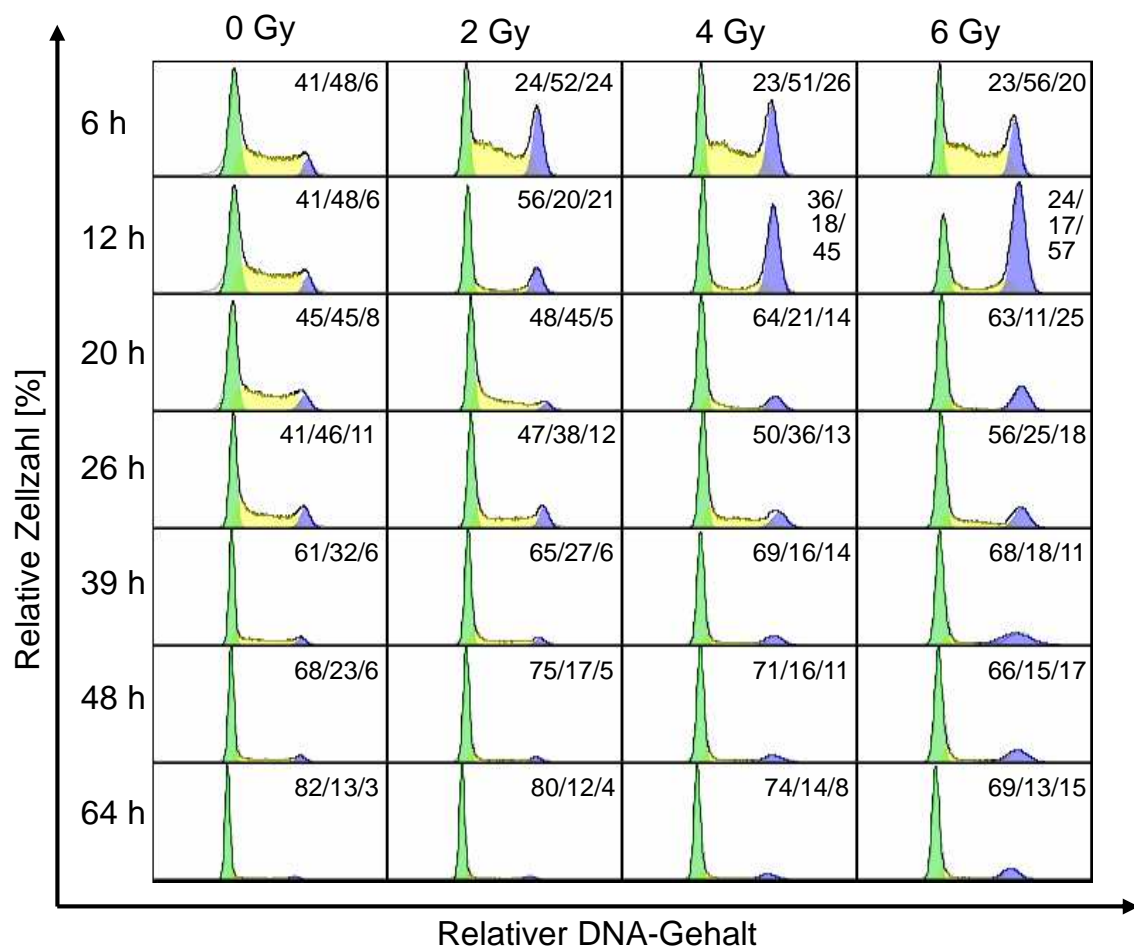
Ein Teil der bestrahlten Zellen verharrte wiederum in der G<sub>1</sub>-Phase. Dies zeigt sich durch den zu allen Zeitpunkten größeren Anteil an S-Phase-Zellen (Zellen, welche die G<sub>1</sub>-Phase bereits verlassen haben) der unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu den bestrahlten Zellen. Die Ausprägung des G<sub>1</sub>-Phase-Arrests war abhängig von der applizierten Dosis: Der Anteil der S-Phase-Zellen war zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Exposition mit 6 Gy geringer als nach Exposition mit 2 Gy Photonen. Konsekutiv verblieb nach der höheren Bestrahlungsdosis ein größerer Anteil an Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase.



**Abb. 3-10: Zellzyklusverteilung von exponentiell wachsenden Zellen nach Photonen-Exposition.** Die Verteilung auf die Zellzyklusphasen G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M ist zu den Zeitpunkten 6, 12, 26 und 48 h in unbehandelten Zellen und nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy dargestellt (n = 3).

In der ausführlichen Zellzyklusanalyse (**Abb. 3-11**) fällt außerdem auf, dass der Zeitpunkt des maximalen G<sub>2</sub>/M-Arrests von der Dosis abhing. Nach Exposition mit 2 Gy lag das Maximum des Arrests bereits nach 6 h vor, wohingegen der Zellzyklusarrest nach Exposition mit 4 Gy oder 6 Gy erst nach 12 h maximal ausgeprägt war. Auch die Ausprägung des Zellzyklusarrests zeigte eine Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Nach Exposition mit 2 Gy befanden sich maximal 24%, nach 4 Gy 45% und nach 6 Gy fast 60% der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase.

Des Weiteren zeigte sich bei der ausführlichen Zellzyklusanalyse im Zeitverlauf, dass ein immer größerer Prozentsatz der Zellen in die G<sub>1</sub>-Phase übergang. Der Grund hierfür war die zunehmende Zellzahl bis zur Konfluenz der Zellen in den Petrischalen, da nach 64 h schon drei volle Zellzyklen durchlaufen wurden (vgl. Kapitel 3.1: ermittelte Verdopplungszeit für A549: 18 h).



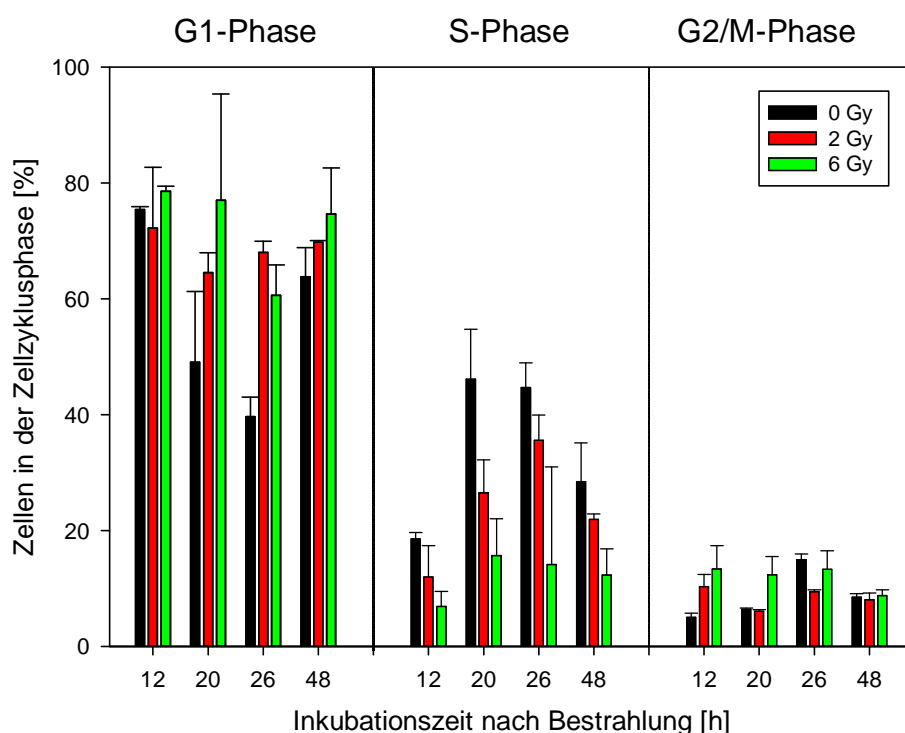
**Abb. 3-11: Exemplarische Darstellung einer Zellzyklusverteilung von exponentiell wachsenden Zellen nach Photonen-Exposition.** In den Histogrammen ist die relative Zellzahl [%] gegen den relativen DNA-Gehalt aufgetragen und die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen ( $G_1/S/G_2$ , M) vermerkt. Die Zellen wurden mit Dosen von 2, 4 oder 6 Gy Photonen bestrahlt und die Zeitkinetik bis 64 h beobachtet.

### 3.5.2 Zellzyklusanalyse von konfluent wachsenden Zellen nach Photonenbestrahlung

Die konfluent wachsenden Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit 2 oder 6 Gy Photonen bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung neu ausgesät. Durch die Konfluenz befanden sich die Zellen zu einem großen Teil in der  $G_1$ -Phase und das Aussäen nach Bestrahlung ermöglichte ihnen erneutes exponentielles Wachstum. Die Zellzyklusanalysen erfolgten wiederholt im Zeitverlauf bis 48 h. Eines

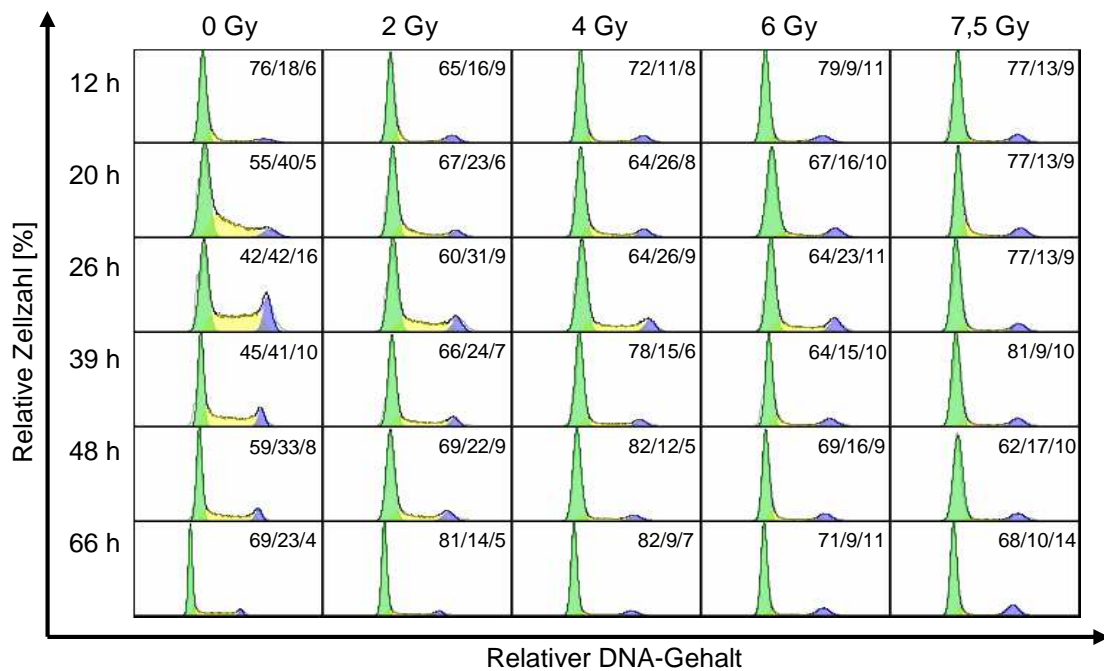
der Experimente wurde mit den zusätzlichen Dosen 4 und 7,5 Gy bis zum Analysezeitpunkt 66 h post radiationem durchgeführt.

Die Zellzyklusverteilung der konfluent bestrahlten und erneut ausgesäten Zellen unterscheidet sich wesentlich von der Verteilung der exponentiell wachsenden bestrahlten Zellen (**Abb. 3-12** und **Abb. 3-13**).



**Abb. 3-12: Zellzyklusverteilung von konfluent wachsenden und erneut ausgesäten Zellen nach Photonen-Exposition.** Die Verteilung auf die Zellzyklusphasen G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M ist zu den Zeitpunkten 12, 20, 26 und 48 h in unbehandelten Zellen und nach Bestrahlung mit 2 oder 6 Gy dargestellt (n = 2).

**Abbildung 3-12** zeigt, dass zum Zeitpunkt 12 h noch keine wesentlichen Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen vorlagen: 75-80% der Zellen befanden sich in der G<sub>1</sub>-Phase. Bereits 20 h post radiationem änderte sich die Verteilung dahingehend, dass ein großer Anteil (46%) unbestrahlter Zellen die G<sub>1</sub>-Phase verlassen hatte und in die S-Phase vorangeschritten war. Bei den mit 2 Gy und 6 Gy Photonen bestrahlten Zellen war 20 h post radiationem ebenfalls ein S-Phase Anstieg zu verzeichnen, welcher jedoch mit 26 % bzw. 15% S-Phase-Zellen geringer ausfiel. Der Anteil an S-Phase-Zellen war mit steigender Expositions-dosis somit geringer ausgeprägt, konsekutiv stieg der Prozentsatz an Zellen im G<sub>1</sub>-Arrest mit steigender Photonendosis.



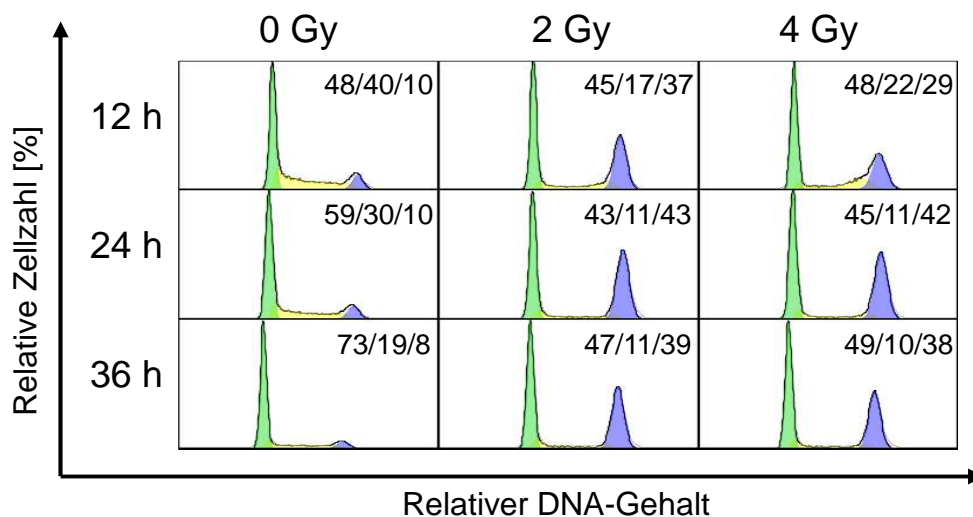
**Abb. 3-13: Exemplarische Darstellung einer Zellzyklusverteilung von konfluent wachsenden und erneut ausgesäten Zellen nach Photonen-Exposition.** In den Histogrammen ist die relative Zellzahl [%] gegen den relativen DNA-Gehalt aufgetragen und die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen ( $G_1/S/G_2$ , M) vermerkt. Die Zellen wurden mit Dosen von 2, 4, 6 oder 7,5 Gy Photonen bestrahlt und die Zeitkinetik bis 66 h beobachtet.

In der Histogrammdarstellung des ausführlichen Experiments ist die proportionale Abhängigkeit der Photonendosis vom Zeitpunkt des Wiedereintritts in den Zellzyklus verdeutlicht (**Abb. 3-13**). Innerhalb der untersuchten Zeitkinetik konnte dosis- und zeitabhängig ein Anstieg der S-Phase-Zellen als Zeichen des Wiedereintritts in den Zellzyklus nach strahleninduziertem Zellzyklusarrest beobachtet werden. Nach Exposition mit 4 Gy lag das Maximum von 26% S-Phase-Zellen schon nach 20 h vor. Nach Exposition mit 6 Gy lagen die meisten (23%) S-Phase-Zellen zum Zeitpunkt 26 h und nach Exposition mit 7,5 Gy (max. 17% S-Phase-Zellen) erst nach 48 h vor. Anders als im Experiment der bestrahlten, exponentiell wachsenden Zellen ließ sich bei den bestrahlten, konfluent wachsenden und erneut ausgesäten Zellen kein  $G_2/M$ -Arrest nachweisen.

### 3.5.3 Zellzyklusanalyse exponentiell wachsender Zellen nach $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung

Exponentiell wachsende Zellen wurden wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben mit 2 Gy oder 4 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt und im Zeitverlauf bis 36 h nach Bestrahlung analysiert.

Die Zellen reagierten auf die  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung mit einem Arrest in der  $G_1$ - und in der  $G_2/M$ -Phase, wobei besonders der  $G_2/M$ -Arrest eine im Vergleich zu den Photonenexperimenten stärkere Ausprägung aufwies. **Abbildung 3-14** zeigt, dass schon nach einer applizierten Kohlenstoffionendosis von 2 Gy ein sehr deutlicher Zellzyklusarrest (max. 43%  $G_2/M$ -Phase-Zellen) eintrat.



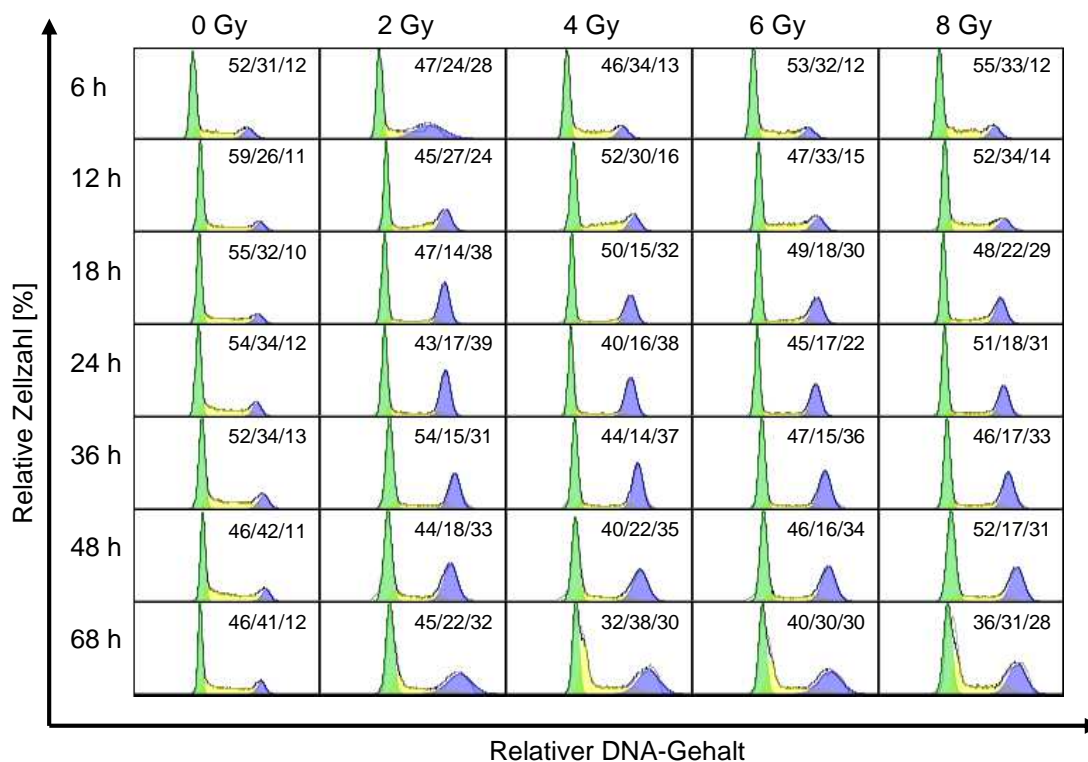
**Abb. 3-14: Zellzyklusverteilung von exponentiell wachsenden Zellen nach  $^{12}\text{C}$ -Exposition.** In den Histogrammen ist die relative Zellzahl [%] gegen den relativen DNA-Gehalt aufgetragen und die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen ( $G_1/S/G_2$ , M) vermerkt. Die Zellen wurden mit Dosen von 2 oder 4 Gy  $^{12}\text{C}$  bestrahlt und die Zeitkinetik bis 36 h beobachtet.

Hervorzuheben ist, dass die Zellzyklusverteilung nach Kohlenstoffionenbestrahlung mit 2 und 4 Gy keine Dosisabhängigkeit zeigte. Die Ausprägung des Zellzyklusarrests ist nach Bestrahlung mit der geringeren Dosis nahezu identisch zu der nach Exposition mit 4 Gy Kohlenstoffionen. Der  $G_1$ - und  $G_2/M$ -Arrest zeigte sich bereits zum Zeitpunkt 12 h, war nach 24 h maximal und blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 36 h bestehen.

### 3.5.4 Zellzyklusanalyse von wiederausgesäten Zellen nach $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung

Die für dieses Experiment verwendeten Zellen dienten zunächst als Zellmaterial für eine Dosis-Effekt-Kurve und wurden darüber hinaus für die hier dargestellte Untersuchung der Zellzyklusprogression nach Kohlenstoffionenbestrahlung verwendet. Das Ergebnis dieser Zellzyklusanalyse nach Wiederaussaat ist mit dem Ergebnis in exponentiell wachsenden Zellen (vgl. Kapitel 3.5.3) vergleichbar, wenn auch der zeitliche Verlauf in der Kinetik bei Wiederaussaat um etwa 6 h nach hinten verschoben war.

Subkonfluent wachsende Zellen wurden mit 2, 4, 6 oder 8 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen erneut ausgesät und im Zeitverlauf bis 68 h untersucht (**Abb. 3-15**). Als Antwort auf Kohlenstoffionenbestrahlung zeigte sich ebenfalls ein Arrest in der  $G_1$ - und in der  $G_2/M$ -Phase.



**Abb. 3-15: Zellzyklusverteilung von Zellen nach  $^{12}\text{C}$ -Exposition und sofortiger Wiederaussaat.** In den Histogrammen ist die relative Zellzahl [%] gegen den relativen DNA-Gehalt aufgetragen und die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen ( $G_1/S/G_2$ , M) vermerkt. Die Zellen wurden mit Dosen von 2, 4, 6 oder 8 Gy  $^{12}\text{C}$  bestrahlt und die Zeitkinetik bis 68 h beobachtet.

Mit steigenden Dosen von 2, 4 und 6 Gy ist zu sehen, dass sich das Maximum des G<sub>2</sub>/M-Blocks zeitlich nach hinten verschob. Nach 2 Gy Kohlenstoffionenexposition waren nach 18 h und 24 h maximal viele Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase (38% und 39%), nach 4 Gy Bestrahlung lag das G<sub>2</sub>-Maximum bei 24 h und 36 h (37% bzw. 38% G<sub>2</sub>-Phase-Zellen) und bei 6 Gy lag es bei 36 h und 48 h (36% und 34% G<sub>2</sub>-Phase-Zellen). Die zeitliche Verschiebung des maximalen Zellzyklusarrests in Abhängigkeit von der Dosis konnte auch in den mit Photonen bestrahlten konfluent wachsenden Zellen beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.5.2). Anders als in den Photonenexperimenten ließ sich nach Kohlenstoffionenbestrahlung jedoch keine Dosisabhängigkeit nachweisen. Nach Bestrahlung mit 2 Gy war der Anteil der in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretierten Zellen ähnlich hoch wie nach Exposition mit 8 Gy Kohlenstoffionen, wobei bereits die geringe Dosis von 2 Gy einen Zellzyklusarrest induzierte, der über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg andauerte.

In der hier gezeigten Zellzyklusanalyse war aufgrund der geringeren Aussaatdichte auch nach 68 h in unbestrahlten Zellen noch kein konfluentes Wachstum der Zellen erreicht.

## 3.6 Apoptosedetektion nach Bestrahlung

### 3.6.1 Apoptosedetektion nach Photonenbestrahlung

In den in Kapitel 3.4 präsentierten Genexpressionsanalysen wurde unter anderem die Expression Apoptose-relevanter Gene untersucht. Um die Induktion von Apoptose darüber hinaus anhand morphologischer Charakteristika nachzuweisen, wurde eine durchflusszytometrische Zweiparametermessung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid durchgeführt (vgl. Kapitel 2.9.2).

**Abbildung 3-16** zeigt die prozentuale Verteilung (früh-) apoptotischer, spätapoptotisch/nekrotischer und die Summe aller strahleninduziert abgetöteten Zellen zum Analysezeitpunkt 24 und 72 h nach Bestrahlung mit 2, 6 oder 10 Gy.

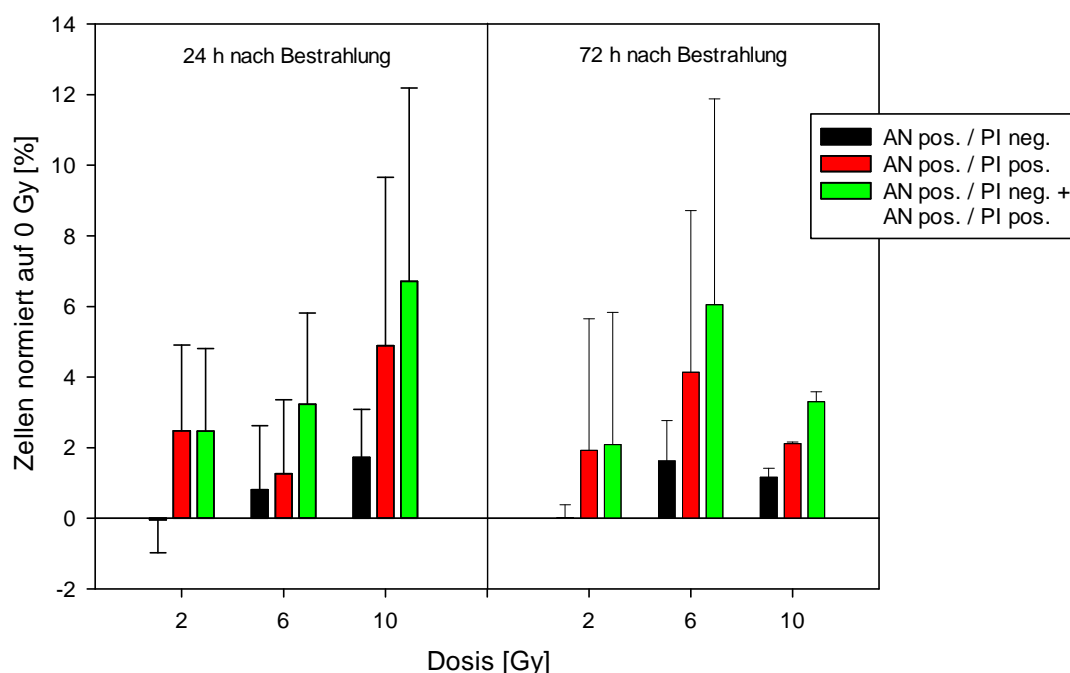
Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse zeigte, dass Apoptose am strahleninduzierten Zelltod nach Bestrahlung mit Photonen in der Zelllinie A549 nur einen sehr geringen Anteil hat.

Der Anteil (früh-) apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation war nach Photonenexposition zu beiden Untersuchungszeitpunkten gering. Auch nach Exposition mit der höchsten Dosis von 10 Gy betrug der Anteil (früh-) apoptotischer Zellen maximal 1,7%. Zum Analysezeitpunkt 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy war



einmalig ein negativer Wert zu verzeichnen, da der Anteil an induzierter Apoptose geringer als in der unbehandelten Kontrolle war.

Nach Bestrahlung mit 10 Gy wiesen etwa 5 % der Zellen 24 h nach Bestrahlung ein positives Signal für Annexin V bei gleichzeitiger Durchlässigkeit der Membran für den interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid auf. Diese als spätapoptotisch /nekrotisch definierte Zellpopulation hatte den größten Anteil am strahleninduzierten Zelltod.



**Abb. 3-16: Ergebnis der Mehrquadrantenanalyse in A549-Zellen nach Exposition mit Photonenstrahlung.** Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle normierte prozentuale Verteilung früh-apoptotischer (schwarz) und nekrotischer/spät-apoptotischer (rot) Zellen, sowie deren Summe (grün) nach Bestrahlung mit 2, 6 und 10 Gy Photonen zum Zeitpunkt 24 und 72 h (n = 3).

AN = Annexin V-FITC, PI = Propidiumiodid.

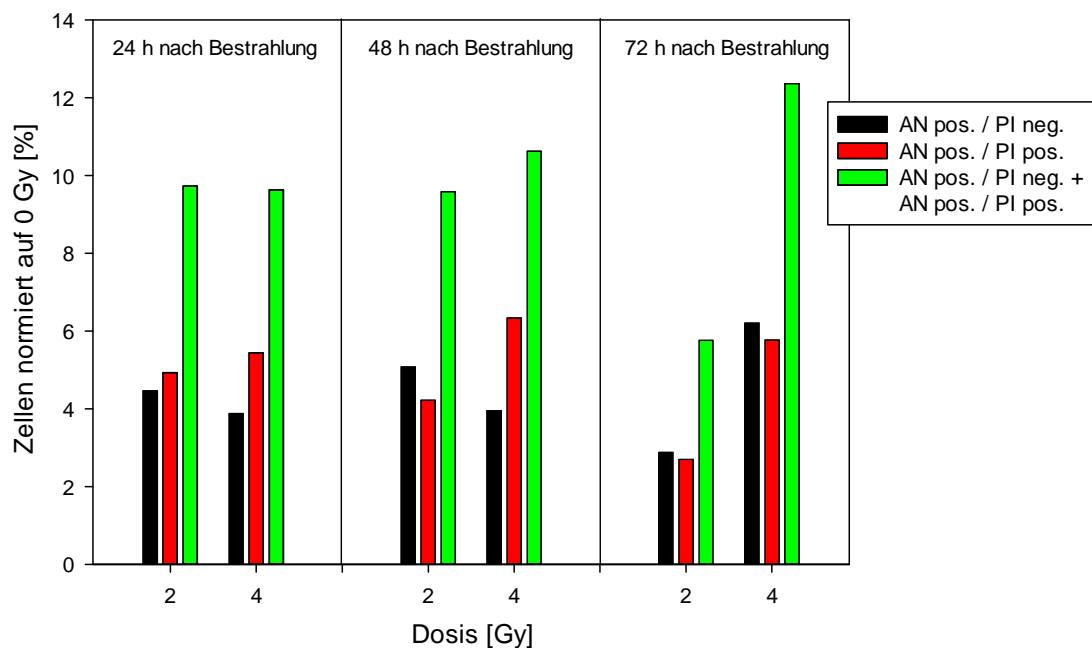
### 3.6.2 Apoptosedetektion nach Kohlenstoffionenbestrahlung

Auch nach Exposition mit Kohlenstoffionen wurde untersucht, zu welchem Prozentsatz bestrahlte Zellen apoptotische bzw. spät-apoptotisch/nekrotische Veränderungen der Zellmembran aufwiesen. Bei dieser Analyse wurde die Apoptoseinduktion nach Exposition mit 2 oder 4 Gy Kohlenstoffionen 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung untersucht.

**Abbildung 3-17** zeigt, dass die Exposition mit Kohlenstoffionen eine im Vergleich zu Photonenstrahlung höhere Apoptoserate induzierte.

Bis zu 6% betrug der Anteil (früh-) apoptotischer Zellen nach Exposition mit 4 Gy Kohlenstoffionen 72 h nach Bestrahlung. Der Anteil an nekrotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen war mit maximal 6,3% (4 Gy, 48 h) annähernd identisch. Zum Zeitpunkt 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 4 Gy stieg besonders der Anteil spät-apoptotisch/nekrotischer Zellen. Das Maximum der strahleninduzierten Apoptoserate betrug maximal gut 12% nach Exposition mit 4 Gy zum Zeitpunkt 72 h.

Zu den beiden frühen Zeitpunkten 24 und 48 h zeigte sich mit einem ähnlich niedrigen Anteil membranveränderter Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy  $^{12}\text{C}$  keine Dosisabhängigkeit. Zum Untersuchungszeitpunkt 72 h post radiationem zeigte sich hingegen eine Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit einer Gesamt-Apoptoserate von knapp 6% nach Exposition mit 2 Gy und 12% nach Exposition mit 4 Gy Kohlenstoffionen.



**Abb. 3-17: Ergebnis der Mehrquadrantenanalyse in A549-Zellen nach Exposition mit Kohlenstoffionen.** Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle normierte prozentuale Verteilung früh-apoptotischer (schwarz) und nekrotischer/spät-apoptotischer (rot) Zellen, sowie deren Summe (grün) nach Bestrahlung mit 2 und 4 Gy Kohlenstoffionen zum Zeitpunkt 24, 48 und 72 h (n = 1).

AN = Annexin V-FITC, PI = Propidiumiodid.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von dünn-ionisierender Photonenstrahlung im Vergleich zu dicht-ionisierender Kohlenstoffionenstrahlung in der humanen Bronchialkarzinomzelllinie A549 zu untersuchen. Hierbei wurde insbesondere das Auftreten von Apoptose und Zellzyklusarrest nach Bestrahlung vergleichend untersucht, da diese beiden Prozesse wesentliche Mechanismen in der biologischen Strahlenantwort darstellen und für das weitere Schicksal der Zellen entscheidend sind.

### 4.1 Verdopplungszeit, $\alpha/\beta$ -Wert und RBW von Kohlenstoffionen in A549-Zellen

Die ermittelte Verdopplungszeit für A549-Zellen lag bei 18 h, was sich mit Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe zum Wachstumsverhalten der Zelllinie deckt. Andere Arbeitsgruppen ermittelten höhere Verdopplungszeiten von 24 bzw. 27 h (Amundson *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009), was vermutlich in der gewählten Medienformulierung zur Kultivierung der Zellen begründet ist (vgl. Kapitel 2.1.2). In Zellen mit einer kurzen Verdopplungszeit werden strahleninduzierte Schäden rasch sichtbar, da schnell proliferierende Zellen öfter die empfindlicheren Phasen  $G_2$  und M durchlaufen. Die Radiosensitivität verhält sich jedoch nicht unbedingt antiproportional zur Proliferationszeit, was beim Vergleich von 60 malignen Zelllinien und deren Strahlenantwort deutlich wird (Amundson *et al.*, 2008). Die Radiosensitivität von Tumoren ist vielmehr von einem Komplex von Faktoren wie der Reparaturkapazität und der Zellzyklusprogression abhängig (El-Awady *et al.*, 2003).

Bei der Radiotherapie maligner Tumoren ist der Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit der wichtigste zelluläre Effekt, da durch verbleibende klonogene Zellen Rezidive und Metastasen entstehen können. Mit dem Koloniebildungstest und daraus erstellten Dosis-Effekt-Kurven wurden beide Strahlenqualitäten bezüglich des Endpunktes der Klonogenität nach Bestrahlung geprüft (vgl. Kapitel 3.2).

Der errechnete  $\alpha/\beta$ -Wert für A549-Zellen nach 6 MV Photonenbestrahlung lag bei 14,83. Dieser Wert steht in seiner Dimension im Einklang mit Angaben aus der Literatur (Duchesne *et al.*, 1986; Suzuki *et al.*, 2000), wobei sich die  $\alpha/\beta$ -Werte je nach verwendetem LET der Strahlung unterscheiden. Mit einem  $\alpha/\beta$ -Wert von 14,83 gehören die verwendeten A549-Zellen wie andere Adenokarzinomzellen zu den früh

reagierenden Geweben. Diese zeichnen sich durch eine verhältnismäßig kleine Schulter und ein konsekutiv geringes Vermögen zur Schadensreparatur aus (Reiser *et al.*, 2006).

Die Berechnung eines  $\alpha/\beta$ -Werts für Kohlenstoffionen war aufgrund eines negativen Werts von  $-\beta D^2$  nicht durchführbar. Dicht ionisierende Strahlung bewirkt komplexe Schäden (clustered damages) mit vielen Doppelstrangbrüchen durch ein einzelnes Sekundärion, weshalb die Dosis-Effekt-Kurve für Kohlenstoffionen durch die fehlende Schulter hauptsächlich durch den linearen Term  $-\alpha D$  beschrieben wird. Die Überlegung für Kohlenstoffionenstrahlung konsekutiv  $-\beta D^2$  gleich Null zu setzen, ist jedoch nicht zielführend. Im Bereich hoher Dosen würden sich die Überlebenskurven dadurch schneiden und jenseits davon wäre die Effizienz der Referenzstrahlung höher als die der untersuchten Strahlung, was nicht der Realität entspricht. Müller bezeichnet das linear-quadratische Modell aus diesen Gründen als Teilwahrheit und phänomenologischen Fit (Müller, 2008).

Da der  $\alpha/\beta$ -Wert die Reparaturkapazität von Zellen berücksichtigt und diese wiederum einen Einfluss auf die RBW hat, postulieren Weyrather und Kraft dass  $\alpha/\beta$ -Wert und RBW in einer strengen Korrelation zueinander stehen (Weyrather & Kraft, 2004).

Die durch unsere Arbeitsgruppe ermittelte RBW von Kohlenstoffionenstrahlung in A549-Zellen betrug für 50% überlebenden Zellen 3,5; bei einem Überlebensniveau von 10% betrug sie 2,88. Die differierenden Werte bestätigen die Aussage von Barendson, dass die RBW vom Überlebenslevel der bestrahlten Zellen abhängt und bei einem hohen Überlebensanteil größer ist als bei einem Geringen. Dies liegt an der im Anfangsbereich größeren Divergenz der Partikelkurve von der Photonenkurve, welche durch die Schulter im Anfangsbereich der Photonenkurve begründet ist (Barendsen *et al.*, 1963). Die ermittelten relativen biologischen Wirksamkeiten von Kohlenstoffionen decken sich mit den in der Literatur angegebenen Durchschnittswerten für verschiedene Zelltypen von 2 bis 5 (Allen *et al.*, 2011; Fokas *et al.*, 2009) sowie mit der von Ghosh *et al.* in A549-Zellen ermittelten RBW von 3 (Ghosh *et al.*, 2011).

In anderen Studien sind teilweise kleinere Werte für die RBW von Kohlenstoffionen ermittelt worden (Suzuki *et al.*, 2000; Takiguchi *et al.*, 2007), was auf einen niedrigeren LET der verwendeten Kohlenstoffionenstrahlung in diesen Arbeiten zurückführbar sein könnte. Die RBW hängt vom verwendeten LET ab. Trägt man die RBW von Kohlenstoffionen gegen den LET auf, ergibt sich eine glockenförmige Kurve, welche die höchste RBW bei einem LET von 150-200 keV/ $\mu\text{m}$  zeigt. In der hier gezeigten Dosis-Effekt-Kurve beträgt der LET 170 keV/ $\mu\text{m}$  und liegt somit im optimalen Bereich

dieser glockenförmigen Abhängigkeitskurve. Ein noch höherer LET bringt keinen weiteren Vorteil, da mehr Schäden produziert werden, als zum Tod der Zellen nötig wären (Weyrather *et al.*, 1999).

#### **4.2 Zellzyklusarrest nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen**

Bei der Diskussion über die relative biologische Wirksamkeit ist auch die Definition eines zu berücksichtigenden Effekts – beispielsweise der Verlust der Koloniebildungsfähigkeit - von Bedeutung. In Koloniebildungstests werden klonogen inaktive Zellen, die im Sinne der Seneszenz in einen irreversiblen Zellzyklusarrest übergegangen sind, nicht berücksichtigt (Kroemer *et al.*, 2009). Diese Zellen sind aus strahlenbiologischer Sicht tot, obwohl sie sich bei erhaltenem Metabolismus lediglich nicht weiter teilen. Es ist wahrscheinlich, dass für den Verlust der Teilungsfähigkeit ein geringeres Schadensausmaß nötig ist, als zum wirklichen Tod der Zelle benötigt wird (Tsuboi *et al.*, 2007).

Mit einer durchflusszytometrischen Analyse des DNA-Gehalts der Zellen wurde die Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung untersucht, wobei relevante Veränderungen in der Zellzyklusprogression der exponentiell wachsenden Zellen nach Photonenexposition beobachtet wurden (vgl. Kapitel 3.5.1). Die Zellen arretierten in der G<sub>2</sub>/M- und in der G<sub>1</sub>-Phase, wobei der Arrest mit steigender Dosis (max. 6 Gy) stärker ausgeprägt war und länger andauerte. Der durch Photonenexposition induzierte Zellzyklusarrest war jedoch nur von begrenzter Dauer (etwa 26 h). Die beobachtete Einleitung eines G<sub>2</sub>/M-Arrests durch Photonenbestrahlung ist ein bekanntes Phänomen, welches bereits durch eine andere Arbeitsgruppe in A549-Zellen beschrieben wurde (Muradyan *et al.*, 2011).

Durch Konfluenz befanden sich die Zellen des in Kapitel 3.5.2 dargestellten Experiments zu einem hohen Anteil in der G<sub>1</sub>-Phase und arretierten nach Bestrahlung bevorzugt in dieser Phase, wobei auch hier eine dosisabhängige Ausprägung und Dauer zu verzeichnen war. Der G<sub>1</sub>-Arrest verhindert, dass geschädigte DNA in der sich anschließenden S-Phase repliziert wird. Ein Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase kann nur von Zellen mit einem positiven p53-Status - wie der hier untersuchten Zelllinie A549 - induziert werden (Kastan *et al.*, 1992; Kuerbitz *et al.*, 1992).

Generell waren die Effekte nach Kohlenstoffionenbestrahlung im Vergleich zu Photonenstrahlung stärker ausgeprägt. Bei den exponentiell wachsenden Zellen stellte sich ebenfalls ein Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase ein (vgl., Kapitel 3.5.3 und 3.5.4). Dieser war schon bei einer Dosis von 2 Gy <sup>12</sup>C stärker ausgeprägt als der Arrest unter der maximalen Photonendosis von 6 Gy und hielt über den gesamten Beobachtungszeitraum (36 bzw. 68 h) an. Unter Berücksichtigung der RBW von 3 für <sup>12</sup>C-Strahlung lässt sich somit schlussfolgern, dass biologisch äquivalente Dosen Kohlenstoffionenstrahlung einen stärkeren und länger andauernden Zellzyklusarrest in A549-Zellen hervorrufen als Photonenstrahlung.

Der Zellzyklusarrest spielt eine wichtige Rolle bei der Wahrung der Integrität des Genoms. Das Anhalten des Zellzyklus ermöglicht den Zellen die Reparatur von Schäden, bevor diese repliziert oder an Tochterzellen weitergegeben werden. Bestrahlungsdosis und Schadensausmaß stehen in einem proportionalen Verhältnis zueinander, weshalb konsekutiv die Dauer des Zellzyklusarrests aufgrund des steigenden Schadensniveaus mit der Dosis ansteigt. Hoch-LET-Strahlung induziert durch die dichte Energieabgabe auf engstem Raum komplexe DNA-Schäden, weshalb ein stärker ausgeprägter und länger anhaltender Arrest nach Kohlenstoffionenexposition eine zu erwartende Konsequenz darstellt.

Die Induktion eines stärkeren G<sub>2</sub>/M-Arrests nach Partikelstrahlung wurde schon 1979 für verschiedene schwere Ionen, darunter auch für Kohlenstoffionen, in V79-Zellen beschrieben (Lücke-Huhle *et al.*). Andere Arbeitsgruppen bestätigten einen stärkeren Arrest nach Kohlenstoffionenbestrahlung in HepG2-Zellen und in verschiedenen Glioblastomzelllinien (Liu *et al.*, 2007; Tsuboi *et al.*, 1998).

Allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen ist jedoch gemeinsam, dass der Arrest in der G<sub>1</sub>- oder der G<sub>2</sub>/M-Phase nie absolut war. Auch nach den höchsten applizierten Dosen von 7,5 Gy Photonen beziehungsweise 8 Gy <sup>12</sup>C schritten relevante Anteile der Zellpopulation im Zellzyklus fort. Für eine Kohlenstoffionendosis von 8 Gy wurden durchschnittlich 53 erwartete Kerntreffer berechnet (vgl. Kapitel 3.3), was vermuten lässt, dass auch Zellen mit erheblichen DNA-Schäden den G<sub>1</sub>/S bzw. G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt passieren können. Dass sogar Zellen mit komplexeren Schäden in die Mitose eintreten können, zeigt die von Deckbar *et al.* ermittelte Schwelle von 10-20 unreparierten Doppelstrangbrüchen, welche für den Progress in die M-Phase unterschritten werden muss (Deckbar *et al.*, 2011).

Wie oben bereits erwähnt, ist für einen G<sub>1</sub>-Phase-Arrest ein positiver p53-Status der Zelle Voraussetzung. Durch p53 wird der Zellzyklusinhibitor CDKN1A aktiviert (el-Deiry

*et al.*, 1993), welcher über eine Bindung an Cyclin E die für den Progress in die S-Phase benötigte Phosphorylierung des Rb-Proteins verhindert (Cazzalini *et al.*, 2010). Die einen G<sub>1</sub>-Arrest induzierende Expression von *CDKN1A* wird nach Photonenbestrahlung regelmäßig in wt-p53-Zellen induziert (Di Leonardo *et al.*, 1994; Tsuyama *et al.*, 2001), was sich in dieser Arbeit in der p53-positiven Zelllinie A549 bestätigte. Zu den beiden frühen Zeitpunkten 2 und 8 h nach Bestrahlung mit Photonendosen bis 7,5 Gy kam es zu einer maximal 4,2-fach gesteigerten Expression (vgl. Kapitel 3.4.3). Auch nach Kohlenstoffionenexposition wurde *CDKN1A* heraufreguliert. Die Expressionssteigerung war bei den applizierten Dosen von 2,5 und 4,5 Gy jedoch um ein Vielfaches höher (max. 18-fach) und dauerte über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 24 h an.

Eine höhere und längere Expression von *CDKN1A* nach Partikelbestrahlung findet sich auch in anderen Zelltypen. In wt-p53-HepG2-Zellen führte eine Kohlenstoffionenbestrahlungsdosis bis 2 Gy drei Tage post radiationem zu einer deutlicheren Induktion des *CDKN1A*-Proteins als Photonen (Liu *et al.*, 2007). In humanen Fibroblasten wurde eine gering erhöhte Expression von *CDKN1A* auf Proteinebene nach Exposition mit physikalisch äquivalenten Dosen Photonen und Kohlenstoffionen beobachtet, welche über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 24 h anhielt (Fournier *et al.*, 2004). Abweichend hiervon zeigte sich in humanen Glioblastomzellen mit positivem p53-Status bei erhaltenem G<sub>1</sub>-Arrest eine verminderte Expression des *CDKN1A*-Proteins, weshalb von den Autoren ein alternativer Signalweg für die Induktion des G<sub>1</sub>-Arrests nach Partikelstrahlung in Glioblastomzellen diskutiert wurde (Iwadate *et al.*, 2001).

Die sehr hohe und lange andauernde Expression von *CDKN1A* deutet zum einen auf einen ausgeprägten und langen Zellzyklusarrest nach Kohlenstoffionenexposition in der G<sub>1</sub>-Phase hin. Da *CDKN1A* auch am G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt beteiligt ist (Bunz *et al.*, 1998), passt die hohe Expression von *CDKN1A* andererseits auch zu dem verstärkten G<sub>2</sub>/M-Arrest nach <sup>12</sup>C-Exposition.

Der andere in dieser Arbeit untersuchte Zellzyklusinhibitor ist *GADD45A*. Durch dessen Bindung und konsekutive Inhibierung von CDK1 sorgt er für einen Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase (Siafakas & Richardson, 2009). Unter Photonenbestrahlung bis max. 7,5 Gy wurde *GADD45A* im Monolayer nur unterschwellig hochreguliert, wohingegen <sup>12</sup>C-Bestrahlung eine relevante Hochregulation bewirkte. Die Exposition mit 4,5 Gy Kohlenstoffionen induzierte eine hohe, fast 12-fache Heraufregulierung, wohingegen sich nach Exposition mit 2,5 Gy Kohlenstoffionen zu allen Zeitpunkten eine geringe, unterschwellige Hochregulierung zeigte. Das Expressionsmuster von *GADD45A* zeigt somit eine eindeutige Dosisabhängigkeit (vgl. Kapitel 3.4.3), wohingegen die

Bestrahlungsdosis in den übrigen Genexpressionsanalysen sowohl bei Kohlenstoffionen- als auch bei Photonenbestrahlung unerwarteterweise eine untergeordnete Rolle spielte.

In der Arbeit von Zhan *et al.* wurde postuliert, dass GADD45A nicht am durch ionisierende Strahlung induzierten G<sub>2</sub>/M-Arrest beteiligt sei (Zhan *et al.*, 1999). Möglicherweise ist GADD45A aber am durch Kohlenstoffionenstrahlung induzierten G<sub>2</sub>/M-Arrest beteiligt, wofür die in dieser Arbeit gezeigte Kombination aus der ausgeprägten Hochregulation von GADD45A verbunden mit dem stärkeren und längeren G<sub>2</sub>/M-Arrest nach <sup>12</sup>C-Bestrahlung spricht.

Eine Limitierung der erhobenen Daten stellt die Tatsache dar, dass keine Aussage über das weitere Schicksal der Zellen nach dem Beobachtungszeitraum gemacht werden kann. Ob die Zellen aus einem lange andauernden Zellzyklusarrest wieder in den Zellzyklus eintreten, ob sie im Arrest verbleiben oder ob sie Zelltodmechanismen einleiten, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

### **4.3 Apoptoseinduktion nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen**

Bei der Analyse der Apoptoseinduktion in A549-Zellen nach Bestrahlung ist zunächst hervorzuheben, dass A549 als maligne, entartete Zelllinie kaum dazu neigt, Apoptose einzuleiten. Der Verlust der Apoptoseinduktion ist ein wichtiger Schritt in der Tumorphagenese (Thompson, 1995). In Experimenten unserer Arbeitsgruppe zur Apoptosedetektion nach Bestrahlung wurden A549-Zellen mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Agenzien (u. a. Staurosporin, Paclitaxel und Etoposid) exponiert. Unter keinem dieser Agenzien zeigte sich eine relevante Apoptoseinduktion (persönliche Kommunikation mit Frau Dr. Andrea Arenz, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Marburg). Dass die Apoptoseeinleitung in A549-Zellen nicht komplett eingestellt ist, zeigen die im Folgenden diskutierten Ergebnisse.

Das im Rahmen der Apoptose auf die äußere Membran translozierte Phosphatidylserin wurde mittels Bindung an Annexin V in der Durchflusszytometrie detektiert. Durch zusätzliche PI-Inkubation konnte weiterhin zwischen früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/ nekrotischen Zellen differenziert werden (Annexin V/ PI-Assay, vgl. Kapitel 2.9.2). Eine Photonenbestrahlung der A549-Zellen mit 10 Gy induzierte maximal 1,7% Annexin V-positive (früh-) apoptotische Zellen, wohingegen nach Exposition mit einer Dosis von 4 Gy Kohlenstoffionen ein mehr als 3-fach höherer



Prozentsatz (maximal 6%) (früh-) apoptotischer Zellen nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 3.6). Bei gleicher Größenordnung der spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen von 5 bzw. 6 % resultierte in der Summe mit mehr als 12% ein fast doppelt so großer Anteil im Sinne der Apoptose veränderter Zellen nach Kohlenstoffionenbestrahlung. Die geringere physikalische Dosis von 4 Gy  $^{12}\text{C}$  entspricht unter Berücksichtigung der in der Literatur angegebenen und der durch unsere Arbeitsgruppe ermittelten RBW von etwa 3 für Kohlenstoffionen (siehe Kapitel 4.1) einer biologisch äquivalenten Dosis von 12 Gy und ist hierdurch mit der Photonendosis von 10 Gy vergleichbar. Bei äquivalenten biologischen Dosen kann somit für Kohlenstoffionenstrahlung von einer im Vergleich zu Photonenstrahlung doppelten Apoptose-induzierenden Potenz in A549-Zellen ausgegangen werden.

Die Detektion einer Phosphatidylserintranslokation ist jedoch kein komplett verlässlicher Indikator der Apoptose (Kroemer *et al.*, 2009), da die Translokation dieses Phosphoglycerids nicht ausschließlich im Rahmen des programmierten Zelltods auftritt. Beispielsweise beobachteten Yang *et al.* eine reversible Translokation von Phosphatidylserin in mit hypotoner Lösung behandelten Granulozyten, die nicht zur Apoptoseinduktion führte (Yang *et al.*, 2002).

Die über andere Methoden zur Apoptosedetektion erzielten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untermauern jedoch die Validität der mittels Phosphatidylserintranslokation detektierten Ergebnisse dieser Arbeit. Ghosh *et al.* (2011) konnten über eine DAPI-Färbung in A549-Zellen zehnmal mehr Nuklei (etwa 30%) mit apoptotischen Veränderungen nach Kohlenstoffionenexposition (1 Gy) als nach 1 Gy Photonenexposition (etwa 3%) nachweisen. Derartige Beobachtungen wurden auch in anderen Zelllinien gemacht. In als besonders strahlenresistent geltenden Glioblastomzelllinien konnten Tsuboi *et al.* (2007) nach Kohlenstoffionenexposition mit 10 Gy einen im Vergleich zu Gammastrahlung (10 Gy) deutlich höheren Prozentsatz (bis 8,5%) an apoptotischen Zellen über eine Hoechst 33342-Färbung nachweisen.

Neben der Apoptosedetektion über Membranveränderungen wurden die an der Induktion und Regulation der Apoptose beteiligten Gene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* auf ihre Expressionsänderung nach Bestrahlung mit dicht-ionisierender und locker-ionisierender Strahlung untersucht.

Die Transkriptionsregulation des anti-apoptotischen Gens *BCL2* scheint für die beobachtete höhere Apoptoseinduktion nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht maßgeblich zu sein, da sich die Expressionsänderung in den hier durchgeführten Experimenten innerhalb der Schwankungsbreite der unbestrahlten Kontrollen von +1 bis

-1 bewegte. Nach Photonenexposition zeigte sich frühzeitig eine mäßige Heraufregulierung, was auf eine initiale, temporäre Unterbindung der Apoptoseinduktion durch Photonenstrahlung hindeuten kann.

Eine dauerhafte Überexpression von BCL2 liegt in vielen malignen Tumoren vor. Aufgrund der anti-apoptischen Eigenschaft dieses Proteins trägt die hohe Expression zur Radioresistenz von Zellen bei (Belka & Budach, 2002). Hamada *et al.* (2008) zeigten, dass sich die in BCL2 überexprimierenden Zellen manifestierte Radioresistenz in Zervixkarzinomzellen durch  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung überwinden ließ. Sie fanden nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in BCL2-überexprimierenden und in Zellen mit normalem BCL2-Proteinstatus gleiche Apoptoseraten.

Die Expressionssteigerung des pro-apoptischen Gens *BAX* war in Abhängigkeit von der applizierten Dosis im Untersuchungszeitraum bis 24 h in den Monolayerexperimenten nach Exposition mit Kohlenstoffionen höher und länger anhaltend als im Photonenexperiment (vgl. Kapitel 3.4.2). Dies zeigt, dass die Verschiebung des regulatorischen Gleichgewichts in Richtung pro-apoptischer Mechanismen verstärkt durch Exposition mit Kohlenstoffionen ausgelöst wird.

Diese Beobachtung deckt sich in der Tendenz mit den Ergebnissen von Ghosh *et al.* (2011). Die Arbeitsgruppe konnte eine Hochregulation von BAX auf Proteinebene in A549-Zellen ausschließlich nach Kohlenstoffionenexposition und nicht nach Photonenexposition detektieren. In Gliomzellen mit positivem und negativem p53-Status konnte abweichend zu den Beobachtungen in A549-Zellen gezeigt werden, dass die Proteinlevel von BAX nach Kohlenstoffionenbestrahlung gleich blieben oder sogar leicht vermindert waren (Iwadate *et al.*, 2001). Dies lässt auf eine zelltypspezifische Expression des *BAX*-Gens schließen.

Das zweite untersuchte anti-apoptische Gen *BIRC5* zeigt im Unterschied zu *BCL2* eine relevante Expressionsänderung nach Exposition mit dicht-ionisierender Strahlung. Nach 8 h und nach 24 h konnte in unseren Experimenten eine deutlich herabgesetzte Expression (Faktor 0,18) des anti-apoptischen *BIRC5* im mit Kohlenstoffionen bestrahlten Monolayer beobachtet werden, wohingegen im Photonenexperiment nur nach 24 h eine geringe Herunterregulierung (Faktor 0,5) auftrat. Die deutlichere und frühere Herabregulierung des Apoptoseinhibitors nach  $^{12}\text{C}$ -Exposition, also das Ausbleiben eines apoptoseinhibierenden Regulationsmechanismus, passt zu der Beobachtung einer höheren Apoptoseinduktionsrate im Annexin V/ PI-Assay nach Hoch-LET-Bestrahlung.

Abweichend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachteten Jin *et al.* (2008) in wt-p53-HepG2 Zellen, dass Kohlenstoffionenstrahlung zu einer vermehrten Expression von *BIRC5* im Vergleich zu Photonenstrahlung führte, weshalb auch hier von einer zelltypspezifischen Regulation auszugehen ist.

*BIRC5* hat über die Funktion als Apoptoseinhibitor hinaus Aufgaben in der Mitose und wird für deren Ablauf benötigt (Li *et al.*, 1998). Ein Ausschalten von *BIRC5* verhindert die Durchführung der Mitose; die Zellen arretieren in der G<sub>2</sub>/M-Phase (Beltrami *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2007). Die unter <sup>12</sup>C-Exposition beobachtete Herunterregulierung von *BIRC5* passt somit außer zu einer möglichen Apoptoseinduktion zu der im vorherigen Kapitel diskutierten Beobachtung eines ausgeprägten Zellzyklusarrests in der G<sub>2</sub>/M-Phase nach <sup>12</sup>C-Bestrahlung.

#### 4.4 Einfluss des Tumormikromilieus auf die Genexpression

Beim Vergleich der Expressionsänderungen in den Monolayern mit den Xenograftexperimenten fallen in einigen Fällen deutliche Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene auf.

Zum einen unterschieden sich die Genexpressionsänderungen nach Photonenbestrahlung voneinander. Bei dem anti-apoptotischen Gen *BIRC5* war nach 6 Gy Photonenexposition im Xenografttumor eine starke Herabregulierung (0,3-fache Expression) zu verzeichnen, wohingegen sich im Monolayer nach Photonenexposition mit 6 Gy lediglich eine Regulation innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite zeigte (vgl. Kapitel 3.4.2). Auch die Expression von *CDKN1A* war nach Photonenstrahlung im Xenografttumor wesentlich deutlicher hochreguliert als im Monolayer (vgl. Kapitel 3.4.3). Die Herunterregulierung eines Apoptoseinhibitors und die stärkere Heraufregulierung eines Zellzyklusinhibitors lassen somit auf eine höhere Tendenz zur Apoptoseinduktion und zum Zellzyklusarrest im dreidimensionalen Modell im Vergleich zum Monolayer nach Photonenexposition schließen.

Zum anderen differierte auch die Expressionsänderung nach Kohlenstoffionenbestrahlung. Die Herabregulation von *BIRC5* war durch Kohlenstoffionenbestrahlung im Xenografttumor geringer ausgeprägt als im Monolayer (vgl. Kapitel 3.4.2). Die Expression von *GADD45A* zeigte *in vitro* nach Bestrahlung mit 2,5 Gy <sup>12</sup>C eine leicht überschwellige Genexpressionsänderung, wobei nach Bestrahlung mit 2 Gy <sup>12</sup>C *in vivo* praktisch keine Genexpressionsänderung nachzuweisen war (vgl. Kapitel 3.4.3). Abweichend von den Ergebnissen nach Photonenbestrahlung weist die deutlichere Herabregulierung eines Apoptoseinhibitors und die Heraufregulierung eines

Zellzyklusinhibitors auf eine höhere Induktion von Apoptose und Zellzyklusarret nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung im Monolayermodell hin.

Bei der Interpretation der Ergebnisse im Xenograftmodell im Vergleich zu den Monolayerkulturen müssen einige Einflüsse auf die Genexpression berücksichtigt werden.

Grundlegend ist hervorzuheben, dass die alleinige Angabe der Kohlenstoffionendosis in Gray nicht ausreichend ist. Neben der berechneten Dosis in Gray ist auch der LET der  $^{12}\text{C}$ -Strahlung zu berücksichtigen. Dieser verhält sich antiproportional zur Energie der Strahlung. Die Monolayer wurden am Linearbeschleuniger UNILAC mit einer niedrigeren Energie (9,8 MeV/u in der Zielschicht) exponiert, die einen (wie in Kapitel 4.1 erläutert) optimalen LET von 170 keV/ $\mu\text{m}$  lieferte. Kohlenstoffionen mit einem solchen LET zeichnen sich durch eine maximale Energiedeposition an die Umgebung aus. Über die Xenografttumoren wurde analog zur Patientenbestrahlung am Synchrotron SIS ein 4 cm langer SOBP gelegt. Die Energie lag in den einzelnen Schichten zwischen 122 und 183 MeV/u, weshalb der LET im Bragg Peak konsekutiv im Mittel lediglich 55 keV/ $\mu\text{m}$  betrug. Durch den niedrigeren LET ist davon auszugehen, dass die RBW im Xenograftmodellversuch geringer war als in den Monolayerexperimenten. Dies erklärt die ausgeprägtere Regulation in Richtung Apoptose- und Zellzyklusarrestinduktion im Monolayer nach Kohlenstoffionenbestrahlung.

Weiterhin muss beachtet werden, dass sich die Genexpression von Tumoren *in vitro* und *in vivo* aufgrund des unterschiedlichen Wachstums unterscheidet. Die Kommunikation von Zellen ist in einem dreidimensionalen Modell wesentlich komplexer als bei Zellen im Monolayer. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang beispielsweise die fehlende parakrine Sekretion in Monolayerkulturen. Weiterhin bilden Epithelien *in vivo* durch tight-junctions Diffusionsbarrieren, wodurch die apikobasale Polarität des Epithels aufrechterhalten wird (Debnath & Brugge, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression in humanen Bronchialkarzinomzellen, die subkutan in den Oberschenkel einer Maus eingebracht wurden, untersucht. Bei diesem *in vivo*-Modell liegt somit eine xenogene, ektope Transplantation vor. Der Wachstumsort eines implantierten Karzinoms spielt jedoch durchaus eine Rolle. Beispielsweise konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass implantierte Pankreaskarzinome am orthotopen Wachstumsort metastasierten, wobei sie bei subkutaner, also ektopter, Implantation keine Metastasierung induzierten, was mit einer veränderten Genexpression an den verschiedenen Implantationsorten einherging (Nakamura *et al.*, 2007).

Je nach Tumorgröße ergeben sich *in vivo* mehr oder weniger große Unterschiede in der Durchblutungssituation und Nährstoffversorgung im Vergleich zu normalem Gewebe. Im Inneren eines malignen Tumors gibt es durch das schnelle Wachstum oft schlecht durchblutete Bereiche, wodurch die Zellen weniger Nährstoffe und Sauerstoff (Feldmann *et al.*, 1999) erhalten. Dies kann wiederum zu Nekrose im Tumorzentrum führen. Hypoxie und ein veränderter pH-Wert können das Ansprechen auf Photonenbestrahlung dahingehend verändern, dass Zellen unter anoxischen Bedingungen wesentlich strahlenresistenter gegen Photonen sind (fehlender Sauerstoffverstärkungseffekt), was sich bei Kohlenstoffionenstrahlung kaum beobachten lässt (Jäkel, 2009; Nakano *et al.*, 2006).

#### 4.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit dargestellt, dass Kohlenstoffionen in A549-Bronchialkarzinomzellen eine etwa 3-fach höhere biologische Wirksamkeit als Photonen haben. Weiterhin wurde beobachtet, dass biologisch äquivalente Dosen Kohlenstoffionen eine doppelte Apoptose-induzierende Potenz im Vergleich zu Photonenbestrahlung haben und dass sich das Expressionsmuster der an der Apoptose beteiligten Gene *BAX* und *BIRC5* nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung deutlicher hin zu einem pro-apoptischen Regulationsgleichgewicht bewegte. Es konnte eine sehr viel stärkere Heraufregulierung der Zellzyklusinhibitoren *CDKN1A* und *GADD45A* nach Exposition mit physikalisch geringeren Kohlenstoffionendosen als nach Photonenbestrahlung nachgewiesen werden, was wiederum zu dem in der Zellzyklusanalyse beobachteten ausgeprägteren und länger andauernden Zellzyklusarrest nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung passt. Die Zellen arretierten hierbei nach Hoch-LET-Bestrahlung dosisabhängig zu einem größeren Anteil und über längere Zeit in der  $G_2/M$ -beziehungsweise der  $G_1$ -Phase. Die Expressionsergebnisse in den Xenografttumoren wichen in einigen Fällen sowohl nach Bestrahlung mit Photonen als auch nach  $^{12}\text{C}$ -Exposition von den Ergebnissen in Monolayerkulturen ab, wofür diverse mögliche Ursachen diskutiert wurden.

Eine Limitierung dieser Arbeit stellen die fehlenden Wiederholungen der Kohlenstoffionenexperimente dar, welche in dem limitierten Zugang zu Hoch-LET-Strahlung begründet sind.

Als weiterführende Fragestellung ist die Expressionsanalyse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene nach Bestrahlung in weiteren Zelllinien von Interesse. Einige

Arbeitsgruppen fanden in anderen Modellen zum Teil abweichende Ergebnisse, was ein Hinweis auf eine zelltypspezifische Regulation sein kann. In diesem Kontext ist die Untersuchung von weiteren an der Einleitung des programmierten Zelltods und der Zellzyklusprogression beteiligten Genen sinnvoll, da Hoch-LET-Strahlung durch das andersartige Schadensmuster möglicherweise andere Signalwege aktiviert.

In einem nächsten Schritt sind ergänzende Untersuchungen auf Proteinebene von Interesse, um spätere Mechanismen wie posttranskriptionelle Modifikation oder translationelle Regulation zu berücksichtigen.

Für die von den Ergebnissen in der Monolayerkultur differierenden Expressionsergebnisse im Xenograftmodell konnte keine umfassende Begründung gegeben werden, da in einem *in vivo* Modell komplexe Einflussfaktoren zu berücksichtigen sind. Trotzdem ist gerade das Verständnis der Abläufe in einem solchen Modell von Interesse, da es der Realität am nächsten kommt. Zum tieferen Verständnis ist eine möglichst umfassende Analyse von genannten Einflussfaktoren wie Hypoxie, Nährstoffmangel und Wachstumsverhalten in einem *in vivo* Modell anzustreben. Hierfür wäre auch die Etablierung eines *in vivo* Modells mit orthotoper Tumorimplantation für Bestrahlungsexperimente wünschenswert.

Wie eingangs geschildert liegen auch in der klinischen Anwendung für eine limitierte Gruppe von Patienten bereits gute Ergebnisse für die Kohlenstoffionentherapie des Bronchialkarzinoms vor (vgl. Kapitel 1). Die Fallzahlen sind allerdings nicht groß genug, um sichere Aussagen über den Benefit der Patienten durch diese Therapie treffen zu können. Aus diesem Grund ist neben den genannten weiterführenden strahlenbiologischen Experimenten die Anwendung an größeren Patientenkollektiven wünschenswert, um in der Zukunft Bronchialkarzinompatienten möglicherweise die Partikeltherapie als hoffnungsvolle Therapiealternative anbieten zu können.

---

## 5 Literaturverzeichnis

**Allen, C., Borak, T. B., Tsujii, H. & Nickoloff, J. A. (2011).** Heavy charged particle radiobiology: using enhanced biological effectiveness and improved beam focusing to advance cancer therapy. In *Mutat Res*, pp. 150-157. Netherlands: 2011 Elsevier B.V.

**Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. (1997).** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**, 917-921.

**Amundson, S. A., Do, K. T., Vinikoor, L. C. & other authors (2008).** Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. In *Cancer Res*, pp. 415-424. United States.

**Barendsen, G. W., Walter, H. M., Fowler, J. F. & Bewley, D. K. (1963).** Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. III. Experiments with cyclotron-accelerated alpha-particles and deuterons. *Radiat Res* **18**, 106-119.

**Basu, A. & Haldar, S. (1998).** The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* **4**, 1099-1109.

**Belka, C. & Budach, W. (2002).** Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* **78**, 643-658.

**Beltrami, E., Plescia, J., Wilkinson, J. C., Duckett, C. S. & Altieri, D. C. (2004).** Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. In *J Biol Chem*, pp. 2077-2084. United States.

**Brenner, D. & Mak, T. W. (2009).** Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 871-877.

**Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1998).** Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501.

---

**Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O. & Irimie, A. (2009).** Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* **48**, 811-821.

**Campbell, N. A., Reece, J. B. & Markl, J. (2006).** Biologie. Kapitel 12: Der Zellzyklus. 6. Auflage. pp. 253-271. München.

**Cazzalini, O., Scovassi, A. I., Savio, M., Stivala, L. A. & Prosperi, E. (2010).** Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. In *Mutat Res*, pp. 12-20. Netherlands: 2010 Elsevier B.V.

**Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. & Green, D. R. (2004).** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014.

**Chipuk, J. E. & Green, D. R. (2006).** Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* **13**, 994-1002.

**Conrad, S. (2007).** Reaktionen von Zellen des Immunsystems auf Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. Nat., Technische Universität Darmstadt.

**Debnath, J. & Brugge, J. S. (2005).** Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. In *Nat Rev Cancer*, pp. 675-688. England.

**Deckbar, D., Jeggo, P. A. & Löbrich, M. (2011).** Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**, 271-283.

**Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Leder, P. (1995).** Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. In *Cell*, pp. 675-684. United States.

**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 Dev* **8**, 2540-2551.



---

**Duchesne, G. M., Peacock, J. H. & Steel, G. G. (1986).** The acute in vitro and in vivo radiosensitivity of human lung tumour lines. *Radiother Oncol* **7**, 353-361.

**El-Awady, R. A., Dikomey, E. & Dahm-Daphi, J. (2003).** Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. In *Br J Cancer*, pp. 593-601. England.

**el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E. & other authors (1993).** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In *Cell*, pp. 817-825. United States.

**Feldmann, H. J., Molls, M. & Vaupel, P. (1999).** Blood flow and oxygenation status of human tumors. Clinical investigations. *Strahlenther Onkol* **175**, 1-9.

**Fleige, S. & Pfaffl, M. W. (2006).** RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27**, 126-139.

**Fokas, E., Kraft, G., An, H. & Engenhardt-Cabillic, R. (2009).** Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 216-229.

**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. In *Radiat Res*, pp. 675-684. United States.

**Gaber, E. & Wildner, M. (2011).** Robert Koch-Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 52: Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede. Berlin.

**Ghosh, S., Narang, H., Sarma, A. & Krishna, M. (2011).** DNA damage response signaling in lung adenocarcinoma A549 cells following gamma and carbon beam irradiation. In *Mutat Res: 2011 Elsevier B.V.*

**Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. (1973).** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1417-1423.

**Goeckenjan, G., Sitter, H., Thomas, M. & Branscheid, D. (2010).** Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Interdisziplinäre S3-

---

Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft, pp. e1–e164. Stuttgart: Pneumologie.

**Hamada, N., Hara, T., Omura-Minamisawa, M., Funayama, T., Sakashita, T., Sora, S., Yokota, Y., Nakano, T. & Kobayashi, Y. (2008).** Energetic heavy ions overcome tumor radioresistance caused by overexpression of Bcl-2. In *Radiother Oncol*, pp. 231-236. Ireland.

**Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993).** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. In *Cell*, pp. 805-816. United States.

**Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. (1990).** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336.

**Hof, H., Herfarth, K. K., Munter, M., Hoess, A., Motsch, J., Wannemacher, M. & Debus, J. J. (2003).** Stereotactic single-dose radiotherapy of stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC). In *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, pp. 335-341. United States.

**Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. & Murphy, M. (2002).** Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. In *J Biol Chem*, pp. 3247-3257. United States.

**Hollander, M. C. & Fornace, A. J., Jr. (2002).** Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene* **21**, 6228-6233.

**Ikeda, M., Okamoto, I., Tamura, K., Satoh, T., Yonesaka, K., Fukuoka, M. & Nakagawa, K. (2007).** Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G(2)-M arrest in A549 cells. In *Cancer Lett*, pp. 292-298. Ireland.

**Iwadate, Y., Mizoe, J., Osaka, Y., Yamaura, A. & Tsujii, H. (2001).** High linear energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53. In *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, pp. 803-808. United States.

---

**Jäkel, O. (2009).** Medical physics aspects of particle therapy. *Radiat Prot Dosimetry* **137**, 156-166.

**Jeggo, P. A. & Löbrich, M. (2006).** Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. In *DNA Repair (Amst)*, pp. 1192-1198. Netherlands.

**Jiang, G. L. (2012).** Particle therapy for cancers: a new weapon in radiation therapy. *Front Med* **6**, 165-172.

**Jin, X. D., Gong, L., Guo, C. L., Hao, J. F., Wei, W., Dai, Z. Y. & Li, Q. (2008).** Survivin expressions in human hepatoma HepG2 cells exposed to ionizing radiation of different LET. *Radiat Environ Biophys* **47**, 399-404.

**Kamlah, F. (2007).** In vivo siRNA-Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms zur Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in der Tumorprogression. Veterinärmedizinische Dissertation: Universität Giessen.

**Kamlah, F., Hänze, J., Arenz, A., Seay, U., Hasan, D., Juricko, J., Bischoff, B., Gottschald, O. R., Fournier, C., Taucher-Scholz, G., Scholz, M., Seeger, W., Engenhart-Cabillic, R., and Rose, F. (2011).** Comparison of the effects of carbon ion and photon irradiation on the angiogenic response in human lung adenocarcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **80**, 1541-1549.

**Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. & Fornace, A. J., Jr. (1992).** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. In *Cell*, pp. 587-597. United States.

**Kastan, M. B. & Bartek, J. (2004).** Cell-cycle checkpoints and cancer. In *Nature*, pp. 316-323. England.

**Kellerer, A. M. & Rossi, H. H. (1978).** A Generalized Formulation of Dual Radiation Action, pp. 471-488: *Radiat. Res.*

---

**Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.

**Kraft, G. (2000).** Tumor therapy with heavy charged particles, pp. 473-544: Prog Part Nucl Phys.

**Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P. & other authors (2009).** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11.

**Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. & Kastan, M. B. (1992).** Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7491-7495.

**Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C. & Altieri, D. C. (1998).** Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**, 580-584.

**Liao, Z., Lin, S. H. & Cox, J. D. (2011).** Status of particle therapy for lung cancer. *Acta Oncol* **50**, 745-756.

**Liu, B., Zhang, H., Xie, Y., Hao, J., Duan, X., Zhou, Q., Qiu, R. & Zhou, G. (2007).** Cell cycle and apoptosis alteration of human hepatocarcinoma cells by subclinical-dose <sup>12</sup>C<sup>6+</sup>-beam irradiation. In *Eur J Gastroenterol Hepatol*, pp. 749-754. England.

**Lomax, A. J. (2009).** Charged particle therapy: the physics of interaction. In *Cancer J*, pp. 285-291. United States.

**Lu, Z. J., Ren, Y. Q., Wang, G. P. & other authors (2009).** Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. In *J Exp Clin Cancer Res*, pp. 16. Italy.

**Lücke-Huhle, C., Blakely, E. A., Chang, P. Y. & Tobias, C. A. (1979).** Drastic G2 arrest in mammalian cells after irradiation with heavy-ion beams. *Radiat Res* **79**, 97-112.

---

**Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J. (2004).** Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**, 997-1007.

**Miyamoto, T., Baba, M., Sugane, T. & other authors (2007a).** Carbon ion radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer using a regimen of four fractions during 1 week. In *J Thorac Oncol*, pp. 916-926. United States.

**Miyamoto, T., Baba, M., Yamamoto, N. & other authors (2007b).** Curative treatment of Stage I non-small-cell lung cancer with carbon ion beams using a hypofractionated regimen. In *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, pp. 750-758. United States.

**Miyashita, T. & Reed, J. C. (1995).** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.

**Muradyan, A., Gilbertz, K., Stabentheiner, S., Klause, S., Madle, H., Meineke, V., Ullmann, R. & Scherthan, H. (2011).** Acute high-dose X-radiation-induced genomic changes in A549 cells. In *Radiat Res*, pp. 700-707. United States.

**Müller, R. (2008).** Warum ist der Kohlenstoffstrahl den Protonen im klinisch relevanten Direktvergleich nicht überlegen? - Literatur kommentiert: Strahlenther Onkol No. 4.

**Nakamura, T., Fidler, I. J. & Coombes, K. R. (2007).** Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment. In *Cancer Res*, pp. 139-148. United States.

**Nakano, T., Suzuki, Y., Ohno, T., Kato, S., Suzuki, M., Morita, S., Sato, S., Oka, K. & Tsujii, H. (2006).** Carbon beam therapy overcomes the radiation resistance of uterine cervical cancer originating from hypoxia. *Clin Cancer Res* **12**, 2185-2190.

**Nelson, G. A. (2003).** Fundamental space radiobiology. *Gravit Space Biol Bull* **16**, 29-36.

**Ohno, T. (2013).** Particle radiotherapy with carbon ion beams. *EPMA J* **4**, 9.

---

**Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. (1993).** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.

**Pawlik, T. M. & Keyomarsi, K. (2004).** Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. In *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, pp. 928-942. United States.

**Pfaffl M.W., M. H. H. D. (2006).** Quantifizierung der mRNA-Expression von Kandidatengenen in Nutztieren mittels qRT-PCR, pp. 440-450. Züchtungskunde.

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

**Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004).** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, 509-515.

**Pijls-Johannesma, M., Grutters, J. P., Verhaegen, F., Lambin, P. & De Ruyscher, D. (2010).** Do we have enough evidence to implement particle therapy as standard treatment in lung cancer? A systematic literature review. In *Oncologist*, pp. 93-103. United States.

**Puck, T. T. & Marcus, P. I. (1956).** Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* **103**, 653-666.

**Reiser, M., Kuhn, F.-P. & Debus, J. (2006).** Duale Reihe Radiologie: Teil A, Kapitel 1: Physikalische Grundlagen, 2. Auflage. pp. 2-24. Stuttgart.

**Schulze, J. (2007).** Strahlensensitivität und Strahlensensibilisierbarkeit nach der Einwirkung ionisierender Strahlen und Coffein auf Bronchialkarzinomzellen. Medizinische Dissertationsschrift Charité Universitätsmedizin Berlin.

**Siafakas, R. A. & Richardson, D. R. (2009).** Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45alpha). *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 986-989.

---

**Skarsgard, L. D. (1998).** Radiobiology with heavy charged particles: a historical review. *Phys Med* **14 Suppl 1**, 1-19.

**Srinivasula, S. M. & Ashwell, J. D. (2008).** IAPs: what's in a name? In *Mol Cell*, pp. 123-135. United States.

**Suzuki, M., Kase, Y., Yamaguchi, H., Kanai, T. & Ando, K. (2000).** Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams. In *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, pp. 241-250. United States.

**Takiguchi, Y., Miyamoto, T., Nagao, K. & Kuriyama, T. (2007).** Assessment of the homogeneous efficacy of carbon ions in the spread-out Bragg peak for human lung cancer cell lines. *Radiat Med* **25**, 272-277.

**Theillin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. (1999).** Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**, 291-295.

**Thompson, C. B. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

**Tsuboi, K., Tsuchida, Y., Nose, T. & Ando, K. (1998).** Cytotoxic effect of accelerated carbon beams on glioblastoma cell lines with p53 mutation: clonogenic survival and cell-cycle analysis. *Int J Radiat Biol* **74**, 71-79.

**Tsuboi, K., Moritake, T., Tsuchida, Y., Tokuyue, K., Matsumura, A. & Ando, K. (2007).** Cell cycle checkpoint and apoptosis induction in glioblastoma cells and fibroblasts irradiated with carbon beam. In *J Radiat Res (Tokyo)*, pp. 317-325. Japan.

**Tsujimoto, Y. & Croce, C. M. (1986).** Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5214-5218.

---

**Tsuyama, N., Ide, T., Noda, A., Iwamoto, K. S., Mizuno, T., Kyoizumi, S. & Seyama, T. (2001).** X-rays induce dose-dependent and cell cycle-independent accumulation of p21(sdi1/WAF1). *Hiroshima J Med Sci* **50**, 1-7.

**Valenzuela, D. M. & Groffen, J. (1986).** Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. *Nucleic Acids Res* **14**, 843-852.

**Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.

**Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. (1995).** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39-51.

**Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D. & other authors (1999).** GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3706-3711.

**Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. & other authors (2001).** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.

**Weyrather, W. K., Ritter, S., Scholz, M. & Kraft, G. (1999).** RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *Int J Radiat Biol* **75**, 1357-1364.

**Weyrather, W. K. & Kraft, G. (2004).** RBE of carbon ions: experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. *Radiother Oncol* **73 Suppl 2**, S161-169.

**Yang, M. Y., Chuang, H., Chen, R. F. & Yang, K. D. (2002).** Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J Leukoc Biol* **71**, 231-237.



**Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C. & Fornace, A. J., Jr. (1999).** Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**, 2892-2900.

**Zirkle, R. E. & Tobias, C. A. (1953).** Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves. *Arch Biochem Biophys* **47**, 282-306.

## Publikationen

Die Genexpressionsanalysen wurden auf folgendem Poster/Kongressbeitrag veröffentlicht:

**Arenz, A., Kamlah, F., Bonifer, E., Juricko, J., Taucher-Scholz, G., Fournier, C., Scholz, M., Rose, F., Engenhart-Cabillic, R. (2009):** Heavy Ion induced Gene Expression Changes in A549 Lung Cancer Cells. 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung – GBS Essen 30.9. – 2.10.2009, Essen

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Wirkung von Kohlenstoffionen im Vergleich zu Photonen in der Bronchialkarzinomzelllinie A549 untersucht. Dabei ging es in erster Linie um die Untersuchung von Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest nach Bestrahlung mit den verschiedenen Strahlenqualitäten.

Zur Ermittlung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) von Kohlenstoffionen gegenüber Photonen wurde ein Koloniebildungstest durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt. Die relative Genexpression der Apoptose- und Zellzyklus-relevanten Gene *BAX*, *BCL2* und *BIRC5* bzw. *CDKN1A* und *GADD45A* wurde mittels quantitativer Real-Time RT-PCR in Monolayerzellen (Photonen max. 7,5 Gy,  $^{12}\text{C}$  max. 4,5 Gy) und in einem Xenograftmodell (Photonen 6 Gy,  $^{12}\text{C}$  2 Gy) untersucht. Zudem wurde über die durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts die Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung untersucht, sowie über ein Annexin V/ PI-Assay die strahleninduzierte Induktion von Apoptose detektiert.

Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

- Die relative biologische Wirksamkeit von Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u, LET 170keV/ $\mu\text{m}$ ) im Vergleich zu Photonenstrahlung (6 MV) betrug in Bezug auf das klonogene Überleben in A549-Monolayerzellen im Bereich von 10% Überleben 2,88.
- Das pro-apoptotische Gen *BAX* wurde im Monolayer nach geringeren Dosen Kohlenstoffionenexposition länger und deutlicher heraufreguliert als nach Photonenbestrahlung.
- Das anti-apoptotische Gen *BIRC5* wurde nach Kohlenstoffionenbestrahlung im Monolayer wesentlich deutlicher herabreguliert (0,18-fach, Photonen: unerschwellig).
- Nach Kohlenstoffionenbestrahlung bis 4 Gy war ein höherer Prozentsatz (max. 12%) an strahleninduziert toten Zellen in der Tumorzelllinie A549 zu detektieren als nach Photonenbestrahlung bis 10 Gy (max. 6,7%).
- Der am  $G_1/S$ -Übergang beteiligte Zellzyklusinhibitor *CDKN1A* wurde im Monolayer nach Photonenexposition bis knapp 4-fach und unter Kohlenstoffionenexposition bis 18-fach hochreguliert.
- Das am  $G_2/M$ -Arrest beteiligte Gen *GADD45A* wurde im Monolayer nach Photonenexposition kaum induziert, wohingegen nach Kohlenstoffionenbestrahlung eine fast 12-fache Heraufregulierung beobachtet werden konnte.

- Exponentiell wachsende Zellen zeigten nach Photonenbestrahlung einen Arrest in der G<sub>2</sub>/M- und in der G<sub>1</sub>-Phase. Nach Kohlenstoffionenbestrahlung war dieser Arrest schon bei Bestrahlung mit geringeren physikalischen Dosen deutlich stärker und länger ausgeprägt.
- Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen im Xenograftmodell unterschieden sich von den Ergebnissen in Monolayerzellen. Die Expression war nach gleicher physikalischer Dosis Photonenstrahlung im Xenograftmodell teilweise höher als in den Monolayerzellen. Umgekehrt zeigte sich nach Kohlenstoffionenexposition im Xenograftmodell zum Teil eine geringere Expression als in den Monolayerzellen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Kohlenstoffionenbestrahlung bei äquivalenter physikalischer Dosis fast dreimal mehr Zellen ihre Teilungsfähigkeit verloren als nach Photonenexposition. Die stärkere Induktion bzw. Suppression Apoptose-relevanter Gene zeigt die stärkere Aktivierung des Apoptosesignalwegs nach Kohlenstoffionenexposition. Auch die über Annexin V morphologisch nachgewiesene Induktion von Apoptose in A549-Zellen war nach Kohlenstoffionenexposition höher als nach Photonen, jedoch insgesamt gering. Somit kann die in dieser Arbeit ermittelte höhere RBW für das zelluläre Überleben nach Kohlenstoffionenbestrahlung nur zu einem kleinen Teil auf der Induktion von Apoptose beruhen.

Der stärker und länger ausgeprägte Zellzyklusarrest und die deutlichere Induktion der Zellzyklusinhibitoren nach Kohlenstoffionenexposition lassen sich vermutlich auf die komplexeren Schäden durch Hoch-LET-Strahlung zurückführen, da die Zellen mehr Zeit für deren Reparatur benötigen. Dass die Reparaturkapazität der A549-Zellen nach Kohlenstoffionenexposition häufiger überstiegen wurde, zeigen die Ergebnisse der Apoptosedetektion.

Die abweichenden Genexpressionsergebnisse im Xenograftmodell veranschaulichen die wichtige Rolle des Tumormikromilieus für die Reaktionen auf Bestrahlung *in vivo*. Welche Einflüsse in welcher Form auf die Strahlenantwort nach Hoch-LET-Strahlung *in vivo* wirken, bleibt in nachfolgenden Arbeiten zu klären. Als weiterführende Untersuchungen wäre außerdem die Analyse von anderen an Apoptose und Zellzyklusprogression beteiligten Genen bzw. deren Expression auf Proteinebene nach Kohlenstoffionenbestrahlung von Interesse.

## Summary

In this study the biological impact of carbon ions in comparison to photons was analyzed in the human lung cancer cell line A549. Apoptosis induction and cell cycle arrest were examined after exposure to the two radiation types.

In order to detect the relative biological effectiveness (RBE) of carbon ions compared to photons, a colony forming assay was employed by our research group. The relative expression of genes involved in cell cycle progression and apoptosis was measured by quantitative Real-Time-PCR in a monolayer cell culture (photons max. 7.5 Gy,  $^{12}\text{C}$  max. 4.5 Gy) as well as in a xenograft model (photons 6 Gy,  $^{12}\text{C}$  2 Gy). Furthermore, cell cycle distribution after radiation was detected by flow cytometric measurement of DNA content. Additionally, radiation-induced apoptosis was monitored using an Annexin V/PI assay.

The following results were obtained:

- The RBE of carbon ions (9.8 MeV/u, LET 170 keV/ $\mu\text{m}$ ) compared to photons (6 MV) for 10% survival was 2.88.
- After exposure to carbon ions expression of the pro-apoptotic gene BAX lasted longer and was up-regulated at lower doses in the monolayer cell culture as compared to photon irradiated cells.
- The anti-apoptotic gene *BIRC5* was down-regulated to a greater extent after carbon ion exposure (0.18-fold, photons: below threshold) in the monolayer cell culture.
- There was a higher percentage (max. 12%) of radiation-induced cell death in the cancer cell line A549 after exposure to carbon ions (up to 4 Gy) than after exposure to photon beams up to 10 Gy (max. 6.7%).
- The gene *CDKN1A*, which is involved in the G<sub>1</sub>/S checkpoint, was up-regulated up to 4-fold and up to 18-fold following photon and carbon ion irradiation in the monolayer cell culture, respectively.
- GADD45A, which is involved in G<sub>2</sub>/M arrest, was barely up-regulated after exposure to photons, whereas it was up-regulated 12-fold after carbon ion exposure in the monolayer cell culture.
- Exponentially growing cells were arrested in G<sub>2</sub>/M and in G<sub>1</sub> phases after exposure to photons. After carbon ion irradiation the arrest was more pronounced and longer-lasting, even in response to smaller physical doses.

- Gene expression data in the xenograft model differed from that of the monolayer cell culture model. After equivalent physical doses of photons, gene expression in the xenografts was partly higher than in the monolayer cells. Contrarily, gene expression was, to some extent, lower after carbon ion exposure in the xenografts compared to in monolayer cells.

This study demonstrates that three times more cells lost their ability to divide after exposure to carbon ions than after an equivalent physical dose of photons. The considerable respective induction and suppression of apoptosis-related genes emphasizes the more distinct activation of the apoptosis pathway after carbon ion irradiation. Additionally, apoptosis induction detected by the Annexin V assay was higher in carbon ion-exposed cells, despite being low for both treatments. The higher RBE for cell survival following carbon ion irradiation can be partly explained by differences in apoptosis induction.

The marked and longer lasting cell cycle arrest and the more distinct induction of cell cycle inhibitors after exposure to carbon ions are most likely due to the more complex damage after High-LET radiation, as the cells need more time for repair. Apoptosis detection revealed that the repair capacity of the cells was exceeded more often after carbon ion irradiation.

The different gene expression results in the xenograft model support the important role of the tumor microenvironment for the response to radiation *in vivo*. Further studies are needed to explore the types of influences that operate during the response to High-LET radiation *in vivo*. For future studies, it would be interesting to analyze other genes that are involved in apoptosis and cell cycle arrest pathways after carbon ion irradiation and, accordingly protein expression changes.

---

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen ich an dieser Stelle herzlich danke.

### **Vorklinischer Studienabschnitt:**

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Grundmann, Hasilik, Kern, Koolman, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Löffler, Mandrek, Mueller, Neumüller, Rausch, Röhm, Röper, Seifert, Seitz, Suske, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

### **Klinischer Studienabschnitt:**

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Bals, Barth, Baum, Bauer, Baumann, Becker, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Christiansen, Czubayko, Dominguez, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Grzeschik, Grimm, Gudermann, Happle, Hellwig, Herrmann-Lingen, Hertl, Herzum, Höffken, Hofman, Hörle, Hoyer, Jungclas, Kann, Kill, Kircher, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, König, Kolb-Niemann, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Loff, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Sesterhenn, Sommer, Stief, Strauch, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf, Yu, Zemlin

## Danksagung

Mein Dank geht an erster Stelle an Frau Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic für die Überlassung des Themas, die konstruktive Kritik und für die Möglichkeit der Nutzung der Einrichtung.

Frau Dr. Andrea Arenz danke ich für die Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit. Ich bin ihr vor allem für die Unterstützung beim Durchführen der Experimente und für ihre Begeisterungsfähigkeit dankbar.

Frau Dr. Florentine Subtil aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Marburg danke ich vielmals für die Bereitstellung der Proben aus dem A549-Tumormodell.

Mein Dank geht an das GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt für die Ermöglichung der Kohlenstoffionenbestrahlungen. Herrn Dr. Michael Scholz danke ich für die Durchführung der Dosimetrie.

Herrn Dr. Hans-Otto Neidel und dem gesamten Team der medizinischen Physik der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Marburg danke ich für die Ermöglichung der Photonexperimente.

Frau Dr. Andrea Wittig aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie danke ich für die Korrektur dieser Arbeit.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Flow Cytometry Core Facility am Universitätsklinikum Marburg für die Möglichkeit der Nutzung des Durchflusszytometers.

Ich möchte an dieser Stelle vor allem meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und die Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meinem Freund Steffen danke ich für seinen Rückhalt.