

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom - Biologin

Christin Glowa

aus Chemnitz

Tag der mündlichen Prüfung:

***In vivo* Untersuchungen zur Wirksamkeit von
Bestrahlungen mit Kohlenstoffionen am syngenem
Prostatakarzinom Modell R3327**

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Trumpp

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Debus

Für meine Familie

Veröffentlichungen dieser Arbeit

Glowa C, Peschke P, Karger CP, Hahn EW, Huber PE, Debus J, Ehemann V

“Flow cytometric characterization of tumor subpopulations in three sublines of the Dunning R3327 rat prostate tumor model”

The Prostate 2013 Epub: 16.07.2013; DOI 10.1002/pros.22710

Präsentationen und veröffentlichte Posterpräsentationen von Teilergebnissen dieser Arbeit

Glowa C, Peschke P, Scholz M, Huber P, Debus J, Karger CP

„Response of three experimental prostate tumor sublines to photons and carbon ions: A preliminary study”

20. Symposium für experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie 2011, Dresden (Posterpräsentation)

Glowa C, Peschke P, Scholz M, Huber P, Debus J, Karger CP

„Preliminary *in vivo* data of three experimental prostate tumor sublines to photons and carbon ions”

14th International Congress of Radiation Research, 2011, Warschau, Polen (Posterpräsentation)

Glowa C, Peschke P, Scholz M, Huber P, Debus JP, Karger CP

„Differences in the *in vivo* response of three experimental prostate tumor sublines to photons and carbon ion treatment: ongoing studies”

21. Symposium für experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie 2012, Hamburg (Vortrag, Reisestipendium)

Glowa C, Peschke P, Scholz M, Huber P, Debus JP, Karger CP

„Differences in the response of three experimental prostate tumor sublines to photons and carbon ions: A preliminary *in vivo* study”

ESTRO 31, 2012 (Posterpräsentation, 1. Posterpreis Young Scientists)

Glowa C, Peschke P, Scholz M, Huber P, Debus JP, Karger CP

„Differential structural and functional response of three syngeneic rat prostate tumors to photons and carbon ion irradiation”

13th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology / Oncology 2013, Ermatingen, Schweiz (Posterpräsentation)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	IX
Summary	X
1. Einleitung	1
1.1 Radiotherapie bei Prostatatumoren	1
1.2 Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (^{12}C)	2
1.3 Wirkung von Kohlenstoffionen in Tumoren	4
Zielsetzung	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Narkose und allgemeine Tierhaltungsbedingungen	7
2.2 Das syngene Prostata-Adenokarzinom R3327	7
2.3 Transplantation von Dunning R3327-Tumoren	7
2.4 Ablauf der Bestrahlungsexperimente	8
2.4.1 Photonenbestrahlung	9
2.4.2 Kohlenstoffionenbestrahlung	9
2.5 Nachbeobachtung bestrahlter Tumore (Follow-Up)	10
2.6 Endpunkte	10
2.7 Durchgeführte Bestrahlungsexperimente	11
2.8 Quantifizierung der Strahlenreaktion	12
2.8.1 Wachstumskurven	12
2.8.2 Dosis-Wirkungskurven	13
2.8.3 Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)	13
2.8.4 Fraktionierungsverhalten	14
2.9 Längsschnittexperimente für funktionelle und strukturelle Untersuchungen	15
2.9.1 Blutflussveränderungen nach Photonen- und ^{12}C - RT mittels Ultraschalluntersuchungen	15
2.9.2 Bestimmung von Blutfluss und Perfusion mittels Magnetresonanztomographie (MRT)	16
2.9.3 <i>In vivo</i> Applikation von BrdU und anschließende Tumorpräparation	18
2.9.3.1 Histologische Weiterverarbeitung von Kryopräparaten	19
2.9.3.2 Histologische Weiterverarbeitung von Paraformaldehyd- fixierten Geweben	19
2.9.3.3 Gewebeaufarbeitung für RNA-Analysen	20
2.9.4 Mikroskopische Färbungen	20

2.9.4.1	Morphologische Untersuchungen (Hämatoxylin / Eosin)	20
2.9.4.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	21
2.9.4.3	Proliferationsnachweis mittels BrdU	22
2.9.4.4	Spezifische Färbung der Gefäßstrukturen	23
	CD31 (Endothelzellen) und smooth muscle actin (Perizyten)	23
	Kollagen IV	23
2.9.4.5	Nachweis von DNA- Doppelstrangbrüchen mittels γ H2AX	24
2.9.4.6	Detektion selektiver Oberflächenmarker	24
2.9.5	Molekularbiologische Methoden	25
2.9.5.1	RNA-Extraktion aus soliden Tumoren	25
2.9.5.2	Genexpressionsanalysen	26
2.10	Charakterisierung von Tumorsubpopulationen	28
2.10.1	Durchflusszytometrische Analysen	28
2.10.1.1	Zellpräparation aus soliden Tumoren	28
2.10.1.2	Zellzyklusbestimmung mit DAPI	28
2.10.1.3	Antikörperfärbungen in soliden Tumoren (CD24, CD44, CD133, CD326, ZK 5 / 8, ZK 19)	29
2.10.2	Zellkulturbedingungen	30
2.10.2.1	Kryokonservierung von Zelllinien	30
2.11	Tumorinduktionsanalyse mittels Limiting Dilution Assay (LDA)	30
2.11.1	Anreicherung von CD24 ⁺ - Zellen mittels MACS	31
2.11.2	Zellsortierung aus soliden Tumoren mit dem FACS	31
2.11.3	Etablierung von Tumorzelllinien <i>in vitro</i>	32
2.11.4	Etablierung von Tumorzelllinien <i>in vivo</i>	32
2.11.5	Limiting Dilution Assay (LDA)	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Wachstumskurven	33
3.1.1	R3327-H Tumore	33
3.1.2	R3327-HI Tumore	35
3.2	Dosis-Wirkungskurven	38
3.2.1	Einzeitbestrahlungen (1 Fx)	38
3.2.2	Zweifachbestrahlungen (2 Fx)	40
3.3	Relative biologische Wirksamkeit (RBW) von Kohlenstoffionen	42
3.4	Fraktionierungsverhalten	43
3.5	Mechanistische Untersuchungen	44
3.5.1	Bestimmung des Blutflusses mittels Ultraschall	44
3.5.2	Untersuchung der Perfusion mittels MRT	47

3.5.3	Strukturelle und funktionelle Untersuchungen auf histologischer Ebene	52
3.5.3.1	Strukturelle Veränderungen: Tumormorphologie	52
3.5.3.2	Strukturelle Veränderungen: Gefäßmorphologie	56
3.5.3.3	Funktionelle Veränderungen: Proliferation (BrdU- Inkorporation)	65
3.5.3.4	Funktionelle Veränderungen: Induktion von DNA- Doppelstrangbrüchen	68
3.5.3.5	Genexpressionsanalysen	70
3.6	Charakterisierung von Tumorsubpopulationen	77
3.6.1	Analyse der drei Tumorsublinien (H, HI, AT1)	77
3.6.2	Untersuchung verschiedener Subpopulationen mittels FACS- Analyse	77
3.6.3	Mikroskopische Untersuchung verschiedener Subpopulationen	82
3.6.4	Etablierung von Tumorsublinien <i>in vitro</i>	84
3.6.5	Bestimmung der Tumorinduktionsraten (LDA)	87
3.6.6	Einfluss der Bestrahlung auf die CD24- Expression in HI-Tumoren	90
4.	Diskussion	93
4.1	Dosis-Wirkung und RBW	93
4.2	Wachstumsverhalten und Rezidivbildung	96
4.3	Fraktionierungsverhalten	96
4.4	Mechanistische Untersuchungen zur Strahlenwirkung von Photonen- und ¹² C- RT	97
4.4.1	Vaskuläre Effekte	97
4.4.2	Funktionelle Untersuchungen	98
4.4.3	Histologische Untersuchungen	100
4.4.4	Genexpressionsanalysen	102
4.5	Charakterisierung von Tumor- induzierenden Zellen	106
4.5.1	Tumorsubpopulationen	107
4.5.2	Zellkulturetablierung	108
4.5.3	LDA	109
4.6	Der Einfluss von Bestrahlung auf die CD24- Expression in HI-Tumoren	111
5.	Ausblick	113
6.	Literaturverzeichnis	114
	Anhang	141
	Danksagung	147
	Erklärung	148

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹² C	Kohlenstoffionen
µl	Mikroliter
%	Prozent
x g	x-fache Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
Ak	Antikörper
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COP- Ratten	Copenhagen - Ratten
cRNA	Komplementäre RNA
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCE-MRT	<i>DCE-MRI, dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging</i> , dynamisch Kontrast-verstärkte Magnetresonanztomographie
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle Serum</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA- Doppelstrangbruch
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DWK	Dosis-Wirkungskurve
DWKs	Dosis-Wirkungskurven
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> , und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fx	Fraktion / Fraktionen
g	Gramm
Gy	Gray, Einheit der physikalischen Größe Energiedosis
h	Stunde(n)
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum
IgG	Immunglobulin G
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
kDa	Kilodalton
LDA	<i>Limiting Dilution Assay</i> (Tumorinduktionsanalyse)
LEM	<i>local effect model</i>

LET	Linearer Energietransfer [keV/ μm]
MACS	Magnetische Anreicherung von Zellen über <i>Mikrobeads</i>
μ	micro
m	milli
M	Molar
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
n.d.	nicht detektierbar
OER	<i>Oxygen Enhancement Ratio</i> , Sauerstoffverstärkungseffekt
PBS	sterile Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	<i>propidium iodide</i> , Propidiumjodid
PMMA	Polymethylmethacrylat
Raumtemp.	Raumtemperatur
RBW	relative biologische Wirksamkeit
RBWs	relative biologische Wirksamkeiten
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i> , interessierende Region
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640-Medium	am <i>Roswell Park Memorial Institute</i> Basiszellkulturmedium
RT	Radiotherapie, Bestrahlung
s	Sekunden
s.c.	<i>subcutan</i> , subkutan
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SMA	<i>smooth muscle actin</i> , glattmuskuläres Aktin
SOBP	<i>Spread-out Bragg-Peak</i> , aufgeweiteter Bragg-Peak
TCR	T-Zell Rezeptor
TIC	<i>tumor inducing cell</i> , Tumor- induzierende Zelle
TICS	<i>tumor inducing cells</i> , Tumor- induzierende Zellen
TGF β	<i>Transforming-Growth-Factor-β</i> , transformierender Wachstumsfaktor- β
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
v.a.	vor allem
VDT	<i>volume doubling time</i> , Volumenverdopplungszeit
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zytokeratin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Tiefendosisprofil für Kohlenstoffionen.....	2
Abb. 2:	Immobilisation der Tiere auf einer speziell angefertigten Apparatur.....	8
Abb. 3:	Bestimmung der RBW mittels Dosis-Wirkungskurven.	14
Abb. 4:	Durchführungsschema der Längsschnittexperimente für mechanistische Untersuchungen	15
Abb. 5:	Positionierung des Tieres während der Ultraschalluntersuchungen.....	16
Abb. 6:	Repräsentative Wachstumskurven des H-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx Photonen in Abhängigkeit von der Zeit.....	33
Abb. 7:	Repräsentative Wachstumskurven des H-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx ^{12}C - Ionen in Abhängigkeit von der Zeit.....	34
Abb. 8:	Zeitpunkt der Rezidive des H-Tumors in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis... ..	35
Abb. 9:	Repräsentative Wachstumskurven des HI-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx Photonen in Abhängigkeit von der Zeit.....	36
Abb. 10:	Repräsentative Wachstumskurven des HI-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx ^{12}C - Ionen in Abhängigkeit von der Zeit.....	37
Abb. 11:	Zeitpunkt der Rezidive des HI-Tumors in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	37
Abb. 12:	Dosis-Wirkungskurven nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C von H- (oben), HI- (Mitte) und AT1-Tumor (unten).....	39
Abb. 13:	Dosis-Wirkungskurven nach 2 Fx Photonen oder ^{12}C von H- (oben), HI- (Mitte) und AT1-Tumor (unten).....	41
Abb. 14:	Repräsentative Bilder des Doppler-Ultraschalls aus einer Tumormittelschicht.....	44
Abb. 15:	Blutflussvolumenänderungen des H-Tumors in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	45
Abb. 16:	Blutflussvolumenänderungen des HI-Tumors in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	46
Abb. 17:	T2- gewichtete MR-Bilder des AT1-Tumors vor Kontrastmittelzugabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	48
Abb. 18:	T1- gewichtete MR-Bilder des AT1-Tumors nach Kontrastmittelzugabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	49
Abb. 19:	Dynamisch Kontrast- verstärkte MRT (DCE-MRT) des AT1-Tumors nach Kontrastmittelgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	50
Abb. 20:	Parameterkarte A einer DCE-MRT des AT1-Tumors nach Kontrastmittelgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	51
Abb. 21:	Bestimmung des Parameters A einer DCE-MRT des AT1-Tumors nach Kontrastmittelgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	52
Abb. 22:	Strukturelle Veränderung in Tumoren der Sublinie H zu verschiedenen Zeitpunkten nach 1 Fx Photonen- und ^{12}C - Bestrahlung	54
Abb. 23:	Strukturelle Veränderung in Tumoren der Sublinie HI zu verschiedenen Zeitpunkten nach 1 Fx Photonen- und ^{12}C - Bestrahlung	55
Abb. 24:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CD31/SMA doppelgefärbten H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C	57

Abb. 25: Quantifizierung von CD31 ⁺ - (A) und SMA ⁺ -Zellen (B) in H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C.....	58
Abb. 26: Bestimmung der Gefäßdichte (A) und des Gefäßdurchmessers (B) in H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C	59
Abb. 27: Quantifizierung von CD31 ⁺ - (A) und SMA ⁺ -Zellen (B) in HI-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C.....	60
Abb. 28: Bestimmung der Gefäßdichte (A) und des Gefäßdurchmessers (B) in HI-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C	61
Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CD31/SMA-doppelgefärbten AT1-Tumoren 21 d nach 1 Fx Photonen oder ¹² C	62
Abb. 30: Ermittelter Anteil an CD31 ⁺ (links) und SMA ⁺ (rechts) - Zellen in AT1-Tumoren 21 d nach 1 Fx Bestrahlung.....	63
Abb. 31: Bestimmung der Gefäßdichte (links) und des Gefäßdurchmessers (rechts) in AT1-Tumoren 21 d nach 1 Fx Bestrahlung.....	64
Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Kollagen IV gefärbten HI-Tumoren nach 37 Gy ¹² C.....	64
Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BrdU- gefärbten H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C.....	66
Abb. 34: Quantifizierung von BrdU ⁺ - Zellen in H- Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C ..	67
Abb. 35: Quantifizierung von BrdU ⁺ - Zellen in HI- Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C .	67
Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von γH2AX gefärbten H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C.....	68
Abb. 37: Quantifizierung von γH2AX ⁺ - Zellen in H- (links) und HI- Tumoren (rechts) nach 1 Fx Photonen oder ¹² C.....	69
Abb. 38: Heatmap der Genexpressionsanalyse von unbehandelten HI- und H-Tumoren ...	72
Abb. 39: Heatmap der Genexpressionsanalyse von 1 Fx Photonen oder ¹² C- bestrahlten HI-Tumoren im Zeitverlauf.....	75
Abb. 40: DNA- Indices und Zellzyklusverteilung für eine Prostata aus der Ratte (A), R3327-H (B), -HI (C) und -AT1 (D) Tumore	79
Abb. 41: Multiparametrische Analyse des differenzierten Dunning R3327-H Tumors markiert mit CD326-FITC, CD133-PE und DAPI	80
Abb. 42: Multiparametrische Analyse des differenzierten Dunning R3327-HI Tumors markiert mit CD326-FITC, CD133-PE und DAPI.	81
Abb. 43: Multiparametrische Analyse des differenzierten Dunning R3327-AT1 Tumors markiert mit CD326-FITC, CD133-PE und DAPI.....	82
Abb. 44: Immunfluoreszenzdarstellung von Zytokeratinen und Oberflächenmarkern in den drei Sublinien des Dunning R3327 Prostatakrebsmodells	83
Abb. 45: Lichtmikroskopische Aufnahme von AT1-, H- und HI-Zellen in vitro	85
Abb. 46: HE-Färbung eines unbehandelten Donor HI-Tumors und des in vivo gewachsenen CD24 ⁺ /CD45 ⁻ sortierten HI-Tumors	90
Abb. 47: Zeitliche Dynamik der CD24- Expression in HI-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹² C.....	91
Abb. 48: Quantifizierung von CD24 ⁺ - Zellen des HI-Tumors nach 1 Fx Photonen oder ¹² C 92	

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Dosisgruppen und Tieranzahl für die Bestrahlungsexperimente zur Bestimmung von Dosis-Wirkungskurven von Photonen und Kohlenstoffionen (^{12}C).....	11
Tab. 2:	Dosisgruppen bestrahlter H- und HI-Tumore für die Ultraschalluntersuchungen...	16
Tab. 3:	Bestrahlungsdosen für die MRT-Studie von AT1- Tumoren.....	16
Tab. 4:	Standard Hämatoxylin / Eosin- Färbeprotokoll.....	21
Tab. 5:	Standard- Immunfluoreszenzfärbeprotokoll für Methanol / Aceton- fixierte Kryoschnitte	22
Tab. 6:	Übersicht der TCD_{50} -Werte und zugehörige RBW-Werte von H-, HI- und AT1-Tumoren mit 1 Fx oder 2 Fx Photonen- und ^{12}C - RT	42
Tab. 7:	Zellzyklusanalyse und DNA- Indices von Prostatagewebe und Prostatakrebssublinien	78
Tab. 8:	Einzelparameter FACS- Analyse von Oberflächenmarkern und Zytokeratinen	79
Tab. 9:	Multiparametrische FACS- Analyse von Oberflächenmarkern	80
Tab. 10:	Einfluss der Gewebefixierung auf die Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern.....	83
Tab. 11:	Zellkultur-Etablierungsansätze für die drei PCa-Tumorlinien AT1, HI, H.....	84
Tab. 12:	FACS- Analyse der drei Tumorsublinien vor und nach erfolgter CD24 MACS-Anreicherung.....	85
Tab. 13:	FACS- SORT von $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ - Zellen zur Bestimmung der Tumorinduktionsraten für den AT1 und H-Tumor.....	87
Tab. 14:	FACS- SORT von $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ - Zellen zur Bestimmung der Tumorinduktionsraten für den HI-Tumor	88
Tab. 15:	Analyse des HI-Tumors vor und nach erfolgter $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ - FACS- Sortierung	89
Tab. 16:	Übersicht über die Gene aus der Genexpressionsanalyse und deren Funktion ...	141

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der differentiellen Wirkung von Kohlenstoffionen (^{12}C) gegenüber einer Photonenbestrahlung *in vivo* anhand von drei verschiedenen Sublinien des syngenesischen Prostata-Adenokarzinoms (PCa) R3327 (AT1, HI und H) der Ratte sowie die Identifizierung Tumor-assoziiierter Einflussfaktoren auf die Strahlenreaktion.

Subkutane PCa-Tumore in Ratten wurden mit Photonen bzw. ^{12}C -Ionen (75 keV/ μm) unter Verwendung aufsteigender Einzel- (1 Fx) bzw. Zweifachdosen (2 Fx) bestrahlt. Primärer Endpunkt war die lokale Tumorkontrolle nach 300 Tagen. Basierend auf Dosis-Wirkungskurven (DWKs) wurde mittels TCD_{50} (Dosis für 50% Tumorkontrollwahrscheinlichkeit) die relative biologische Wirksamkeit (RBW) von ^{12}C -Ionen berechnet. Zusätzlich wurden Untersuchungen durchgeführt, um mögliche Kohlenstoffionen-spezifische Mechanismen der Strahlenreaktion zu identifizieren. Hierzu wurden *in vivo* tumor-physiologische Veränderungen, strukturelle und funktionelle Bestrahlungseffekte auf histologischer Ebene, strahlenbedingte Einflüsse auf die Genexpression sowie Tumorsubpopulationen mit tumor-induzierenden Eigenschaften untersucht.

Für ^{12}C -Bestrahlungen mit 1 Fx bzw. 2 Fx ergab sich eine RBW von 1,62 (H), 2,08 (HI) und 2,3 (AT1) bzw. 1,9 (H), 2,1 (HI) und 2,67 (AT1). Bestrahlungen mit isoeffektiven Dosen zeigten für Photonen und ^{12}C -Ionen unterschiedliche Kinetiken der strahleninduzierten Effekte. Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und Histologie wurde im Vergleich zu Photonen eine schnellere und stärkere Gefäßpermeabilisierung durch ^{12}C -RT festgestellt. Nach Bestrahlung wurden DNA-Reparaturmechanismen, Immunsystemkomponenten und Migration induziert, dagegen die Zellzyklusprogression, Adhäsion, Angiogenese und der aerobe Stoffwechsel reprimiert. Insbesondere die zeitliche Induktion von Signalkaskaden, Apoptose und Stressantworten zeigte sich abhängig von der Strahlmodalität. In den HI- und H-Sublinien wurden $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ Zellen als tumor-induzierende Zellen (TICs) *in vivo* identifiziert und alle drei Sublinien *in vitro* durch Zellkulturetablierung weiteren molekulargenetischen Analysen zugänglich gemacht.

Schlussfolgernd ergibt sich, dass ^{12}C -RT besonders für undifferenzierte Tumore geeignet ist, da die RBW für den radioresistenten, anaplastischen AT1-Tumor am höchsten war und sich mit zunehmender Differenzierung verringerte. Ursache hierfür ist, dass die TCD_{50} -Werte für ^{12}C -Ionen weniger abhängig vom Differenzierungsstatus sind, als bei Photonen-RT. ^{12}C -Ionen inaktivieren Tumorzellen und Normalgewebsanteile sowie Gefäßstrukturen schneller und effektiver als Photonen. Die strahleninduzierte Genregulation nach Photonen- und ^{12}C -RT betrifft ähnliche Funktionen, aber der zeitliche Verlauf variiert besonders in DNA-Reparaturmechanismen und Signalwegen des Zellüberlebens. Da $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ -Zellen in H- und HI-Tumoren als TICs identifiziert wurden, impliziert der unterschiedliche Einfluss von ^{12}C - und Photonen-RT auf die CD24-Expression einen ersten Hinweis auf differenzielle Effekte der beiden Strahlmodalitäten auf putative Prostatakrebstammzellen.

Summary

The aim of this study is to characterize differential effects after carbon ion (^{12}C) relative to photon irradiations *in vivo* in three different sublines of the syngeneic rat prostate adenocarcinoma (PCa) R3327 (AT1, HI, and H) as well as to identify tumor specific influence factors of the radiation response.

Subcutaneous PCa tumor fragments in rats were irradiated with single (1 Fx) or split (2 Fx) doses of photons or carbon ions (75 keV/ μm), respectively. Primary endpoint was local tumor control after 300 days. Based on dose-response curves, the TCD_{50^-} values (dose at 50% tumor control probability) were used to calculate the relative biological effectiveness (RBE) of carbon ions. Additionally, potential carbon ion specific irradiation effects were studied. For this, *in vivo* tumor-physiological changes, structural and functional radiation-induced effects of gene expression as well as tumor subpopulations with tumor-inducing properties were investigated.

For ^{12}C -irradiations with 1 Fx or 2 Fx, the RBEs were 1.62 (H), 2.08 (HI) and 2.3 (AT1) and 1.9 (H), 2.1 (HI) and 2.67 (AT1), respectively. Isoeffective irradiation with photons and ^{12}C -ions showed different kinetics of the radiation response. Magnetic resonance imaging (MRI) and histology showed a faster and stronger increase of tumor vessel permeability after ^{12}C -irradiation compared to photons. After irradiation, DNA-repair mechanisms, immune system components and migration were induced, in contrast cell cycle progression, adhesion, angiogenesis, and the aerobic metabolism were downregulated. Especially, the kinetics of signaling cascades, apoptosis and stress-response were dependent on irradiation modality. In HI- and H-tumors $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ cells were identified as tumor inducing cells (TICs) *in vivo*. All three sublines were established under cell culture conditions to enable further molecular biological analyses.

In conclusion, ^{12}C -irradiation is especially effective for undifferentiated tumors, as the highest RBE was found for the radioresistant anaplastic AT1-tumor which decreased with increasing differentiation level. This is caused by the fact that TCD_{50^-} values for carbon ions are less dependent on differentiation level as compared to photons. Carbon ions inactivated tumor cells and normal tissue as well as vessel structures faster and more effectively than photons. Radiation induced gene regulation affects similar functions for both radiation modalities, however, temporal characteristics vary, especially for the induction of DNA-repair mechanisms and survival signaling cascades. As $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ cells in H- and HI-tumors were identified as TICs, the distinct effect of photon- and ^{12}C -irradiation on $\text{CD}24$ -expression suggests a possible beam quality dependent differential impact on putative prostate cancer stem cells.

1. Einleitung

1.1 Radiotherapie bei Prostatatumoren

Prostatakrebs ist bei Männern mit 22% europaweit die häufigste Krebserkrankung, allein in Deutschland gibt es jährlich 71.000 Neuerkrankungen [1]. Insbesondere in industriell entwickelten Ländern wie Deutschland oder den USA ist die Inzidenzrate mit über 82 pro 100.000 Männer deutlich höher als weltweit (28/ 100.000 Männer). Ursache hierfür ist v.a. das verstärkte PSA- Screening in Deutschland gegenüber Entwicklungsländern, weshalb zwar die Inzidenzraten, aber nicht die Mortalitätsraten stark variieren. Lediglich 6,5% weltweit bzw. 10,5% deutschlandweit aller Krebserkrankten sterben an einem Prostatakarzinom. Die 5-Jahres-Prävalenz liegt in Deutschland bei 37,9%. Als 5- Jahres- Prävalenz wird dabei die Zahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt (hier 31.12.2008) lebenden Personen, die innerhalb der letzten 5 Jahre (d.h. zwischen 2004 und 2008) neu an Prostatakrebs erkrankt sind, bezeichnet [2].

Die Behandlungsmöglichkeiten von Prostatakrebs bestehen, abhängig vom Erkrankungsstadium, aus Radiotherapie (RT), Operation, Hormontherapie und Chemotherapie oder einer Kombination dieser [3,4]. Aggressive Formen des Prostatakarzinoms bilden v.a. Knochenmetastasen und zeichnen sich durch eine Verschiebung von einer Androgen-Abhängigkeit zu einer Androgen-Unabhängigkeit aus [5]. Deshalb kann bei aggressiven Formen meist keine anti-hormonelle Therapie eingesetzt werden [4].

Der Vergleich zwischen verschiedenen Patienten als auch innerhalb ein und desselben Tumors zeigt, dass das Prostatakarzinom (PCa) ein sehr heterogenes System ist. Zur Diagnose wird daher auch die morphologische Charakteristik der primär und der am zweithäufigsten vorherrschenden Zellpopulation des Prostatakarzinoms genutzt. Dieser diagnostische Wert wird als *Gleason Score* bezeichnet. Darüber hinaus ist die Expression verschiedener Differenzierungsmarker (z.B. Androgenrezeptor [AR], Prostata-spezifisches Antigen [PSA], Prostata-spezifisches Membranantigen [PSMA], Zytokeratine...) innerhalb eines Tumors sehr heterogen [3]. Diese Heterogenität kann zum Einen darauf zurückgeführt werden, dass mit luminalen, basalen und neuroendokrinen Prostatazellen bereits eine hohe intrinsische Variabilität vorliegt. Andererseits entsteht zusätzlich zur genetischen Variabilität der Prostatakrebszellen aufgrund des Zusammenspiels mit dem Mikromilieu auch noch eine phänotypische Variabilität [5,6].

PCa- Patienten werden in Niedrig-, Mittel- und Hochrisiko- Gruppen eingeteilt [7]. Nach den Leitlinien [8] werden alle Patienten mit einem Tumor $\geq T3c$ (TNM- Klassifikation [9]) oder Gleason Score zwischen 8-10 oder einem PSA-Wert > 20 ng/ ml in die Hochrisiko- Gruppe eingestuft. Bei einem erheblichen Teil dieser Patienten wird die Prostata operativ entfernt und / oder mit externer Photonen- Bestrahlung therapiert [7]. Die interne Bestrahlung durch Implantation von sogenannten *seeds* (verkapselte Strahlungsquellen, Brachytherapie) wird meist nur bei langsam wachsenden Tumoren durchgeführt.

1.2 Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (^{12}C)

Eine Alternative zur konventionellen Strahlentherapie mit Photonen [10] stellt die Bestrahlung mit Ionen dar. Ionen weisen im Vergleich zu Photonen eine durch ihre Energie festgelegte Reichweite, verbunden mit einem „invertiertem Tiefendosisprofil“, auf (Abb. 1).

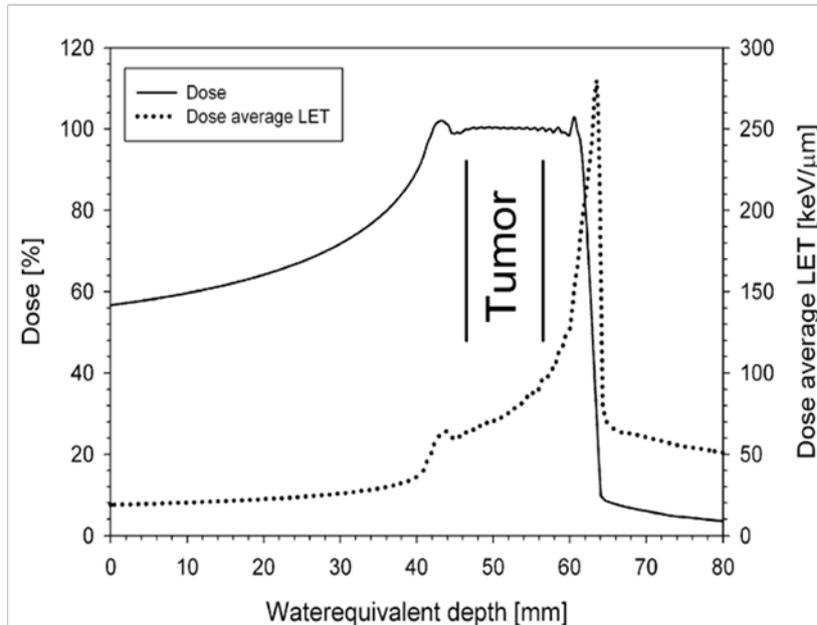


Abb. 1: Tiefendosisprofil für Kohlenstoffionen [11]. Die Position des Tumors im *spread-out Bragg-peak*, SOBP) ist eingezeichnet. Es wird als *inverses Tiefendosisprofil* bezeichnet, da die Dosis mit zunehmender Eindringtiefe zunimmt. Der LET nimmt zum Ende der Reichweite der Ionen stark zu.

Dieses Tiefendosisprofil zeigt für einen mono-energetischen Strahl eine geringe Dosis im Eingangsbereich (Plateau), die zum Ende der Reichweite stark ansteigt und nach dem sogenannten „Bragg-Peak“ wieder abfällt. Das gesamte Tiefendosisprofil wird auch als Bragg-Kurve bezeichnet. Durch Überlagerung von Ionen verschiedener Energien kann der Bragg-Peak aufgeweitet werden und man erhält einen sogenannten *spread-out Bragg-Peak* (SOBP), mit dem die Bestrahlung des Tumors dann durchgeführt wird. Durch Anpassung der longitudinalen und lateralen Ausdehnung des SOBPs können Tumore hochkonform unter optimaler Schonung des umliegenden Normalgewebes bestrahlt werden.

Bereits vor über 30 Jahren wurden die ersten PCa-Patienten in den USA mit Protonentherapie behandelt [12]. Die Bestrahlung mit Protonen ist eine Form der Ionentherapie mit niedrigem linearem Energietransfer (LET) und erlaubt eine geometrisch äußerst präzise Bestrahlung des Tumors bei gleichzeitiger sehr guter Schonung des umliegenden Normalgewebes. Der Parameter LET beschreibt hierbei wie viel Energie die Partikel pro Wergstrecke im Gewebe deponieren und wird in keV/ μm angegeben.

Neben Protonen werden in der Ionentherapie auch schwerere Ionen, wie z.B. Kohlenstoffionen ($^{12}\text{C}^{6+}$) eingesetzt. Kohlenstoffionen weisen ein vergleichbares Tiefendosisprofil wie Protonen auf. Im Unterschied zu Protonen steigt der LET allerdings von

sehr geringen Werten im Plateau zu stark erhöhten Werten am Ende der Reichweite an (**Abb. 1**). Dieser Anstieg des LETs führt bei gleicher Dosis (gemessen in Gray (Gy)) zu einer Verstärkung der biologischen Wirkung. Da der LET v.a. im SOBP ansteigt, findet die Wirkungsverstärkung v.a. im Tumor und weniger in den umliegenden Normalgeweben statt, so dass man eine Verbesserung des Tumoransprechens erwartet **[13]**.

Da die Wirkungsverstärkung neben physikalischen Parametern wie LET, Dosis oder Ionensorte auch von den genauen biologischen Eigenschaften des bestrahlten Tumor- und Normalgewebes abhängt, wird zur Berechnung der Wirkungsverstärkung ein biomathematisches Modell benötigt **[14,15]**. Ergebnis dieser Berechnung ist die sogenannte relative biologische Wirksamkeit (RBW) der Ionen in Relation zu einer konventionellen Photonenbestrahlung. Diese Modelle müssen in experimentellen und klinischen Studien validiert werden. Darüber hinaus ist der klinische Vorteil von Schwerionen gegenüber Photonen noch nachzuweisen. Wegen der starken Abhängigkeit von biologischen Faktoren, kann ein solcher Vorteil von der Kombination von Tumortyp, Stadium und Art des umliegenden Normalgewebes abhängen.

Schwerionenbestrahlungen wurden erstmals am Lawrence-Berkley-Laboratory (Kalifornien, USA) durchgeführt **[16]** und erfolgen seit 1994 in Japan **[17,18]** und seit 1997 auch in Deutschland **[19-21]**. In Deutschland wurden die ersten Schwerionenbestrahlungen zunächst am Helmholtz- Zentrum für Schwerionenforschung (GSI, Darmstadt) vorgenommen **[21]** und werden seit 2009 am Heidelberger Ionenstrahl- Therapiezentrum (HIT) fortgeführt **[19,20]**. Inzwischen wurden weitere Anlagen in Betrieb genommen (z.B. Pavia, Gunma, Kyoto) und einige weitere Anlagen befinden sich im Aufbau (Hyogo, Mailand **[22,23]**).

Klinische Studien in Japan und Deutschland haben bereits die Wirksamkeit und Sicherheit der ^{12}C - RT für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen **[19,24-27]**, besonders für Schädelbasistumore sind herausragende lokale Kontrollraten bei gleichzeitig geringer Toxizität publiziert worden **[20,28-30]**. Allerdings fehlt derzeit die Bestätigung, dass ^{12}C - RT der Protonentherapie überlegen ist **[13,27]**. Deshalb wurden bereits neue teilweise randomisierte klinische Studien initiiert **[31-37]**. In Japan wurden bereits klinische Studien für die Etablierung eines Fraktionierungsschemas mit ^{12}C - RT für Prostatatumore durchgeführt **[38]**.

Am HIT erfolgt die Berechnung der RBW mit Hilfe von Version I des „*Local Effect Models*“ (LEM I) **[14]**. Während dieses Modell in den letzten Jahren basierend auf experimentellen Daten weiterentwickelt wurde (LEM II- IV, **[39,40]**), wird in der klinischen Anwendung weiterhin die Version I eingesetzt. Obwohl bereits einige Studien zur Validierung des LEM durchgeführt wurden **[39,41-44]**, sind hier weitere Anstrengungen erforderlich. Dies erfordert neben der Auswertung klinischer Daten **[41]** insbesondere quantitative präklinische Untersuchungen am Tiermodell **[45]**.

1.3 Wirkung von Kohlenstoffionen in Tumoren

Generell kann ein therapeutischer Nutzen für den Patienten nur angenommen werden, wenn die RBW im Tumor höher ist als im Normalgewebe. Neben der Untersuchung der Strahlenwirkung in Normalgeweben [45-47] ist es daher sehr wichtig den Einfluss Tumor-assoziiertes Faktoren auf die RBW zu untersuchen.

Zurzeit liegen nur sehr wenige Daten zur RBW von Tumoren für ^{12}C - Ionen vor. In einer frühen Studie berechneten Tenforde *et al.* [48] RBW- Werte für Rhabdomyosarkome nach 12 und 80 keV/ μm ^{12}C - RT. Takahashi *et al.* [49] bestimmten eine RBW von 2,02 für Einzelbestrahlungen von 70 keV/ μm in einem murinen ESO-2 Ösophagustumor. Ein größerer Datensatz wurde von Koike *et al.* [50] für ein murines NFSa Fibrosarkom Modell, das mit bis zu 6 Fraktionen (Fx) bestrahlt wurde, publiziert. Die Autoren stellten eine starke LET- Abhängigkeit fest. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe die RBW des anaplastischen murinen Prostatatumors R3327-AT1 [51] bei 75 keV/ μm für 1, 2 und 6 Fx ^{12}C - RT publiziert [52]. Diese Daten zeigen ebenfalls eine starke Abhängigkeit der RBW vom LET sowie eine moderate Abhängigkeit von der Dosis pro Fraktion. Bei gleichem LET ergab sich eine ähnliche Dosisabhängigkeit wie bei Koike *et al.* Dennoch ist es schwierig diese Ergebnisse zu vergleichen, da verschiedene Tumorsysteme und unterschiedliche Endpunkte verwendet wurden. Die Identifikation des Einflusses tumorspezifischer Parameter auf die RBW ist daher schwierig.

Neben der klinisch- phänomenologischen Ebene zeigen sich die Unterschiede zwischen einer ^{12}C - und Photonen- RT auch auf einer mikroskopisch-mechanistischen Ebene. Bei allen Bestrahlungen beruht die Zerstörung der Tumorzellen hauptsächlich auf der Entstehung von DNA- Doppelstrangbrüchen, einerseits durch direkte Ionisation der DNA und andererseits durch Radikalbildung über die Ionisation von Wassermolekülen [53]. Bedingt durch die fokussierte Energiedeposition von hoch-LET Bestrahlung (z.B. ^{12}C) ist der entstandene DNA- Schaden komplexer, räumlich geclustert und schwieriger zu reparieren [54,55]. Dadurch verlangsamt sich die DNA- Reparatur und es kommt zu einer erhöhten Zellinaktivierung, welche weniger abhängig vom p53-Status, dem Zellzyklusstatus und der Oxygenierung ist, als bei Bestrahlung mit Photonen [56-59].

Darüber hinaus induziert Bestrahlung noch weitere sogenannte „nicht- zielgerichtete“ Effekte, wie z.B. Mutationen, Chromosomenaberrationen, Regulation der Genexpression, Immunreaktionen oder Bystander- Effekte [60]. Bisher wurden die immunregulatorischen Effekte nach hoch-LET Bestrahlung kaum untersucht. Es wird aber angenommen, dass die Regulierung von Immunkomponenten einen großen Einfluss auf die erhöhte Wirksamkeit von hoch-LET Bestrahlung hat. Die Regulation der Genexpression nach ^{12}C - RT ist äußerst komplex und kaum untersucht. Es konnte aber bereits ein Einfluss auf die Stressantwort und die Zell- Zellkommunikation [61,62] sowie eine Induktion des NF κ B- Signalweges nachgewiesen werden [63]. Außerdem ist im Falle von soliden Tumoren nicht nur die

Inaktivierung der Tumorzellen von großer Bedeutung, sondern auch die Neovaskularisierung nach Bestrahlung bzw. das Abtöten von Gefäßstrukturen [64,65].

Da die Tumorreaktion nach Bestrahlung auch von intrinsischen Tumor-spezifischen Eigenschaften bestimmt wird, ist eine Untersuchung der Abhängigkeit von ^{12}C -RT auf diese Faktoren von hoher Bedeutung. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das gut charakterisierte, spontan entstandene Dunning R3327 Prostatatumormodell für die Untersuchung von funktionellen und strukturellen Unterschieden nach Photonen- und ^{12}C -RT genutzt [66]. Dieses Prostatakarzinom besteht aus verschiedenen Sublinien, die von wenig malignen, stark differenzierten und Androgen-abhängigen langsam wachsenden Tumoren bis hin zu schnell proliferierenden, anaplastischen, stark malignen Tumoren reichen. Außerdem ergibt sich je nach Gefäßstruktur ein unterschiedlicher Hypoxie-Status sowie eine variable Neigung zur Metastasierung [67]. Damit decken die verschiedenen Sublinien das gesamte Spektrum an klinisch relevanten humanen Prostatakarzinomen ab. Neben der unmittelbaren Bedeutung dieser Untersuchungen für die Behandlung des humanen Prostatakarzinoms, kann das Tumorsystem auch ganz allgemein als Modell für die Untersuchung der Strahlenreaktion von Tumoren nach einer ^{12}C -RT herangezogen werden.

Alle bisher etablierten Prostatakrebszelllinien wurden aus Metastasen von stark fortgeschrittenen Prostatakrebspatienten isoliert und spiegeln aufgrund ihrer hohen Proliferation und ihrer Histologie nicht das breite Spektrum an Heterogenität wider [68,69].

Dagegen sind beim Dunning R3327 Modell alle Sublinien bereits intensiv genetisch, biochemisch und histologisch charakterisiert [66]. Darüber hinaus liegen für das System Erfahrungen für verschiedene radiotherapeutische und kombinierte Behandlungen vor [11,52,70]. Dabei zeigte sich unter anderem, dass Metastasierung und Rezidivbildung nach erfolgter Behandlung durch bestimmte bisher nicht näher definierte Subpopulationen, die die Therapie überleben, geprägt werden. Solche Subpopulationen könnten Stammzeleigenschaften, wie z.B. Selbsterneuerungskapazität, Tumor-induzierende Eigenschaften, keine oder sehr geringe Proliferation, erhöhte Reparaturkapazität [71] und hochregulierte Verteidigungsmechanismen [72] aufweisen. Allerdings ist bisher nicht klar, in welchem Ausmaß diese Eigenschaften den therapeutischen Nutzen einer Strahlentherapie beeinflussen.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der differentiellen Wirkung von Kohlenstoffionen gegenüber einer Photonenbestrahlung *in vivo* anhand von drei verschiedenen Sublinien des syngenesischen Prostatakarzinoms R3327 der Ratte sowie die Identifizierung von Tumor-assoziierten Einflussfaktoren auf die Strahlenreaktion. Dabei gliedert sich die Arbeit in zwei Teile.

Im ersten Teil sollten zunächst ergänzend zu den bereits vorliegenden Daten für die anaplastische Sublinie AT1 [11,52], zwei weitere differenzierte Sublinien (H und HI) des gleichen Prostatakarzinoms hinsichtlich ihrer Strahlentoleranz nach ^{12}C - und Photonen- RT untersucht werden. Ziel war es anhand von Dosis-Wirkungskurven klinisch relevante Parameter, wie die relative biologische Wirksamkeit (RBW) als Funktion der Dosis pro Fraktion für den Endpunkt lokale Tumorkontrolle nach 300 Tagen, zu bestimmen. Hierdurch kann die Abhängigkeit der RBW von tumorspezifischen Eigenschaften, wie Volumenverdopplungszeit und Differenzierungsstatus, beurteilt werden. Diese Informationen sind von hoher klinischer Relevanz, da sie Aufschluss darüber geben können, für welche Tumortypen und Differenzierungsstadien die ^{12}C - RT besonders aussichtsreich ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die zugrundeliegenden Mechanismen vergleichend für Photonen- und ^{12}C - RT genauer untersucht werden. Aufbauend auf den zuvor beschriebenen Studien liegt der Fokus auf den folgenden vier Themenbereichen:

- Tumorphysiologische Veränderungen *in vivo* mittels nicht-invasiver Techniken (Ultraschall und MRT)
- Strukturelle und funktionelle Bestrahlungseffekte auf histologischer Ebene (Proliferation, DNA-Reparatur, Gefäßveränderungen)
- Strahlenbedingte Einflüsse auf die Genexpression
- Identifikation von Tumorsubpopulationen mit Tumor-induzierenden Eigenschaften in unbehandelten Tumoren als Voraussetzung für eine spätere Untersuchung des differentiellen Effekts von Photonen- und ^{12}C - RT auf die Inaktivierung von Tumor-induzierenden Zellen (TICs) *in vivo*

Mit den durchgeführten Untersuchungen sollte die Strahlenreaktion der untersuchten Tumorsublinien für klinisch relevante Bedingungen charakterisiert und mögliche Wirkmechanismen aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Narkose und allgemeine Tierhaltungsbedingungen

Alle Tierversuche wurden im Zentralen Tierlabor (ZTL) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg) gemäß den nationalen Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Die aufgeführten Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (G 171/09, G 182/11, G 43/11).

Die Transplantation von Tumoren und alle weiteren chirurgischen Eingriffe, die *i.v.* Applikation von Substanzen sowie die MRT-Untersuchungen wurden mit 2% Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) Inhalationsnarkose und 2 l/ min Sauerstoff durchgeführt. Bei allen Bestrahlungen und bei den Ultraschalluntersuchungen wurden die Tiere mit einem Gemisch aus 2,5% Sevofluran (Abbott, Wiesbaden) und 2,4 l/ min Sauerstoff (Guttroff GmbH, Wertheim-Reicholzheim) narkotisiert. Die Tierhaltung erfolgte in klimatisierten Käfigen (IVC-Haltung) mit gesteuerter Lichtregulierung sowie Futter und Wasser *ad libitum*.

2.2 Das syngene Prostata-Adenokarzinom R3327

Aus einem 1961 spontan entstandenen Rattenprostata- Adenokarzinom (Dunning R3327) konnten mehrere Sublinien etabliert werden, die sich hinsichtlich Volumenverdopplungszeit (VDT), Metastasierungsneigung, Differenzierungsgrad sowie der hypoxischen Fraktion unterscheiden [67].

Drei dieser Tumorsublinien wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Tumore der Sublinie AT1 sind charakterisiert durch ein sehr schnelles Wachstum (VDT: 5 Tage), chronische Hypoxie, ein geringes Metastasierungspotenzial und einer undifferenzierten anaplastischen Morphologie. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der H-Sublinie um einen stark differenzierten, langsam wachsenden (VDT: 20 Tage), euoxischen und nicht metastasierenden Tumor. Der HI-Tumor ist zwischen dem H- und dem AT1-Tumor einzuordnen. HI-Tumore sind moderat differenziert mit muzinösen Prostatadrüsenbestandteilen, weisen ein mäßiges Wachstum (VDT: 10 Tage) und niedriges Metastasierungspotenzial auf. Außerdem kennzeichnet die HI-Sublinie eine akute Hypoxie, die durch äußere Bedingungen (z.B. Sauerstoffbeatmung des Tieres) beeinflussbar ist.

2.3 Transplantation von Dunning R3327-Tumoren

Für jedes Experiment wurde auf einen kryopreservierten Stock der Originaltumore zurückgegriffen. Dies bedeutet, dass die Spendertumore nur durch Weitertransplantation *in vivo* in Copenhagen- (COP) Ratten (Charles River USA, Wilmington, MA, USA) passagiert

wurden. Dabei wurde ein kryopreserviertes Tumorfsegment in RPMI-Medium (Biochrom, Berlin) aufgetaut und in der Flanke des Hinterbeines von männlichen COP-Ratten (180 g, 8 Wochen alt) subkutan transplantiert. Mit einer Schere (FST, Heidelberg) wurde eine kleine subkutane Tasche eröffnet und anschließend das Tumorfsegment mit einer Pinzette (FST, Heidelberg) tief in die Hauttasche gebracht. Der Schnitt wurde mit einer Wundklammer vom Typ MikRon® Autoclip® 9 mm (Clay Adams, Sparks, MD, USA) verschlossen. Die Wundklammer konnte nach 10 Tagen entfernt werden. Sobald in diesem Spendertier ein ausreichend großer Tumor (2-3 cm Durchmesser) gewachsen war, wurde dieser entfernt und in RPMI in ca. 2x2 mm große Tumorfsegmente zerteilt. Diese Spendertumorfsegmente wurden dann, wie oben beschrieben, auf die Experimentiere transplantiert, so dass alle Tumore eines Experiments aus demselben Spendertumor stammten. Als Kontrollen wurden scheinbehandelte, d.h. nicht bestrahlte, Tumoren verwendet.

Angepasst an die Wachstumsgeschwindigkeit der Sublinien wurde die Größe der Tumore einmal (H), zweimal (HI) oder dreimal (AT1) pro Woche mittels Messschieber oder Lochschablone gemessen. Wenn die Tumore die festgelegte Größe von 10 x 10 mm (2 orthogonale Radien) Durchmesser erreicht hatten, erfolgte die Bestrahlung.

2.4 Ablauf der Bestrahlungsexperimente

Die im Nachfolgenden beschriebenen Bestrahlungsexperimente wurden an einem klinischen Linearbeschleuniger (Siemens, Erlangen) am DKFZ und an der Kohlenstoffionenbestrahlungsanlage des Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT) durchgeführt. Im HIT wurde ein eigens dafür eingerichteter Experimentalplatz (QS Platz) genutzt. Bei Erreichen der festgelegten Behandlungsgröße wurden die tumortragenden Tiere auf einer speziell angefertigten Bestrahlungsapparatur einzeln immobilisiert (**Abb. 2**) und die Tumore mit Einzeldosen (1 Fx) oder Zweifachdosen (2 Fx) bestrahlt.

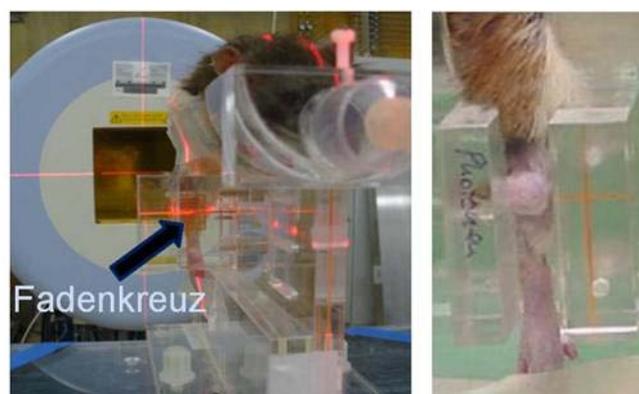


Abb. 2: Immobilisation der Tiere auf einer speziell angefertigten Apparatur. Der Tumor am Bein wird während der Bestrahlung mit Leukosilk™ fixiert. Die Tumorpositionierung erfolgt mit Hilfe des Fadenkreuzes, der auf der Apparatur aufgezeichneten Linien und der Raumlaser.

2.4.1 Photonenbestrahlung

Die Photonenbestrahlungen wurden mit einem 6 MV Linearbeschleuniger (Artiste, Siemens, Erlangen) durchgeführt. Dabei wurden die Ratten einzeln in einer speziell angefertigten Halterung gelagert und der Tumor relativ zu einem Fadenkreuz auf der Halterung fixiert (**Abb. 2**). Anschließend wurde der Tumor mit Hilfe dieses Fadenkreuzes und der Raumlaser im Isozentrum des Beschleunigers positioniert und die korrekte Lage des Tumors mittels Lichtfeld verifiziert. Direkt vor dem Tumor befand sich ein 15 mm- und direkt hinter dem Tumor ein 15 mm Polymethylmethacrylat- (PMMA) Bolus.

Mit Hilfe eines 12 mm Rundkollimators aus Wolfram wurde ein Feld mit 15 mm Durchmesser (90% Isodosis) erzeugt, welches den kompletten Tumor abdeckte. Die Felder wurden dosimetrisch mit Hilfe einer Pin Point-Ionisationskammer kalibriert (TM31009, PTW, Freiburg). Die Bestrahlung erfolgte mit einem horizontalen Strahl von hinten entlang der Körperlängsachse des Tieres und einer Dosisleistung von 300 Monitoreinheiten pro Minute (MU / min). Es wurden sowohl Einzeit- (1 Fx) als auch Zweifachbestrahlungen (2 Fx) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

2.4.2 Kohlenstoffionenbestrahlung

Die Kohlenstoffionenbestrahlung erfolgte am Experimentalplatz des HIT mit dem aktiven Raster-scanningverfahren [73]. Die Positionierung des Tumors erfolgte in gleicher Weise, wie bei den Photonenbestrahlungen (**Kapitel 2.4.1**). Da kein Lichtfeld zur Kontrolle der Positionierung zur Verfügung stand, wurde das Bestrahlungsfeld etwas größer als für die Photonenbestrahlung gewählt.

Für die Bestrahlung wurde ein physikalisch optimierter, homogen auf 20 mm aufgeweiteter Bragg-Peak (*Spread-out Bragg-Peak*, SOBP) mit einer lateralen Feldgröße von 18 x 18 mm² (90% Isodosis) verwendet. Der SOBP erstreckte sich von 41,5- 61,5 mm wasseräquivalenter Tiefe. Um den Tumor in der Mitte des SOBP zu positionieren, befand sich direkt vor dem Tumor ein 39,9 mm und direkt hinter dem Tumor ein 15 mm PMMA-Bolus. Daraus ergab sich, dass die ersten 5 mm des SOBPs im proximalen und die letzten 5 mm im distalen Bolus liegen. Der Dosis- gemittelte LET (*dose- averaged LET*) im Tumor betrug 75 keV / μm (64- 96 keV / μm). Die Bestrahlung erfolgte wie bei den Photonenbestrahlungen, von hinten entlang der Körperachse des Tieres.

Es fanden sowohl Einzeit- (1 Fx) als auch Zweifachbestrahlungen (2 Fx) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt.

2.5 Nachbeobachtung bestrahlter Tumore (Follow-Up)

Nach der Bestrahlung der heterotopen Prostatakarzinome wurden die Tumorgrößen zweimal wöchentlich mit Hilfe einer Messschablone bestimmt und das Volumen berechnet ([Kapitel 2.8.1](#)). Außerdem wurden Körpergewicht, Verhalten der Tiere und eventuell auftretende Nebenwirkungen wöchentlich dokumentiert. Bei Erreichen der maximal zulässigen Tumorgröße oder bei Anzeichen weiterer Erkrankungen der Tiere wurden diese unverzüglich euthanasiert. Getötete Tiere wurden eröffnet und das Auftreten von makroskopisch sichtbaren Tumoren/ Metastasen in Lunge, Intestinum und regionalen Lymphknoten bewertet.

2.6 Endpunkte

Als primärer Endpunkt für die Bestrahlungen des R3327 Prostatakarzinoms wurde die lokale Tumorkontrolle nach 300 Tagen Nachbeobachtungszeit definiert. Darunter versteht man Tiere, die zum Zeitpunkt 300 Tage nach Bestrahlung tumorfrei waren und keine Anzeichen eines Rezidivs aufwiesen.

Zur Bestimmung der Tumorkontrolle wurden Wachstumskurven (Tumolvolumen zu bestimmten Zeitpunkten nach Bestrahlung; siehe [Kapitel 2.8.1](#)) erstellt.

Für die zwei Sublinien AT1 und HI, die sich im Wachstumsverhalten nach Bestrahlung sehr ähnlich sind, wurde dieselbe Auswerte-Strategie zur Bestimmung der lokalen Kontrolle verwendet. Bei beiden Sublinien konnte zeitabhängig eine komplette Remission der Tumormasse beobachtet werden. Sobald durch Abtasten des Tieres ein Rezidiv an der Behandlungsstelle festgestellt werden konnte, wurde das entsprechende Tier als lokal nicht kontrolliert eingestuft.

Zusätzlich wurden für H- und HI-Tumore jeweils sekundäre Endpunkte verwendet. Da der HI-Tumor und insbesondere dessen Rezidive deutlich langsamer wachsen als der AT1-Tumor (Rezidive wurden 305 Tage nach RT beobachtet), wurde auch die lokale Kontrolle nach 320 Tagen Beobachtungszeit bestimmt, um die Robustheit des primären Endpunktes zu bestätigen. Für die H-Sublinie musste bereits der primäre Endpunkt angepasst werden, denn die Mehrheit der Tumore zeigte eine Dosis- abhängige Volumenverkleinerung bis zu einem bestimmten Restvolumen (fibrotischer Knoten), der bis zum Ende der Nachbeobachtungszeit konstant blieb. Diese Tumore wurden als lokal kontrolliert eingestuft. Die Charakterisierung dieser fibrotischen Knoten mündete in einem sekundären histologischen Endpunkt, definiert als Abwesenheit von proliferierenden Tumorzellen auf mikroskopischem Level.

Bei Tumoren, die eine Volumenzunahme zeigten, wurde diese über mehrere Wochen dokumentiert. Da die Wachstumsgeschwindigkeit des H-Tumors sehr langsam ist und sich auch das Rezidivwachstum über mehrere Monate hinziehen kann, wurde für die Auswertung das erste Auftreten des Rezidivs verwendet.

2.7 Durchgeführte Bestrahlungsexperimente

Für die Erstellung kompletter Dosis-Wirkungskurven (DWKs) von H- und HI-Tumoren wurden die in **Tab. 1** aufgeführten Bestrahlungsexperimente durchgeführt. Je nach Tumorsublinie wurden mindestens 5 Kontrolltiere verwendet. Diesen Tieren wurde ebenso ein Tumorfragment transplantiert. Jedoch wurde der entstandene Tumor nur scheinbehandelt, d.h., die Kontrolltiere wurden zur Bestrahlungsanlage transportiert, narkotisiert, aber nicht bestrahlt. Bei Erreichen der zulässigen Tumorgöße von > 25 mm wurden die Tiere getötet.

Tab. 1: Dosisgruppen und Tieranzahl für die Bestrahlungsexperimente zur Bestimmung von Dosis-Wirkungskurven von Photonen und Kohlenstoffionen (^{12}C). Es sind sowohl Einzelbestrahlungen (1 Fx) als auch Zweifachbestrahlungen (2 Fx) angegeben.

Experiment	Dosis in Gy (Anzahl an Tieren pro Dosispunkt)	Tierzahl
1 Faktion		
H-Tumor		
Photonen	30 (3), 34 (5), 37 (6), 40 (6), 43 (6), 46 (6), 50 (5), 54 (6), 58 (6), 62 (3)	52
^{12}C	18 (6), 21 (6), 24 (8 ^{*#}), 27 (7 ^{§1}), 30 (9 ^{##}), 33 (7 [‡])	43
HI-Tumor		
Photonen	45 (4), 50 (8), 55 (6), 60 (7 [‡]), 65 (7 [‡]), 70 (8 [~]), 75 (7 [‡])	47
^{12}C	17 (3), 21 (6), 25 (6), 29 (7 [#]), 33 (8 [‡]), 37 (6 [‡])	36
Kontrolltiere	8 unbestrahlte Tumore pro Experiment	32
2 Fraktionen		
H-Tumor		
Photonen	35 (5), 40 (5), 45 (5), 50 (6), 55 (5), 60 (5), 65 (5), 70 (5), 75 (5 ^{##}), 80 (3)	49
^{12}C	16 (5), 20 (5), 24 (5), 28 (5), 32 (5), 36 (5 [#]), 40 (5), 44 (5)	40
HI-Tumor		
Photonen	55 (3), 60 (5), 65 (5), 70 (6 [‡]), 75 (6 [‡]), 80 (8 [‡]), 85 (6), 90 (7 [‡]), 95 (5 [§])	51
^{12}C	29 (3), 33 (6), 37 (6 [#]), 41 (6), 45 (4)	25
Kontrolltiere	7 unbestrahlte Tumore pro Experiment	28
Gesamt		403

* 1 Tier wurde wegen eines Lymphödems am Hinterlauf vorzeitig aus dem Versuch genommen und daher von der Analyse ausgeschlossen.

1 Tier starb nach Therapie aus unbekannter Ursache.

§ 2 Tiere mussten wegen einem Metastasierungsereignis vorzeitig aus der Studie genommen werden und wurden deshalb von der Analyse ausgeschlossen.

' 2 Tiere wurden wegen eines Lymphödems am Hinterlauf vorzeitig aus dem Versuch genommen und daher von der Analyse ausgeschlossen.

‡ 1 Tier musste wegen einem Metastasierungsereignis vorzeitig aus der Studie genommen werden und wurde deshalb von der Analyse ausgeschlossen.

~ 2 Tiere starben nach Therapie aus unbekannter Ursache.

Die bestrahlten Tiere wurden randomisiert den verschiedenen Dosisgruppen zugewiesen. Da die genauen Dosen für die DWKs unbekannt waren, mussten mehrere Teilerperimente zur Generierung kompletter DWKs durchgeführt werden. Um die Tierzahlen so gering wie möglich zu halten, wurden die mittleren Dosisgruppen zuerst bestrahlt und später, nach erfolgter Abschätzung der DWKs, die oberen und unteren Gruppen ermittelt. Aus logistischen Gründen fanden Photonen- und ^{12}C - Experimente teilweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Zusätzlich mussten einige Dosisgruppen aufgrund von Metastasen oder spontan verstorbenen Tieren zu späteren Zeiten mit weiteren Tieren aufgefüllt werden.

2.8 Quantifizierung der Strahlenreaktion

Die Quantifizierung der Strahlenreaktion erfolgte über Tumolvolumenmessungen im zeitlichen Verlauf. Die daraus bestimmten Dosis-Wirkungskurven dienten zur RBW-Berechnung von ^{12}C gegenüber Photonen.

2.8.1 Wachstumskurven

Für die Bestimmung der Wachstumskurven nach Bestrahlung wurden zweimal wöchentlich die Tumorgrößen gemessen. Aus diesen Tumorgrößen ließ sich das Tumolvolumen berechnen. Für AT1- und HI-Tumoren wurde das Volumen nach der Formel $V = 4/3 \times \pi \times r^3$ ermittelt. Der Radius r wurde als Mittelwert zweier orthogonaler Tumorradien berechnet, die mit einer Messschablone bestimmt wurden. Da der H-Tumor ein deutlich anderes Tumorwachstum aufwies, wurde die Berechnung des Volumens für diese Tumorkategorie abgeändert. Im Verlaufe der Nachbeobachtungszeit schrumpfte das Tumolvolumen des H-Tumors zwar deutlich in der Höhe (c) auf 2-3 mm, aber die Ausdehnung in Länge (a) und Breite (b) blieb dabei relativ gleich. Deshalb würde eine Berechnung nach obiger Formel zu einer extremen Überschätzung des Tumolvolumens führen. Aus diesem Grund wurde für die Volumenberechnung des H-Tumors die Berechnung eines Ellipsoids zu Grunde gelegt: $V = 4/3 \times \pi \times a \times b \times c$.

Da das Wachstumsverhalten von kontrollierten und unkontrollierten Tumoren signifikant unterschiedlich ist, wurden getrennte Wachstumskurven für lokal kontrollierte und unkontrollierte Tumoren pro Dosisgruppe erstellt. Es werden Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) für alle Tiere pro Dosisgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben.

2.8.2 Dosis-Wirkungskurven

Für jedes Bestrahlungsexperiment in **Tab. 1** wurden Dosis-Wirkungskurven (DWKs) für den Endpunkt „lokale Tumorkontrolle nach 300 Tagen“ berechnet. Dazu wurde für jede Dosisgruppe eines Experiments mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode die aktuarische Tumorkontrollrate nach 300 Tagen bestimmt [74]. Die aktuarische Analyse berücksichtigt unvollständige Beobachtungen von Tieren, die auf Grund von Metastasen oder anderen Ursachen vorzeitig verstarben oder getötet werden mussten.

An Tumorkontrollraten eines Experiments wurde unter Verwendung der Methode der „effektiven Stichprobengröße“ [75] das logistische Dosis-Wirkungsmodell mit Hilfe eines Maximum-Likelihood-Fit-Verfahrens unter Verwendung des Softwarepakets STATISTICA [76] angepasst. Das logistische Dosis-Wirkungsmodell ist durch die folgende Funktion gegeben:

$$P(D) = \frac{e^{b_0 + b_1 D}}{1 + e^{b_0 + b_1 D}}$$

Dabei sind b_0 und b_1 die anzupassenden Fit-Parameter, aus denen sich die Dosis für 50% Tumorkontrollwahrscheinlichkeit berechnen lässt.

$$\text{TCD}_{50} = -\frac{b_0}{b_1}$$

Weitere technische Details zur Anpassung der Dosis-Wirkungskurven sind in Karger *et al.* [52] sowie in der dort aufgeführten Literatur angegeben. Der Standardfehler von TCD_{50} -Werten wurde mittels Fehlerfortpflanzung unter Berücksichtigung der Korrelation von b_0 und b_1 berechnet.

2.8.3 Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)

Kohlenstoffionen zeigen auf Grund ihres hohen LETs eine gegenüber Photonen erhöhte relative biologische Wirksamkeit (RBW). Dies zeigt sich in einer Verschiebung der DWK für Kohlenstoffionen zu kleineren Dosen (**Abb. 3**). Quantitativ ist die RBW wie folgt definiert:

$$RBW = \frac{D_{\text{Photonen}}}{D_{\text{Kohlenstoff}}} \Bigg|_{\substack{\text{gleicher} \\ \text{Endpunkt}}}$$

Wobei D_{Photonen} die Photonen- und $D_{\text{Kohlenstoff}}$ die Kohlenstoff-Dosis ist, die zum gleichen biologischen Effekt führt. Als biologischer Effekt wird in dieser Arbeit die 50%-ige Wahrscheinlichkeit für eine lokale Kontrolle des Tumors verwendet, so dass sich die RBW aus dem Verhältnis der TCD_{50} von Photonen und ^{12}C ergibt.

90% Konfidenzintervalle (CI) wurden mittels Fieller's Theorem berechnet [77].

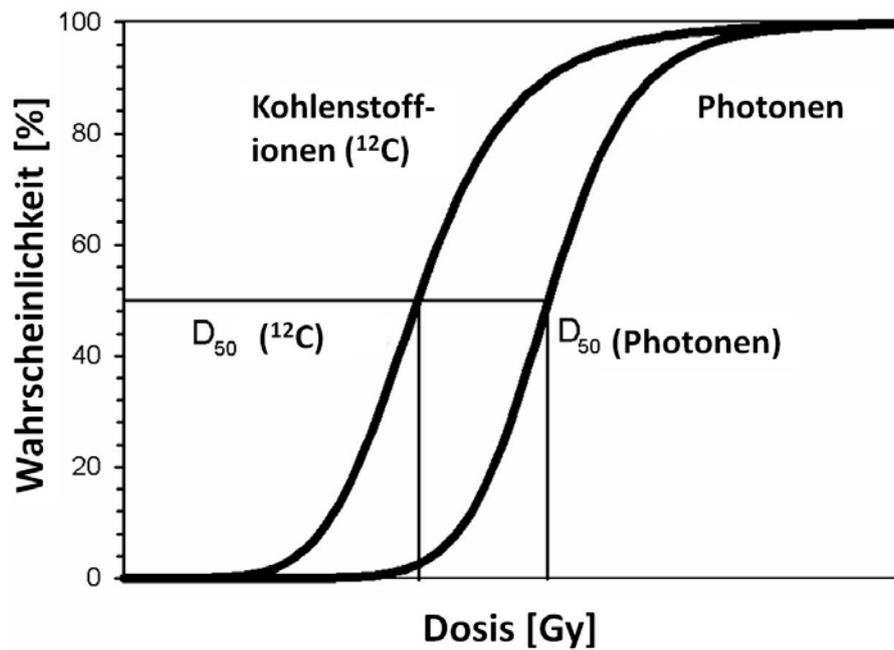


Abb. 3: Bestimmung der RBW mittels Dosis-Wirkungskurven. D_{50} -Linien geben jeweils die Dosis an, die appliziert werden muss, um 50% lokal kontrollierte Tumore zu erhalten.

2.8.4 Fraktionierungsverhalten

In der Radiotherapie wird die Fraktionierungsabhängigkeit der Strahlentoleranz von Gewebe durch den α/β -Wert quantifiziert. Dieser Parameter leitet sich aus dem Linear-Quadratischen Modell ab, welches für die Beschreibung von Zellüberlebenskurven entwickelt wurde [78], aber auch für die Umrechnung von Bestrahlungsdosen im Patienten verwendet werden kann [79].

Aus dem Verhältnis der α/β -Werte für Tumore und das umliegende Normalgewebe können Rückschlüsse gezogen werden, ob eine Änderung der Fraktionierungsstrategie wie z.B. eine Hypofraktionierung sinnvoll ist [80]. Da wir in unserem Tumormodell sowohl einen Einfluss von Tumorproliferation / Repopulation als auch Veränderungen in der hypoxischen Fraktion bei unterschiedlicher Behandlungsdauer annehmen und den Grad des Einflusses nicht bestimmen können, handelt es sich lediglich, um effektive α/β -Werte, die das Fraktionierungsverhalten unter unseren experimentellen Bedingungen beschreiben. Um realistische quantitative effektive α/β -Werte zu berechnen, sind 6 Fx Experimente nötig, die über den Rahmen dieser Dissertation hinausgehen.

2.9 Längsschnittexperimente für funktionelle und strukturelle

Untersuchungen

Mit den in [Kapitel 2.8](#) beschriebenen Methoden wurde die Strahlenreaktion zu einem festen Zeitpunkt quantitativ beschrieben. Allerdings lassen diese Daten keine Rückschlüsse über den zeitlichen Verlauf und die zugrundeliegenden Mechanismen zu. Um dies genauer zu untersuchen wurden weitere Experimente im Längsschnitt-Design durchgeführt.

Die [Abb. 4](#) zeigt einen schematischen Ablauf des Experiments. Die Bestrahlung wurde wie unter [Kapitel 2.4.1](#) und [2.4.2](#) beschrieben durchgeführt.

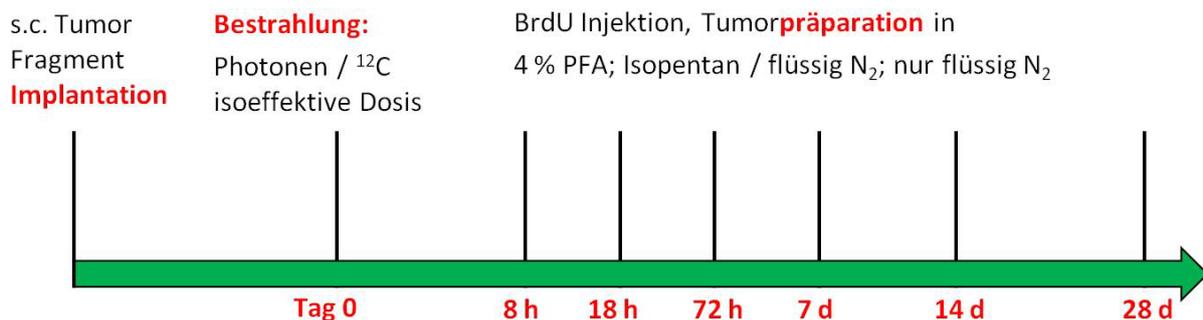


Abb. 4: Durchführungsschema der Längsschnittexperimente für mechanistische Untersuchungen. Tumore wurden isoeffektiv mit 100% lokalen Kontrolldosen 1 Fx Photonen- oder ^{12}C - RT bestrahlt, nach definierten Zeitpunkten nach Bestrahlung getötet und das Tumorgewebe präpariert. Weitere Einzelheiten siehe [2.9.3](#)

2.9.1 Blutflussveränderungen nach Photonen- und ^{12}C - RT mittels

Ultraschalluntersuchungen

Mit einem Mikro-Ultraschallsystem (VEVO770, VisualSonics, Toronto, Canada) wurden Ultraschallmessungen einmal vor bzw. wöchentlich bis 9 Monate nach Bestrahlung durchgeführt. Der PowerDoppler-Ultraschall (Dopplerfrequenz 30 MHz) war mit einem RMV-704 Ultraschallkopf ausgestattet.

Für die beiden Sublinien H und HI wurden jeweils 2 verschiedene Dosen pro Strahlmodalität untersucht. Ziel war es sowohl 100% lokal kontrollierte als auch unkontrollierte Tumore zu untersuchen. Die nach diesen Kriterien ausgewählten Dosisgruppen sind in [Tab. 2](#) dargestellt. Während der Untersuchung wurden die Tiere mit 2% Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) und 2 l/ min Sauerstoff narkotisiert. Die Lagerung der Tiere erfolgte auf einem beheizten Untersuchungstisch. Die Tumore wurden wie in [Abb. 5](#) dargestellt mit Ultraschallgel bedeckt. Anschließend wurde der motorisierte Ultraschallkopf sagittal über den Tumor geführt und fortlaufend Bilder im PowerDoppler Modus mit einer Schichtdicke von 200 μm akquiriert. Das komplette Tumolvolumen wurde gemessen und anschließend in jedem aufgenommenen 2D-Bild eine ROI („region of interest“, interessierende Region) eingezeichnet, die das gesamte Tumolvolumen ohne Hautbereiche einschloss. Daraus

konnte ein 3D-Bild rekonstruiert werden. Anschließend wurde mit Hilfe der Vevo-Software (VisualSonics, Toronto, Canada) das Tumolvolumen und der Blutfluss innerhalb des Tumors errechnet. Der Blutfluss bestimmt sich aus dem prozentualen Anteil an gelben und roten PowerDoppler positiven Farbpixeln am Tumorgesamtvolumen (3D-ROI-Volumen). Für die Farbpixelintensität gibt es aber keine quantitative Entsprechung, es ist lediglich eine Aussage über einen vorhandenen Blutfluss (ja / nein Aussage) möglich.

Tab. 2: Dosisgruppen bestrahlter H- und HI-Tumore für die Ultraschalluntersuchungen.

Tumor	Photonen [Gy]		Kohlenstoffionen [Gy]	
	unkontrolliert	kontrolliert	unkontrolliert	kontrolliert
H-Tumor	30	50	18	33
HI-Tumor	45	70	21	33



Abb. 5: Positionierung des Tieres während der Ultraschalluntersuchungen. Das Tier wird unter Narkose auf einer Heizplatte befestigt und der robotergesteuerte Ultraschallkopf (gelber Pfeil) kann das gesamte Tumolvolumen abtasten.

2.9.2 Bestimmung von Blutfluss und Perfusion mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Bei Tumoren der Sublinie AT1 wurde sowohl ein Isodosenvergleich (gleiche physikalische Dosis) als auch ein Isoeffektvergleich (Dosen, welche den gleichen biologischen Effekt erzeugen) durchgeführt. Die Dosen für Photonen und Kohlenstoffionen wurden der Veröffentlichung Peschke *et al.* [11] entnommen und sind in **Tab. 3** aufgeführt.

Tab. 3: Bestrahlungsdosen für die MRT-Studie von AT1- Tumoren. Für den Isodosenvergleich wurden 37 Gy Photonen- oder ^{12}C - RT benutzt. Gleichzeitig sind 37Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen (kontrolliert) sowie 16 Gy ^{12}C und 37 Gy Photonen (unkontrolliert) isoeffektiv.

Photonen [Gy]		Kohlenstoffionen [Gy]	
unkontrolliert	kontrolliert	unkontrolliert	kontrolliert
37	85	16	37

Es wurden 12 Tiere mit AT1-Tumoren rechts- und linksseitig transplantiert (siehe [Kapitel 2.3](#)) und bei einer Größe von 10x10 mm² die rechtsliegenden Tumore einmalig bestrahlt. Die linksseitigen Tumore dienten jeweils als Kontrolle und blieben unbehandelt. Die Bestrahlungen erfolgten jeweils wie unter [Kapitel 2.4.1](#) bzw. [2.4.2](#) beschrieben.

Um den Einfluss der Bestrahlungsmodalität auf die Tumorblutgefäßfunktion zu verdeutlichen und eine eventuelle Dosis- Abhängigkeit zu zeigen, wurden MRT-Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Alle 12 Tiere wurden jeweils 1 Tag vor Bestrahlung, 3 Tage nach, sowie 7, 14 und 21 Tage nach der Bestrahlung mit dem MRT untersucht. Zusätzlich erfolgte dreimal pro Woche die Tumorgößenmessung mittels Schablone (wie unter [Kapitel 2.5](#) beschrieben). Die MRT-Messungen fanden an einem klinischen 1,5 T MRT (Symphony, Siemens, Erlangen) mit einer am DKFZ entwickelten Tierspule (zylindrische Spule mit einem Innendurchmesser von 83 mm und einer Länge von 120 mm) statt.

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden folgende Sequenzen gemessen:

- Localizer (Positionierung der T2-Sequenz)
- T2- gewichtete Sequenz (TSE T2 tra) mit einer Turbo Spin echo-Sequenz (axiale Positionierung des Feldes, TR: 3240 ms, TE: 81 ms, Pixelgröße 0,35 mm und einer Schichtdicke von 1,5 mm)
- dynamisch Kontrast- verstärkte Sequenz (DCE, *dynamic contrast enhanced*, TR: 373 ms, TE: 1,67 ms, Pixelgröße 0,99 mm, Schichtdicke: 4,5 mm) durch den Bereich des größten Tumordurchmessers (axiale Richtung) während der Kontrastmittelinjektion (0,1 mmol/kg Gd-DTPA (Magnevist[®], Bayer Healthcare Pharmaceuticals, Berlin) i.v. in die Schwanzvene)
- T1- gewichtete Sequenz nach Kontrastmittelgabe (SE T1 High SNR OS mit TR: 600 ms, TE: 14 ms, Pixelgröße 0,31 mm und einer Schichtdicke von 1,5 mm)

Die Kontrastmittelgabe erfolgt 20 s nach dem Starten der DCE-Sequenz und die Injektion wurde über eine Zeitspanne von 10 s durchgeführt. Da beide Tumore für DCE und T1 nach Kontrastmittelgabe im größten Durchmesser erfasst werden mussten, wurden teilweise mehrere T2-gewichtete Sequenzen vorangestellt (schräge T2), um die optimale Position beider Tumore des Tieres innerhalb einer Messung zu gewährleisten.

Die MRT-Daten wurden zum Einen zur Volumenbestimmung und zum Anderen zur Bestimmung von Blutfluss bzw. Blutvolumen genutzt. Das Volumen (in μl) wurde mit Hilfe des „Medical Imaging Interaction Toolkit“ (dkfz, Heidelberg) aus den T2-gewichteten Bildern berechnet. Die DCE-Bilder wurden mit der Dynalab-Software (Mevis Research, Bremen) ausgewertet. Dabei wurde von Hand eine ROI (*region of interest*) um den Tumorbereich gezeichnet und von der Software die Werte für die Amplitude A und die Austauschkonstante k_{ep} berechnet. Die Berechnung von A und k_{ep} beruhen auf dem Brix *et al.* eingeführten Zwei-Kompartiment-Modell [\[81,82\]](#). Das Modell beruht darauf, dass injiziertes Kontrastmittel (hier Magnevist[®]) gleichmäßig in beiden Kompartimenten verteilt wird (intravaskulärer Raum und

interstitieller, d.h. extravaskulärer Raum). Die Amplitude A ist dabei mit dem Blutvolumen assoziiert und beschreibt die Akkumulation des Kontrastmittels innerhalb einer vorgegebenen Zeit. Der k_{ep} -Wert hingegen charakterisiert die Austauschrate zwischen intravaskulärem Raum und Interstitium. Damit ist der k_{ep} -Wert direkt von der Gefäßpermeabilität abhängig.

Zusätzlich zu den MRT-Untersuchungen wurde auch in dieser Studie Ultraschalluntersuchungen vergleichbar zu den unter [Kapitel 2.9.1](#) beschriebenen durchgeführt. Ultraschalluntersuchungen wurden nur mit einem Tier pro Dosisgruppe einen Tag vor Bestrahlung, sowie 2, 9, 16 und 23 Tage nach Bestrahlung durchgeführt. Nach Abschluss einer Zeitspanne von 23 Tagen nach Bestrahlung wurden die Tiere euthanasiert, die Tumore präpariert und kryokonserviert bzw. in Paraffin eingebettet (siehe [Kapitel 2.9.3](#)).

2.9.3 *In vivo* Applikation von BrdU und anschließende Tumorpräparation

Aus den DWKs ([Kapitel 2.8](#)) kann für jede Tumorsublinie, jede Strahlmodalität und jedes Fraktionierungsschema eine isoeffektive Dosis z.B. bei 100% oder 50% lokaler Kontrolle abgeleitet werden. Da für konventionelle Photonentherapie bereits einige strahleninduzierte Tumorreaktionen und ihre zeitliche Abfolge bekannt sind [\[83\]](#), geht es um den Vergleich von Gemeinsamkeiten und Unterschieden in der Tumorreaktion nach Photonen- und ^{12}C -Bestrahlung auf mechanistischer Ebene. Über den zeitlichen Ablauf der Tumorschädigung nach ^{12}C -Bestrahlung liegen kaum Daten vor. Um einen Vergleich vorzunehmen, wurden H- und HI-Tumore isoeffektiv mit 100% lokalen Kontrolldosen mit Photonen- und ^{12}C bestrahlt und danach zu definierten Zeitpunkten (8 h, 18 h, 72 h, 7 Tage, 14 Tage, 21 Tage und 28 Tage) die Tiere getötet und das Tumorgewebe präpariert. Um 100% lokale Kontrolle zu erreichen, wurden die H-Tumoren mit 33 Gy ^{12}C bzw. 62 Gy Photonen und die HI-Tumore mit 37 Gy ^{12}C oder 70 Gy Photonen bestrahlt.

Um die Proliferationsdynamik nach Bestrahlung qualitativ und quantitativ erfassen zu können, wurde 8 h vor der geplanten Tumorentnahme Bromdesoxyuridin (BrdU, 100 mg/kg, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) i.p. appliziert. Das seziierte Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell in 3 Stücke zerteilt. Ein Drittel wurde mit dem Kryoprotektiva Isopentan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), das zweite Drittel direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das restliche Gewebe wurde mit 4% Paraformaldehyd (AppliChem GmbH, Darmstadt), gepuffert in PBS (Biochrom AG, Berlin), 24 h (AT1-, H-Tumor) bzw. 48 h (HI-Tumor) bei 4°C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe gelagert (-80°C / Stickstofftank) bzw. für Paraffineinbettung weiterverarbeitet.

2.9.3.1 Histologische Weiterverarbeitung von Kryopräparaten

Das tiefgefrorene Gewebe wurde mit TissueTek® (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf einen Gewebetisch aufgefroren. Anschließend erfolgte die Prozessierung in 7 µm dicke fortlaufende Kryostatschnitte mit Hilfe eines Kryotoms (Mikrom HM560, Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Nach mehreren 20 µm dicken Trimschnitten wurde der 7 µm dicke Feinschnitt fortlaufend verwendet und jeweils ein Gewebeschnitt pro Adhäsions-Objektträger (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) aufgezogen. Die Objektträger wurden abhängig von der jeweiligen Färbung entweder nativ belassen oder mit einer Methanol / Aceton- Fixierung (1 min Methanol + 2 min Aceton bei -20°C) bzw. einer Variante dessen nur in Methanol oder Aceton fixiert. Danach erfolgte eine Lufttrocknung bei Raumtemperatur (Raumtemp.) für ca. 10 min und dann die weitere Lagerung der Schnitte bis zur Färbung bei -20°C. Vor dem Färbebeginn wurden die jeweiligen Schnitte aufgetaut und bei Raumtemp. 30 min luftgetrocknet und anschließend 5 min in PBS gewaschen.

2.9.3.2 Histologische Weiterverarbeitung von Paraformaldehyd- fixierten Geweben

Nach der Gewebefixierung in 4% Paraformaldehyd / PBS erfolgte eine Gewebeentwässerung in einer Einbettkassette (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), die nach folgendem Schema verlief:

- 3 x Inkubation in 70% Ethanol (vergällt) für je 45 min (Raumtemp.)
- 3 x Inkubation in 95% Ethanol (vergällt) für je 45 min (Raumtemp.)
- 3 x Inkubation in 100% Ethanol (vergällt) für je 45 min (Raumtemp.)
- 3 x Inkubation in 70% Ethanol (vergällt) für je 45 min (Raumtemp.)
- 3 x Inkubation in Xylol oder Roticlear (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für je 45 min auf dem Schüttler (Raumtemp.)
- über Nacht in Xylol oder Roticlear schütteln lassen (Raumtemp.)
- in 1:1 (v/v) Xylol:Paraffin-Gemisch für 1,5 h bei 58°C im Brutschrank
- 2 x Inkubation in Paraffin (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) jeweils 1 h bei 58°C
- Einbetten der Gewebe in Paraffinblöckchen in Kautschukförmchen oder Einbettkassetten

Es wurde darauf geachtet, dass die Beschriftung auch nach Erkalten des Paraffins deutlich zu lesen war (Beschriftungszettel mit einbetten). Nach kurzem Abkühlen des Paraffinblocks auf der Kühlplatte (Leica Microsystems, Wetzlar) wurde dieser für mindestens 24 h bei -20°C gelagert. Anschließend wurde der Block aus der Form entfernt und bei Raumtemperatur gelagert.

Das Herstellen der Paraffinschnitte erfolgte mit dem Mikrotom Microm STS Section-Transfer-System (Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Dafür wurden die Paraffinblöcke bei 4°C vorgekühlt (mindestens 1 h) und anschließend in das Mikrotom eingespannt. Das

Wasserbad wurde während des gesamten Schneidens auf 40°C konstant gehalten. Das Trimmen erfolgt mit 20 µm dicken Schnitten. Der Feinschnitt hat 6 µm Dicke. Nachdem sich die Paraffinschnitte im Wasserbad gestreckt hatten, wurde jeweils ein Schnitt pro Objektträger aufgezogen und anschließend auf einer Wärmeplatte für 15-30 min (Medax Nagel GmbH, Kiel) getrocknet. Danach wurden alle Schnitte bei 37°C im Wärmeschrank (Heraeus GmbH, Hanau) über Nacht restlos getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Vor Färbebeginn wurden die Paraffinschnitte entparaffinisiert (2 Wechsel in Xylol oder Roticlear für je 10 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 Wechsel in 100%, 95%, 70% Ethanol für je 2 min) restlos vom Paraffin befreit und rehydriert. Dann folgte ein Waschschrift für 10 min in Aqua dest.

2.9.3.3 Gewebeaufarbeitung für RNA-Analysen

Die Tumorgewebestücke wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem Potter S mit Teflon- Rührwerk (B. Braun, Melsungen) so schnell wie möglich zerkleinert und in Homogenisierungspuffer des NucleoSpin[®] RNA L Kits (Macherey-Nagel, Düren) aufgenommen. Es war zu beachten, dass dieser Vorgang nicht länger, als 30 s nachdem der flüssige Stickstoff verdampft war, dauerte, da sonst bereits die RNA-Degradation beginnt. Die Zusammensetzung und Vorbereitung des Homogenisierungspuffers kann der Kit-Beschreibung entnommen werden. Für diese Art von Präparation kann nicht mehr als 120 mg Gewebe eingesetzt werden, deshalb musste das Gewicht in gefrorenem Zustand bestimmt werden. Das zerkleinerte Gewebe im Homogenisierungspuffer, wurde danach mit dem Potter auf 2.000 rpm und mit einer Hubzahl von 40 homogenisiert. Im weiteren Ablauf wurde das Kit-Protokoll genauestens eingehalten und jeweils die Höchstmengen an Puffer und die Zentrifugationszeit von 10 min verwendet.

2.9.4 Mikroskopische Färbungen

2.9.4.1 Morphologische Untersuchungen (Hämatoxylin / Eosin)

Für morphologische Untersuchungen wurde eine Hämatoxylin / Eosin- Färbung durchgeführt. Hämatoxylin nach Mayer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Eosin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden nach dem Herstellerprotokoll verwendet. Die Hämatoxylin / Eosin-Färbung wurde sowohl für Kryoschnitte als auch für Paraffinschnitte angewendet. Das Standardprotokoll ist in [Tab. 4](#) dargestellt.

Tab. 4: Standard Hämatoxylin / Eosin-Färbeprotokoll. Alle Schritte, die für Paraffinschnitte durchgeführt werden, sind mit einem P und für Kryoschnitte mit einem K gekennzeichnet. Alle Schritte werden bei Raumtemp. durchgeführt.

Schritt	Lösung	Zeit	Kryo / Paraffin
Lufttrocknen		mindestens 30 min	K
Waschen	Aqua dest.	5 min	K
Entparaffinisieren	Roticlear* oder Xylol	2 x 10 min	P
Entparaffinisieren	100% Ethanol	2 x 3 min	P
Rehydrierung	95% Ethanol	2 x 1 min	P
Rehydrierung	70% Ethanol	2 x 1 min	P
Färben	Hämatoxylin*	5 min	K; P
Waschen	Aqua dest.	kurz (30 s)	K; P
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	10 min	K; P
Färben	Eosin* (1%)	4 min	K; P
Waschen	Aqua dest.	kurz (30 s)	K; P
Entwässern	70% Ethanol	2 min	K; P
Entwässern	95% Ethanol	2 min	K; P
Entwässern	100% Ethanol	4 min	K; P
Entwässern	Roticlear oder Xylol	2 x 5 min	K; P
Eindeckeln	Eukitt ⁺		K; P
Trocknen	Luft unter Abzug	über Nacht	K; P

* erworben von Carl Roth GmbH, Karlsruhe

⁺O. Kindler GmbH, Freiburg

2.9.4.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Mehrzahl der histologischen Untersuchungen wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Deshalb befindet sich nachfolgend ein Standardprotokoll (siehe **Tab. 5**) für eine Immunfluoreszenzfärbung, so dass später nur auf eventuelle Änderungen eingegangen wird.

Die Mikroskopie erfolgte für alle Färbungen an einem Nikon Eclipse E600 (Nikon GmbH, Düsseldorf) mit einem 350 nm (blau), 470-490 nm (grün) und einem 515-560 nm (rot) Exzitationsfilter. Bilder wurden mit einer Nikon digital DS-U1 Kamera aufgenommen.

Die quantitative Auswertung der Bilder erfolgte mit folgender Software:

BrdU, γ H2AX: AlphaView SA Version 3.4 (Proteinsimple, Santa Clara, CA, USA)

CD31, SMA: Cell F - Software Version 2011 (Olympus, Hamburg).

CD24: Plugin Cell Pixel Counter der Freeware ImageJ Version 1.47h (Entwickler Wayne Rasband)

Tab. 5: Standard- Immunfluoreszenzfärbeprotokoll für Methanol / Aceton- fixierte Kryoschnitte.
Die Antikörperverdünnung ist Antikörperabhängig und wird deshalb in der spezifischen Färbung angegeben, da diese z.T. sehr stark variieren können. Als Kontrollen dienen immer Schnitte, die jeweils nur mit dem 1. Antikörper (Ak) oder dem 2. Ak behandelt wurden, um die Hintergrundfärbung zu bestimmen.

Schritt	Lösung	Zeit	Temperatur
Fixierte Schnitte	Methanol*/ Aceton*	1 min / 2 min	-20°C
Lufttrocknen		mindestens 30 min	Raumtemp.
Waschen	PBS“	5 min	Raumtemp.
Blockieren	Fx Signal Enhancer ⁺	30 min	Raumtemp.
Waschen	PBS“	5 min	Raumtemp.
Blockieren	DAKO Protein Block ⁺	30 min	Raumtemp.
Primär-Ak	1. Ak in 10% BSA / PBS	über Nacht	4°C
Waschen	PBS“	3 x 5 min	Raumtemp., dunkel
Sekundär-Ak	Fluoreszenz- gekoppelter 2. Ak in PBS	1 h	Raumtemp., dunkel
Waschen	PBS“	3 x 5 min	Raumtemp., dunkel
Zellkernfärbung	DAPI [°]	3 min	Raumtemp., dunkel
Waschen	Aqua dest.	5 min	Raumtemp., dunkel
Eindeckeln	Fluoromount-G [~]		Raumtemp., dunkel

* erworben von Carl Roth GmbH, Karlsruhe

“ erworben von Biochrom AG, Berlin

⁺ DakoCytomation Glostrup, Dänemark

[°] Invitrogen Molecular Probes, Eugene USA

[~] Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA

2.9.4.3 Proliferationsnachweis mittels BrdU

Der BrdU- Nachweis wurde ausschließlich auf Methanol / Aceton- fixierten Kryoschnitten durchgeführt. Die Freilegung antigener Epitope erfolgte nach dem Waschen in PBS mit einem Natriumzitrattpuffer mit folgender Zusammensetzung:

- 10 mM Natriumzitat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- ad 1 l Aqua dest.
- pH6.0 mit 1 N HCl einstellen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 0,5 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugeben und mischen
- Lagerung bei 4°C für 6 Monate

Die Kryoschnitte wurden in einer Küvette mit Natriumzitrattpuffer bei 95°C im Wasserbad für 30 min inkubiert. Danach erfolgte eine Abkühlungsphase auf 37°C in 20 min unter dem Abzug. Anschließend wurde mit dem Standardprotokoll (PBS-Waschschritt und Blockierung) fortgesetzt. Als Primärantikörper wurde ein Maus anti-BrdU Antikörper (Roche Diagnostics, Mannheim) mit PBS 1:800 verdünnt und für 1 h inkubiert. Der Sekundärantikörper war ein

Ziege anti-Maus AlexaFluor-555 gekoppelter Antikörper (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), der 1:2000 in PBS eingesetzt und für 30 min inkubiert wurde. Anschließend wurde mit dem Standardprotokoll (siehe [Tab. 5](#)) fortgefahren.

2.9.4.4 Spezifische Färbung der Gefäßstrukturen

Um Gefäßveränderungen nach Photonen- und Kohlenstoffionenbestrahlung detaillierter untersuchen zu können, wurden drei verschiedene Antikörper gegen spezifische Komponenten des Gefäßsystems verwendet. Es handelt sich hierbei um Färbungen von Methanol / Aceton-fixierten Kryoschnitten, die dem Standardprotokoll (siehe [Tab. 5](#)) entsprechen.

CD31 (Endothelzellen) und smooth muscle actin (Perizyten)

Zur Begutachtung der Gefäße wurde eine Doppelfärbung von CD31 (Marker für Endothelzellen) und glattmuskulärem Aktin (*smooth muscle actin* (SMA)), einem Marker für Perizyten, durchgeführt. Nur reife Gefäße weisen sowohl CD31 als auch SMA auf, in der Reifung befindlichen Gefäßen mangelt es an SMA. Die Färbung wurde nach dem in [Tab. 5](#) dargestellten Standardprotokoll durchgeführt. Beide Primärantikörper wurden gemeinsam über Nacht bei 4°C auf dem Objektträger in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Primärantikörper wurden der Maus anti-Ratte CD31 Antikörper (Chemicon, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) 1:4000 und der Kaninchen anti-SMA Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) 1:800 in PBS mit 10% BSA (Carl Roth, Karlsruhe) verdünnt. Die beiden Fluoreszenz- markierten Sekundärantikörper wurden nacheinander für jeweils 30 Minuten bei Raumtemp. inkubiert. Es wurde mit dem Sekundärantikörper für CD31, dem Ziege anti-Maus AlexaFluor-555 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA) 1:3000 verdünnt in PBS, begonnen. Dann erfolgte ein 3 x 5 minütiger Waschschrift in PBS, gefolgt von dem Sekundärantikörper Esel anti-Kaninchen AlexaFluor-488 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA) 1:1500 in PBS verdünnt, um das SMA nachzuweisen. Die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt.

Kollagen IV

Kollagen IV ist eines von 28 verschiedenen bekannten Kollagenen, welches v.a. in der Basalmembran vorkommt. Die Färbung wurde nach dem Standardprotokoll (siehe [Tab. 5](#)) für Kryostatschnitte durchgeführt. Der Kaninchen anti-Kollagen IV Antikörper (ab19808-100, Abcam, Cambridge, UK) wurde in PBS mit 10% BSA 1:4000 verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der Esel anti-Kaninchen AlexaFluor-488 (A21206, Invitrogen, Karlsruhe; 1:3000 verdünnt in PBS für 30 min inkubiert) benutzt und die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

2.9.4.5 Nachweis von DNA- Doppelstrangbrüchen mittels γ H2AX

Der Nachweis von DNA- Doppelstrangbrüchen erfolgte über eine γ H2AX- Färbung. Es wurden Kryoschnitte nach dem Standardprotokoll (siehe [Tab. 5](#)) mit dem Primärantikörper Kaninchen anti- γ H2AX (ab2893, Abcam, Cambridge, UK) 1:1000 verdünnt in PBS mit 10% BSA über Nacht bei 4°C gefärbt. Zur Detektion wurde der Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen AlexaFluor-555 (A21429, Invitrogen, Karlsruhe; 1:3000 verdünnt in PBS für 30 min inkubiert) verwendet. Zellnuklei wurden mit DAPI angefärbt.

2.9.4.6 Detektion selektiver Oberflächenmarker

Das Ziel, Tumorzellen vom Normalgewebsanteil der Tumore zu unterscheiden, führte zu der Fragestellung, ob im verwendeten Dunning R3327- System überhaupt typische Oberflächenmarker für Krebszellen vorhanden sind. Da insbesondere für die sehr heterogenen Prostatakarzinome keine ausreichende Literatur über Oberflächenmarker vorhanden ist und einige vielversprechende Kandidaten nicht spezifisch mit Rattengewebe reagieren, beschränkte sich unsere erste Analyse auf die hier aufgeführten Oberflächenmarker: CD24, CD44, CD45, CD133, CD326 und die Zytokeratine 5/8 und 19.

Alle Färbungen wurden nur auf Kryostatschnitten durchgeführt. Grundlage hierfür war das Standardprotokoll ([Tab. 5](#)).

CD24-PE (555428, BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA), CD44-FITC (ab 27285, Abcam, Cambridge, UK), CD133-PE (130080801, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), CD326-FITC (MCA1870FT, AbD Serotec, Düsseldorf), Zytokeratin 5 / 8 (sc-32328, Santa Cruz, Heidelberg) und Zytokeratin 19 (251400, Abbiotec, San Diego, USA) wurden jeweils 1:50 in PBS mit 3% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper für Zytokeratin 19 wurde Esel anti-Kaninchen AlexaFluor-488 (1:3000 verdünnt in PBS für 1 h) und für alle anderen oben aufgeführten Antikörper Ziege anti-Maus AlexaFluor-555 (A21424, Invitrogen, Karlsruhe; 1:4000 verdünnt in PBS für 1 h inkubiert) verwendet. Zellnuklei wurden mit DAPI angefärbt. Die Färbungen von CD24, CD44, CD133, CD326, Zytokeratin 5 / 8 und 19 wurden nach dem Standardprotokoll (siehe [Tab. 5](#)) durchgeführt. Da diese Oberflächenmarker schwierig zu detektieren sind, wurden folgende Fixierungstechniken verwendet: native Schnitte, die direkt nach dem Schneiden gefärbt wurden, Methanol / Aceton- fixierte Schnitte und 4% PFA in PBS fixierte Schnitte. Nach einem letzten Waschschrift wurden die gefärbten Schnitte mit Fluormount-G (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA) eingedeckelt.

Detektion von CD24⁺ - Zellen im Zeitverlauf nach Bestrahlung von HI-Tumoren

Zusätzlich wurde ein mittlerweile verfügbarer Ratten-spezifischer CD24-PE Antikörper (562104, BD, Heidelberg) für die Detektion von CD24⁺ - Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung genutzt. Die direkt-gekoppelte PE-Fluoreszenz war ausreichend, so dass auf eine Sekundärantikörperinkubation verzichtet werden konnte. Nach erfolgtem Blockieren und Waschschrritten wurden die Kryostatschnitte von HI-Tumoren (siehe [Kapitel 2.9](#)) mit dem Primärantikörper CD24-PE (1:1000 in PBS / 10% BSA, ÜN, 4°C) gefärbt und am nächsten Tag mit DAPI (3 min, RT) gegengefärbt.

2.9.5 Molekularbiologische Methoden

2.9.5.1 RNA-Extraktion aus soliden Tumoren

Die Unterschiede nach Photonen- und Kohlenstoffionenbestrahlung von Prostata Tumoren wurden nicht nur auf Proteinebene (histologische Nachweise), sondern auch auf Transkriptionsebene (mRNA-Expression) untersucht. Die Gewebeproben wurden aus dem in [Abb. 4](#) beschriebenen Längsschnittexperiment entnommen. Allerdings wurden nur unbehandelte Kontrolltumore und die Zeitpunkte 8 h, 18 h, 72 h und 14 Tage nach Photonen- und ¹²C- RT (siehe [Kapitel 2.9](#)) für die Genexpressionsanalyse genutzt. Die RNA-Extraktion erfolgte von im flüssigen Stickstoff eingefrorenen und bei -80°C gelagerten Tumorfragmenten. Während der gesamten Prozedur wurde auf Eis gearbeitet, um eine Degradierung der RNA zu verhindern. Die Gewebeaufarbeitung erfolgte nach den in [Kapitel 2.9.3.3](#) beschriebenen Schritten.

Nach jedem Gewebe wurden alle Geräte inklusive Potter, Mörser und Pistillen gereinigt, um eine Kreuzkontamination der Proben zu verhindern. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin[®] RNA L Kits (Macherey-Nagel, Düren) bzw dem RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Das Herstellerprotokoll wurde strikt eingehalten. Es wurde jeweils für alle Gewebe mit 4.500 x g für 10 min zentrifugiert.

Die RNA-Quantität wurde mit dem NanoDrop[®] ND-1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) bestimmt. Die RNA-Qualität wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits (5067-1511, Agilent, Waldbronn) untersucht. Die Analyse erfolgte, wie im Herstellerprotokoll angegeben, mit dem Agilent Bioanalyzer 2100.

Falls eine Aufkonzentration der RNA nötig war, wurde dieser Schritt mit einer SpeedVac Christ[®] Zentrifuge (Vacuubrand, Wertheim) in low-retention Mikrozentrifugationsgefäßen (G. Kisker GbR, Steinfurt) durchgeführt. Anschließend wurde die RNA bei -20°C gelagert.

2.9.5.2 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalyse diente dazu Veränderungen auf Transkriptionsebene nach Bestrahlung abhängig von der Strahlmodalität zu charakterisieren. Es wurden folgende Komponenten verwendet (Agilent, Waldbronn): *Whole Rat Genome Kit 4 x 44k* (G4131F), Microarray-Abdeckung (G2534-60011), *Low Input Quick Amp Labeling Kit One-Color* (5190-2305), Genexpressionshybridisierungskit (5188-5242), *RNA-Spike In Kit One-Color* (5188-5282), gebrauchsfertiger SSPE Waschpuffer (5188-5327), Stabilisierungs- und Trocknungslösung (5185-5979).

Die Genexpressionsanalyse lief nach folgenden Schritten ab: Anfügen von Spike-Ins an die isolierte Total-RNA, cDNA-Synthese, cRNA-Synthese und Amplifikation, cRNA-Aufreinigung, Aufarbeitung der Hybridisierungsproben und Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5, 18 h- Hybridisierung, diverse Waschschritte, Scannen der Microarrays, Datenextraktion, statistische Analyse der Daten und Pathway- Analyse. Im ersten Schritt musste der One-Color Spike-In Mix mit den unter [Kapitel 2.9.5.1](#) vorbereiteten RNA- Proben versetzt werden. Dafür wurden zu 2 µl in Aqua dest. verdünnten Spike-Ins 200 ng RNA zugegeben. Diese angesetzten RNA-Spike-In Proben wurden bei Bedarf für 24 h bei -20°C gelagert. Die Markierungsreaktion der isolierten RNA mit den Detektionsfluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 sowie den Spike-Ins beginnt mit dem Umschreiben der RNA in cDNA mit dem T7 Promotor Mix. Dabei wurden die Primer und das Template bei 65°C für 10 min denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert.

Der cDNA Master Mix bestand aus 5x Erststrangpuffer, 0,1 M DTT, 10 mM dNTP Mix und dem AffinityScript RNase Block Mix. Damit erfolgte eine PCR- Reaktion für 2 h bei 40°C und eine Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 70°C. Die cDNA wurde nun in eine cRNA mit Hilfe des Transkriptionsmastermixes (bestehend aus: 5x Transkriptionspuffer, 0,1 M DTT, NTP Mix, Cyanine-3-CTP und T7-Polymerase Enzymmix) umgeschrieben (2 h, 40°C). Anschließend wurde die Cy3-gekoppelte amplifizierte cRNA mit dem *RNeasy Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 30 µl RNase- freiem Wasser eluiert. Die Quantifizierung der erhaltenen cRNA erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Die cRNA-Konzentration [ng / µl], das RNA- Absorptionsverhältnis (260 nm/280 nm) und die Cy3-Konzentration [pmol / µl] wurden bestimmt. Daraus ergab sich die spezifische Aktivität der Cy3-gefärbten cRNA. Die Berechnung erfolgte über die nachfolgenden beiden Formeln.

$$cRNA - Menge [\mu g] = \frac{\text{Konzentration (cRNA)} \times 30 \mu l \text{ Elutionsvolumen}}{1000}$$

$$\text{spezifische Aktivität der Cy3 - gekoppelten cRNA} \left[\frac{pmol}{\mu g} \right] = \frac{\text{Konzentration (Cy3)}}{\text{Konzentration (cRNA)}} \times 1000$$

Die Ausbeute muss dabei über 1,65 µg cRNA und die spezifische Aktivität über 6 pmol Cy3 pro µg cRNA liegen.

Danach erfolgte die Hybridisierung der Microarrays mit der cRNA. Die Cy3-gekoppelte amplifizierte RNA wurde für 30 min bei 60°C fragmentiert. Die fragmentierte RNA wurde mit dem Hybridisierungspuffer versetzt und auf das Microarray pipettiert. Das Microarray wurde in der zugehörigen Kammer im Hybridisierungssofen für 18 h bei 65°C inkubiert. Nach erfolgreicher Hybridisierung wurden diverse Waschschrte mit Wash Buffer 1 und 2 durchgeführt. Das Einscannen und die Datenextraktion erfolgten mit dem Agilent Scanner und einer Scan-Auflösung von 5 µm. Nach einer weiteren Software- gestützten Qualitätskontrolle konnten die Daten abschließend mit der Freeware SUMO-Software V1.60 (*Statistical Utility for Microarray and Omics data* implementiert von Christian Schwager) analysiert werden. Die Analyse der Daten wurde folgendermaßen durchgeführt:

Alle nicht- kodierenden Sequenzen (Kontrollhybridisierungen, Negativ- und Positiv- sowie Hintergrundkontrollen) und alle unbekanntes Gene wurden aus der Analyse herausgenommen. Des Weiteren wurden alle Gene mit einer zu schwachen Signalintensität (Grenzwert 1×10^7) verworfen, so dass für die Analyse 23.812 Gene übrig blieben.

Diese Gene wurden mit der Funktion „*quantile normalisation*“ und „*virtual pool normalization*“ normalisiert und anschließend log₂ transformiert.

Für den Vergleich von H- und HI-Tumoren wurde ein gepaarter zweiseitiger Student's t-Test verwendet. Eine einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse wurde für den Vergleich von unbestrahlten HI-Tumoren und den jeweiligen Zeitpunkten nach Photonen- und ¹²C- RT durchgeführt. Weiterhin wurden nur Gene mit bekannter Funktion in die Analyse einbezogen.

2.10 Charakterisierung von Tumorsubpopulationen

Verschiedene Tumorsubpopulationen wurden anhand ihres Ploidiestatus und Vorhandenseins bestimmter Oberflächenmarker durchflusszytometrisch und histologisch untersucht. Die Untersuchung erfolgte an unbehandelten AT1-, H- und HI-Tumoren des R3327 Prostata-tumorsystems.

2.10.1 Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen wurden einzeln und in Kombination mit verschiedenen Oberflächenmarkern durchgeführt, um eine Korrelation der Marker mit einzelnen Zellzyklusphasen bzw. dem Ploidiegehalt zu erhalten. Die Analyse erfolgte ausschließlich in Einzelzellsuspensionen, die aus kryokonserviertem, unbehandeltem Tumormaterial stammten.

2.10.1.1 Zellpräparation aus soliden Tumoren

Die Tumore wurden frisch aus unter CO₂- Atmosphäre getöteten Tieren präpariert und in DMEM- Medium (Biochrom, Berlin) mit 2% BSA (Serva, Heidelberg) überführt. Mit Hilfe von Einmalskalpellen (FST, Heidelberg) wurden sie in kleine ca. 1x1 mm große Stücke geschnitten. Anschließend wurde das Gewebe in CO₂- Independent Medium (Gibco / Life technologies, Darmstadt) überführt und in MACS C-Tubes mittels MACS-Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) zerkleinert. Danach wurde die Tumorsuspension (20 ml) mit 4 ml Kollagenase IV + 25 µl DNase I (beides von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt und im MACS Rotator (Miltenyi, Bergisch Gladbach) für 2 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 500 µl FCS (Biochrom, Berlin) die Reaktion abgestoppt und bei 1.600 rpm, 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 25 ml PBS gelöst und anschließend durch einen 40 µm Filter filtriert (BD Biosciences, Heidelberg). Die so erhaltenen Zellen konnten nun nachfolgend für die FACS- Sortierung (siehe [Kapitel 2.11.2](#)), Färbungen oder MACS-Anreicherung (siehe [Kapitel 2.11.1](#)) verwendet werden.

2.10.1.2 Zellzyklusbestimmung mit DAPI

Kryokonserviertes Material wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einer Petrischale aufgetaut. Die Tumorfragmente oder murines Prostatagewebe wurden mit 2,1%-iger Zitronensäure mit 0,5% Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überschichtet und kleingeschnitten. Anschließend wurden die Zellen in einem Reaktionsgefäß für 20 min bei Raumtemp. geschüttelt. 700 µl Zellsuspensionsüberstand wurden mit 2 µg / ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, PARTEC, Münster) in 4 ml Phosphatpuffer (7,1 g Na₂HPO₄ auf 100 ml

ddH₂O, pH8,0) gefärbt. Nach 30 min Inkubationsdauer wurde der DNA-Gehalt und die Zellzyklusverteilung an einem PAS II Durchflusszytometer (PARTEC, Münster) mit einer 100 W Quecksilberdampflampe gemessen. Es wurden die Filter KG1, BG38, UG1 für die Anregung und GG435 als AbgrenzungsfILTER sowie TK420 als dichroitischer Spiegel verwendet. Die Zellzyklusanalyse wurde mittels Multicycle Software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Es wurden jeweils 20.000 Zellen analysiert.

2.10.1.3 Antikörperfärbungen in soliden Tumoren (CD24, CD44, CD133, CD326, ZK 5 / 8, ZK 19)

Multiparametrische Analysen von Zelloberflächenmarkern und Zytokeratinen wurden mit kryokonserviertem, unbehandeltem Tumor- oder Prostatagewebe auf Eis durchgeführt. Die Einzelzellsuspensionen wurden über Filtrierung der Fragmente durch ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) hergestellt. Die Zellen wurden mit 4 ml Isolationspuffer (bestehend aus PBS (2,68 mM KCl; 136,89 mM NaCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 6,46 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O), 2 mM EDTA (Titriplex III, Merck, Darmstadt) und 0,5% BSA (Serva, Heidelberg) eingestellt auf pH7,2) versetzt. Das Protokoll ist aus Ehemann *et al.* [84], entnommen.

Durch Phasenkontrastmikroskopie wurde die intakte Struktur des Zellkerns und der Plasmamembran überprüft. Damit sich die Zellen absetzen konnten, wurden sie 15 min auf Eis gestellt. Aus der untersten Fraktion wurden nun 100 µl Zellen mit jeweils 10 µl Antikörperlösung für mindestens 30 min inkubiert. Für die direkte Zellmarkierung wurden CD24-PE (555428, BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA), CD44-FITC (ab 27285, Abcam, Cambridge, UK), CD133-PE (130080801, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), CD326-FITC (MCA1870FT, AbD Serotec, Düsseldorf) Antikörper verwendet. Eine indirekte Färbemethode musste für Zytokeratin 5 / 8 (sc-32328, Santa Cruz, Heidelberg) und Zytokeratin 19 (251400, Abbiotec, San Diego, USA) verwendet werden. Sie wurden jeweils mit einem AlexaFluor-488 konjugierten Sekundär-Ak (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene USA) nachgewiesen. Als Isotypkontrolle und für die Abgrenzung von positiven und negativen Zellen wurden PE-IgG und FITC-IgG (BD-Pharmingen, San Jose, USA) benutzt. Für die simultane Aufzeichnung des DNA-Gehaltes und der Zellzyklusverteilung wurde zusätzlich noch eine DAPI-Färbung durchgeführt. Vor der Messung wurde die Membranfärbung in einem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Es wurden jeweils 10.000 Zellen an einem Galaxy Pro Flow Durchflusszytometer (PARTEC, Münster) analysiert. Dabei wurde DAPI mit einer 100 W Quecksilberdampflampe, FITC und PE mit einem Argon Laser angeregt. Die FITC und PE-Fluoreszenzen wurden logarithmisch, DAPI hingegen linear gemessen. Die Datenanalyse multiparametrischer Messungen erfolgte mit der Flowmax Software (PARTEC, Münster), die Zellzyklusanalyse mit der Multicycle Software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Auf die Benutzung von Enzymen

und Zentrifugationsschritten wurde während der gesamten Präparation verzichtet, um die Oberflächenstrukturen der Zellmembranen nicht zu beeinflussen. Für jede Analyse wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und Mittelwerte \pm SD dieser Triplikate berechnet.

2.10.2 Zellkulturbedingungen

Für die Standardzellkultur wurde RPMI 1640-Medium oder DMEM-Medium (beide Gibco / Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Die Zellen wurden jeweils 1:5 in Medium mit 10% FCS (Biochrom, Berlin) und 10% Penicillin/ Streptomycin (Stammlösung: 10.000 U/ ml Penicillin/ 10.000 μ g/ ml Streptomycin (PAA, Cölbe)) passagiert. Für die Passage wurden die Zellen mit 5 ml Accutase (Invitrogen, Karlsruhe) und einem Zellschaber (SpectraLab, Ontario, Kanada) aus der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (Biochrom, Berlin) gewaschen und bei 1.600 rpm, 5 min, 4°C zentrifugiert und wieder in neue Zellkulturflaschen (Greiner, Nürtingen) ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ mit gesättigter Luftfeuchte.

2.10.2.1 Kryokonservierung von Zelllinien

Die in der Zellkultur gewachsenen Zellen werden in RPMI 1640-Medium (Gibco / Life Technologies, Darmstadt) mit 20% FCS (Biochrom, Berlin) und 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) kryokonserviert und dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.11 Tumorinduktionsanalyse mittels Limiting Dilution Assay (LDA)

Mit dem Ziel Tumor-induzierende Zellen zu identifizieren, wurde eine Tumorinduktionsanalyse mit dem sogenannten Limiting Dilution Assay (LDA) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Zellzahlen s.c. in Tiere appliziert und beobachtet, ob innerhalb von maximal 300 Tagen neue Tumore entstehen.

2.11.1 Anreicherung von CD24⁺ - Zellen mittels MACS

Die Präparation der Zellen erfolgte wie in [Kapitel 2.11.2](#) beschrieben. Die vereinzelt Zellen wurden in CO₂-Independent Medium (Gibco / Life Technologies, Darmstadt) mit 1% BSA durch ein 40 µm Sieb gefiltert und anschließend zweimal mit 10 ml PBS / 1% BSA gewaschen (1.600 rpm, 5 min, 4°C). Die in 100 µl PBS / 1% BSA resuspendierten Zellen wurden mit CD24-PE (BD, Heidelberg, Katalognummer: 562104), 1:100 in PBS / 1% BSA verdünnt, für 30 min auf Eis gefärbt. Damit die CD24⁺ - Zellen durch magnetische Beads angereichert werden konnten, mussten die Zellen im Verhältnis 1:5 mit anti-PE Microbeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach) für 30 min auf Eis gefärbt werden. MACS Microbeads sind 50 nm große superparamagnetische Kolloid-Partikel, die mit einem hoch spezifischen Antikörper gekoppelt sind (hier PE). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die CD24⁺ - Zellen mit dem AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aufgereinigt. Anschließend wurde die Erfolgsquote mittels FACS- Analyse bestimmt.

Für die FACS- Analyse wurden die gefärbten Zellen erneut in 1 ml PBS / 1% BSA gewaschen (1.600 rpm, 5 min, 4°C) und in 500 µl resuspendiert. Danach wurden die Zellen gefiltert (Porengröße: 40 µm) und in Polypropylen-Reaktionsgefäße (352053, BD, Heidelberg) überführt (Polystyrene Reaktionsgefäße dürfen nicht verwendet werden). Die Messung erfolgte am Cyan ADP MLE Durchflusszytometer (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Die Analyse Parameter wurden mittels Isotypkontrollen und ungefärbten Zellen eingestellt.

2.11.2 Zellsortierung aus soliden Tumoren mit dem FACS

Die Zellaufarbeitung erfolgte wie in [Kapitel 2.10.1.1](#) beschrieben. Nach zwei weiteren Waschschriften mit 1 ml PBS wurden je 100 µl Zellen (1×10^6) mit 10 µl CD24-PE (562104, BD, Heidelberg) und 10 µl CD45-APC (17-0461, eBioscience, San Diego, CA, USA) sowie 2 µl Propidiumjodid (1 mg / ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 30 min im Dunkeln auf Eis gefärbt. Anschließend wurde ein weiteres Mal mit 1 ml PBS gewaschen, die Zellen durch ein 40 µm Sieb gefiltert und in PBS mit 1% BSA und Rock Y-27632-Inhibitor (10 µM, Tocris Bioscience, Bristol, UK) gelöst. Für die FACS- Sortierung (FACS Aria, BD, Heidelberg) wurden Polypropylen-Reaktionsgefäße (352063, BD, Heidelberg) verwendet. Es wurden CD24⁺/CD45⁻, CD24⁻/CD45⁻ sortiert. Die Analyse Parameter wurden mittels Isotypkontrollen, einzelgefärbten Zellen und ungefärbten Zellen eingestellt. Die Sortierung dauerte abhängig von der Ausgangszahl an CD24⁺/CD45⁻-Zellen zwischen 4 und 8 Stunden, solange wurden die Zellen auf Eis gelagert. Nach erfolgreicher FACS- Sortierung wurden die Zellen entweder *in vitro* kultiviert (siehe [Kapitel 2.11.3](#)) oder aber mit unterschiedlichen Zellzahlen in Tiere injiziert (siehe [Kapitel 2.11.4](#) und [2.11.5](#)).

2.11.3 Etablierung von Tumorzelllinien *in vitro*

Da keine *in vitro* Kultivierung für die drei Sublinien zur Verfügung steht, sollte eine Etablierung der Zellkultur angestrebt werden. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum Einen wurden die aus der MACS-Anreicherung (siehe [Kapitel 2.11.1](#)) bzw. FACS-Sortierung (siehe [Kapitel 2.11.2](#)) gewonnen Zellen direkt in verschiedene Zellkulturflaschen mit CO₂-Independent Medium (Gibco / Life Technologies, Darmstadt) ausgesät. Es wurden verschiedene Zellkulturflaschen (Greiner white-cap, red-cap, blue-cap und verschiedene Primaria Flaschen für Adhäsionszellkultur) für die Initialzellkultur verwendet, um die Ausbeute zu erhöhen. Zum Anderen wurden unbehandelte, frisch aus dem Tier präparierte Tumore vereinzelt (siehe [Kapitel 2.10.1.1](#)) und in unterschiedliche Medien (RPMI 1640, DMEM, CO₂-Independent Medium) ausgesät. Die Zellen wurden je nach Konfluenz passagiert (siehe [Kapitel 2.10.2](#)).

2.11.4 Etablierung von Tumorzelllinien *in vivo*

Die aus der MACS-Anreicherung (siehe [Kapitel 2.11.1](#)), FACS- Sortierung (siehe [Kapitel 2.11.2](#)) oder Zellkultur (siehe [Kapitel 2.11.3](#)) entnommenen Zellen wurden mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt und gezählt (Neubauer-Zählkammer). Die Zellen wurden bei 1.600 rpm, 5 min bei 4°C zentrifugiert und in PBS (Volumen abhängig von der Zellzahl) aufgenommen. Die Zellen wurden bis zur Injektion im Verhältnis 1:1 mit Matrigel gemischt (BD, Cat. No. 356234) auf Eis gelagert. 100 µl der Matrigel- Zellsuspension wurden mit einer 20 G Kanüle (BD, Heidelberg) subkutan in die rechten und linken Oberschenkel von männlichen Copenhagen-Ratten injiziert. Die stabilisierende Matrigel- Matrix wurde innerhalb einer Woche resorbiert.

2.11.5 Limiting Dilution Assay (LDA)

Ziel des LDA ist die Bestimmung der Tumor- induzierenden Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Lebendzellzahl. Damit kann ermittelt werden, wie viele Zellen nötig sind, um einen Tumor im Tier zu etablieren. Das Injektionsverfahren ist in [Kapitel 2.11.4](#) beschrieben. Die Zellzahlen wurden mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor: 10.000) bestimmt und in seriellen Verdünnungsreihen für die Injektionen eingestellt. Die injizierten Zellzahlen sind abhängig von der Menge sortierter Zellen. Für die HI-Sublinie konnte eine Zellzahl von 10 bis 200.000 injiziert werden, für den H-Tumor 10 bis 100.000 Zellen. Da der AT1 nur 0,5% CD24⁺/CD45⁻ - Zellen enthielt, war die Ausbeute so gering, dass nur Zellzahlen von 10 bis 1.000 Zellen injiziert werden konnten. Als Kontrolle wurden Sortierungen von CD24⁻/CD45⁻ - Zellen mit einer Zellzahl bis 500.000 Zellen injiziert.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumskurven

3.1.1 R3327-H Tumore

Die Charakterisierung der Strahlenreaktion eines Tumors erfolgte über die volumetrische Messung. Die Wachstumskurven zeigen hierbei die Volumenänderungen des Tumors nach Bestrahlung, bezogen auf das Ausgangsvolumen zum Bestrahlungszeitpunkt.

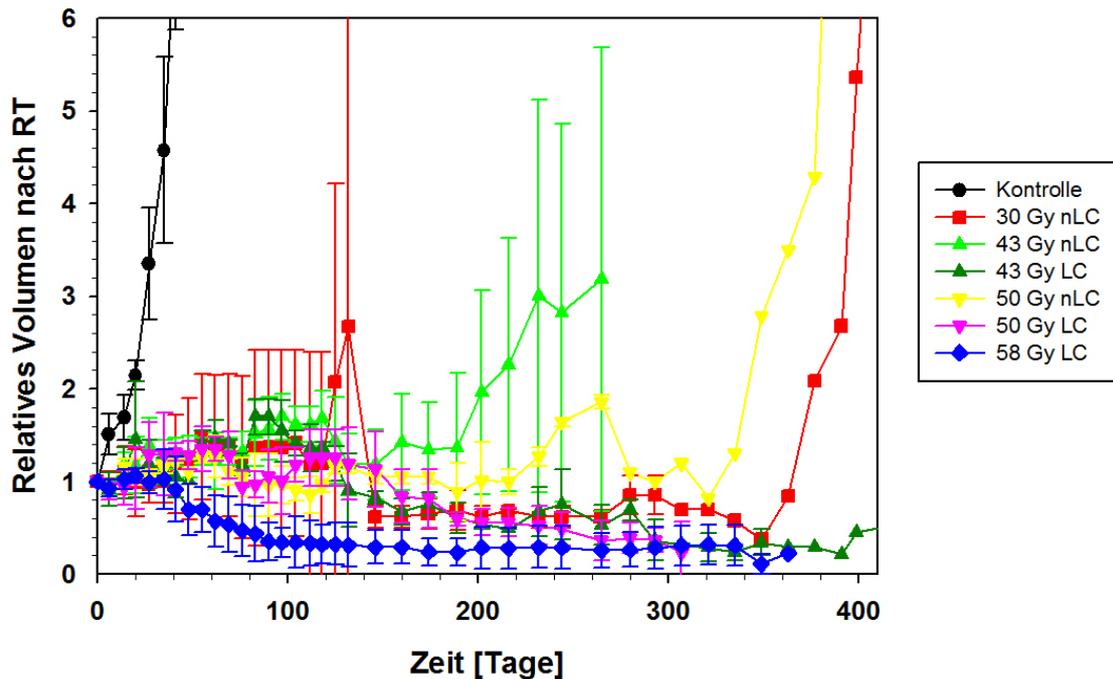


Abb. 6: Repräsentative Wachstumskurven des H-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx Photonen in Abhängigkeit von der Zeit. Kontrolltumore sind unbehandelt. Das Wachstumsverhalten wurde separat für lokal kontrollierte (LC) und lokal unkontrollierte (nLC) Tumore dargestellt. Die Wachstumskurven wurden auf das Ausgangsvolumen zum Bestrahlungszeitpunkt (Tag 0) normiert. Die Symbole spiegeln die Mittelwert \pm SD wider.

Zur besseren Darstellung der Wachstumskurven nach 1 Fx Photonen sind in **Abb. 6** nur einige wenige Dosisgruppen dargestellt. Des Weiteren sollen sie den Volumenverlauf für nicht kontrollierte (nLC) und lokal kontrollierte (LC) Gruppen erklären. Unbehandelte Tumore (Kontrolle) erreichten innerhalb kürzester Zeit das 5-fache ihres Ausgangsvolumens. In den bestrahlten Gruppen war die Wachstumsverzögerung Dosis-abhängig. Unabhängig vom lokalen Kontrollstatus zeigte sich eine geringfügige Volumenzunahme innerhalb der ersten 3 Wochen nach Bestrahlung. Danach konnte eine Dosis-abhängige Volumenabnahme (43, 50, 58 Gy) oder aber eine weitere Volumenzunahme (30 Gy) beobachtet werden. Auch lokal nicht kontrollierte Tumore (alle nLC- Gruppen) zeigten zunächst eine Volumenabnahme bevor das Wachstum erneut einsetzte. Die lokal kontrollierten Tumore (alle LC- Gruppen) schrumpften bis zu einem konstanten Volumen und zeigten innerhalb der Beobachtungszeit keine erneute Volumenzunahme.

Für den hoch differenzierten H-Tumor blieb in allen lokal kontrollierten Gruppen ein kleines Restvolumen zurück. Aus diesem Grund und wegen des langsamen Tumorwachstums wurde die Beobachtungszeit auf 400 Tage erhöht. Dies hatte eine bessere Erkennung von Rezidiven zur Folge, deren Wachstumsstatus zum Zeitpunkt 300 Tage nicht eindeutig zu bestimmen war. Bei 30 Gy waren alle Tumore unkontrolliert, hingegen bei 58 Gy waren alle Tumore kontrolliert. Grundsätzlich sind die Wachstumskurven für Photonen und ^{12}C - Ionen sehr ähnlich. Allerdings scheint die Wachstumsverzögerung für ^{12}C - Ionen noch länger zu sein (Abb. 7). Außerdem verhielten sich die Gruppen bzw. die Rezidivzeitpunkte in den ^{12}C - bestrahlten Gruppen homogener, so dass sich kleinere Standardabweichungen ergaben. Schließlich war die Volumenzunahme in den ersten Wochen nach ^{12}C - Bestrahlung nicht so ausgeprägt.

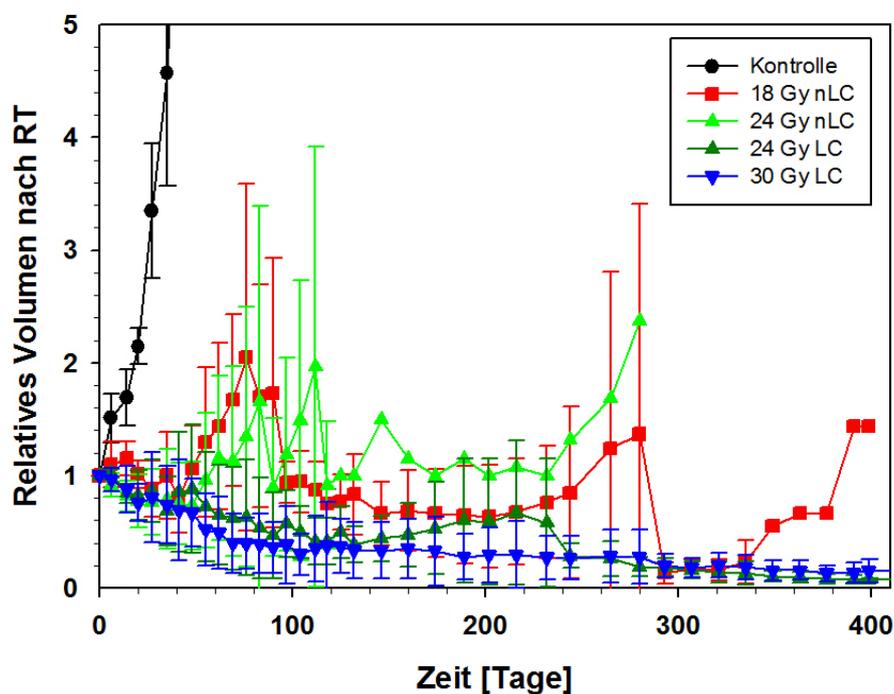


Abb. 7: Repräsentative Wachstumskurven des H-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx ^{12}C - Ionen in Abhängigkeit von der Zeit. Kontrolltumore sind unbehandelt. Das Wachstumsverhalten wurde separat für lokal kontrollierte (LC) und lokal unkontrollierte (nLC) Tumore dargestellt. Die Wachstumskurven wurden auf das Ausgangsvolumen zum Bestrahlungszeitpunkt (Tag 0) normiert. Die Symbole spiegeln die Mittelwerte \pm SD wider.

Es wurden nur die Wachstumskurven für Einzeitbestrahlungen (1 Fx) abgebildet, da die Wachstumskurven für Einzeit- und Zweifachbestrahlungen (2 Fx) vergleichbar sind.

Anhand der Rezidive in den unterschiedlichen Dosisgruppen lässt sich der Zeitpunkt des erneuten Tumorwachstums nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis untersuchen. In **Abb. 8** ist der Zeitpunkt der ersten detektierbaren Volumenzunahme gegen die Dosis aufgetragen. Die Rezidivbildung zeigte eine deutliche Dosis- Abhängigkeit. Je höher die bestrahlte Dosis desto später erfolgte das Tumorrezidiv. Dieses Verhalten ist unabhängig von der Strahlqualität. Für die 2 Fx Experimente ist die Abhängigkeit nur schwach

ausgeprägt, was vermutlich an den sehr hohen Bestrahlungsdosen und den entsprechend wenigen beobachteten Rezidiven lag. Inzwischen wurden weitere Bestrahlungsdosen (< 24 Gy für ^{12}C - Ionen und < 50 Gy für Photonen) hinzugefügt. Diese Experimente befinden sich derzeit noch in der Nachbeobachtung, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage über deren Rezidivzeitpunkte gemacht werden kann.

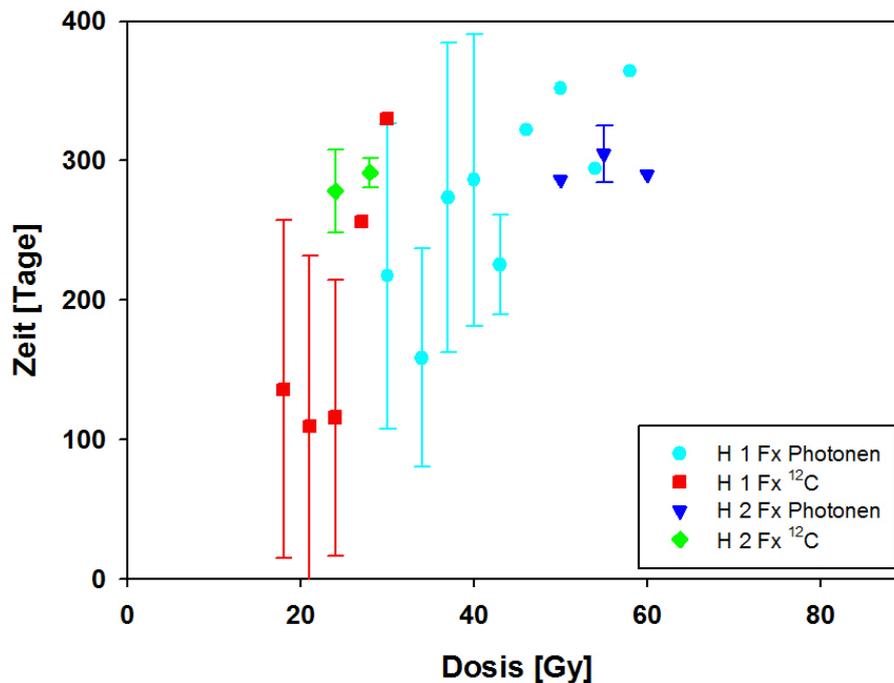


Abb. 8: Zeitpunkt der Rezidive des H-Tumors in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Es wurde die erste detektierbare Volumenzunahme des Tumorrezidivs gemessen und pro Dosisgruppe jeweils getrennt für Photonen und ^{12}C sowie Einzeit- oder Zweifachbestrahlung aufgetragen. Die Symbole zeigen Mittelwert \pm SD.

3.1.2 R3327-HI Tumore

Auch für den HI-Tumor wurden Wachstumskurven nach 1 und 2 Fx Photonen- bzw. ^{12}C - Ionen erstellt. Der Verlauf der Kurven ist vergleichbar mit den Wachstumsverzögerungskurven des H-Tumors (siehe [Kapitel 3.1.1](#)). Für eine bessere Übersicht werden nur eine unbehandelte Kontrolle, eine komplett unkontrollierte, eine komplett lokal kontrollierte Dosisgruppe, sowie eine Dosisgruppe mit sowohl kontrollierten als auch unkontrollierten Tieren gezeigt ([Abb. 9](#) und [Abb. 10](#)). Die Wachstumskurven zeigen eine Volumenversechsfachung von unbehandelten HI-Kontrolltumoren innerhalb von 2 Wochen. Insgesamt sind die Wachstumskurven von Photonen- und ^{12}C - bestrahlten Tumoren sehr ähnlich, auffallend ist aber die längere Wachstumsverzögerung bei unkontrollierten Tumoren nach ^{12}C - RT im Vergleich zu isoeffektiven Photonendosen (z.B. 45 Gy Photonen vs. 17 Gy ^{12}C). Außerdem konnten spät- auftretende Rezidive nach Photonen RT zwischen Tag 120 bis 150 detektiert werden ([Abb. 9](#)).

In der 65 Gy Photonengruppe (**Abb. 9** rechte gelbe Kurve) und auch bei 29 Gy ^{12}C (**Abb. 10** grüne rechte Kurve) gab es jeweils ein Tier mit sehr langer Latenzzeit (d.h. Zeit, die bis zum Auftreten eines Rezidivs vergeht).

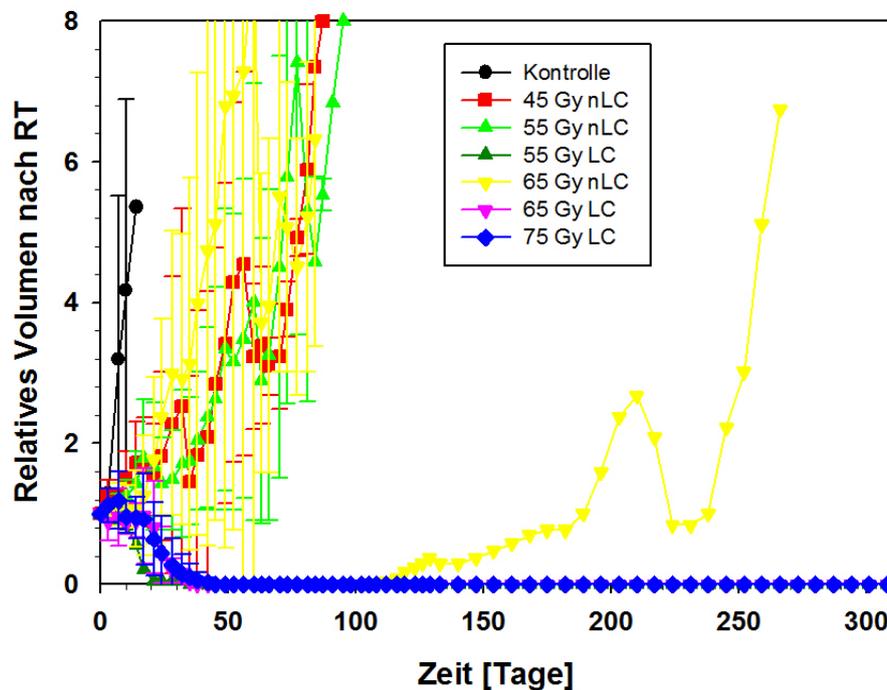


Abb. 9: Repräsentative Wachstumskurven des HI-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx Photonen in Abhängigkeit von der Zeit. Kontrolltumore sind unbehandelt. Das Wachstumsverhalten wurde separat für lokal kontrollierte (LC) und lokal unkontrollierte (nLC) Tumore dargestellt. Die Wachstumskurven wurden auf das Ausgangsvolumen zum Bestrahlungszeitpunkt (Tag 0) normiert. Die Symbole spiegeln die Mittelwerte \pm SD wider.

Hingegen traten bei ^{12}C -bestrahlten Tumoren die Rezidive oft erst nach Tag 200 auf (**Abb. 11**). Allerdings ist in den 100% lokal kontrollierten Gruppen (75 Gy Photonen und 37 Gy ^{12}C) kein Unterschied zu finden, in beiden Fällen waren ab 50 Tagen keine Tumore mehr bis zum Tag 300 detektierbar. Insgesamt liefen die Volumenveränderungen des HI nach Bestrahlung deutlich schneller ab als bei H-Tumoren. In lokal kontrollierten HI-Tumoren war unabhängig von der Strahlqualität kein palpierbarer Tumorrest mehr vorhanden.

Für den HI-Tumor wurde eine Rezidivbildung als Volumenzunahme oder erstes Wiederauftreten eines palpierbaren Tumors (bei vorher komplett verschwundenem Tumor) definiert. Hierbei wurde eine klare Dosis-Abhängigkeit der Rezidiventstehung für ^{12}C -bestrahlte HI-Tumore (1 Fx und 2 Fx) gefunden (**Abb. 11**). In den Experimenten mit Photonen-Bestrahlung ergab sich keine Dosis-Abhängigkeit, über einen weiten Dosisbereich lagen die Rezidivzeitpunkte bei 50 bis 100 Tagen. Diese Beobachtung war unabhängig von der Anzahl an Fraktionen.

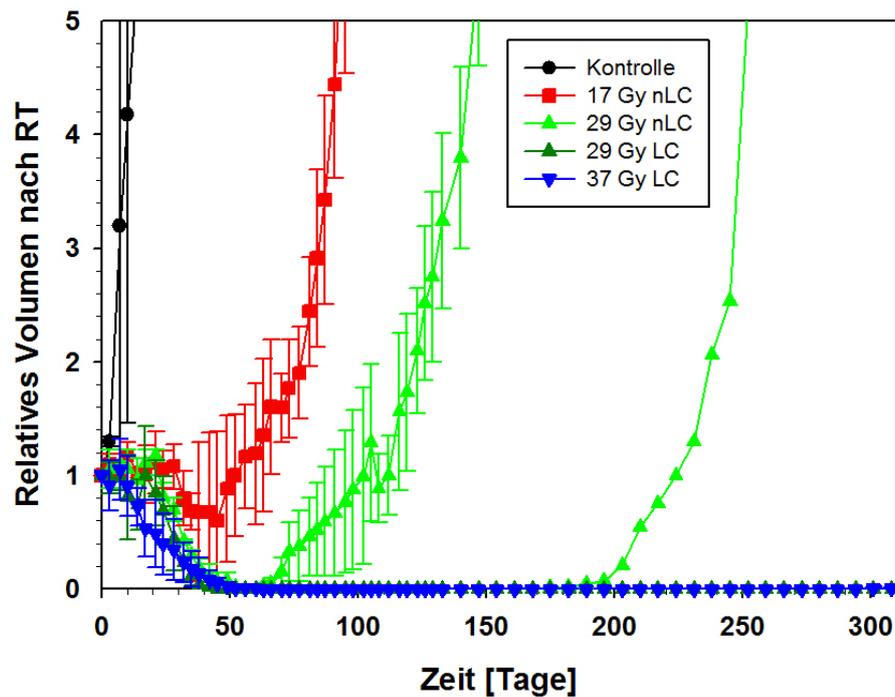


Abb. 10: Repräsentative Wachstumskurven des HI-Tumors für verschiedene Dosisgruppen nach 1 Fx ^{12}C - Ionen in Abhängigkeit von der Zeit. Kontrolltumore sind unbehandelt. Das Wachstumsverhalten wurde separat für lokal kontrollierte (LC) und lokal unkontrollierte (nLC) Tumore dargestellt. Die Wachstumskurven wurden auf das Ausgangsvolumen zum Bestrahlungszeitpunkt (Tag 0) normiert. Die Symbole spiegeln die Mittelwerte \pm SD wider.

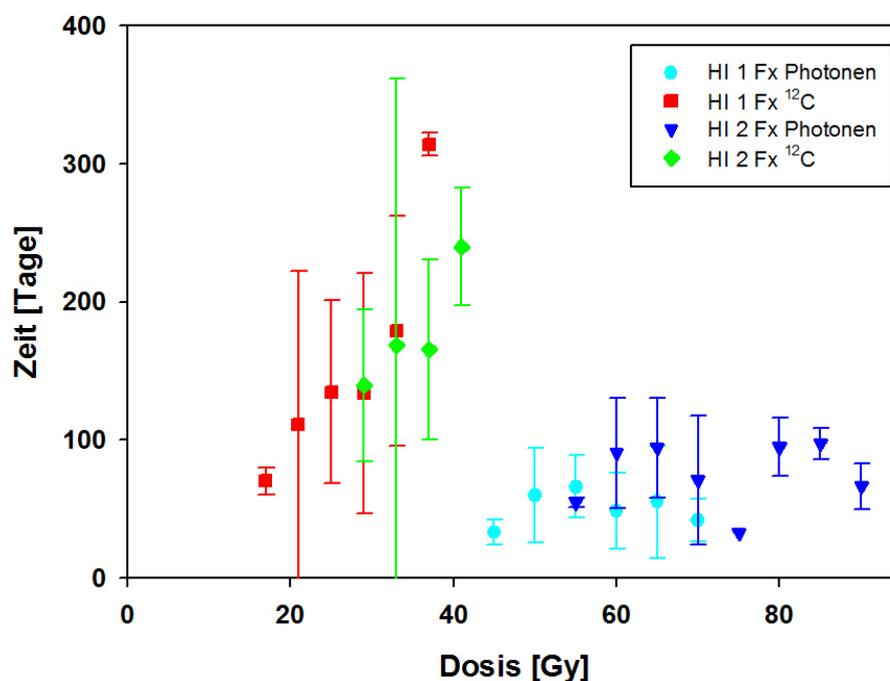


Abb. 11: Zeitpunkt der Rezidive des HI-Tumors in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Die erste detektierbare Volumenzunahme oder Palpierbarkeit des Tumorrezidivs wurde gemessen und pro Dosisgruppe jeweils getrennt für Photonen und ^{12}C sowie Einzeit- oder Zweifachbestrahlung aufgetragen. Die Symbole zeigen Mittelwert \pm SD.

3.2 Dosis-Wirkungskurven

Basierend auf den Wachstumskurven wurde festgestellt, ob ein Tumor zum Zeitpunkt 300 Tage nach Bestrahlung lokal kontrolliert war oder nicht. An die pro Dosispunkt bestimmten aktuarischen Tumorkontrollraten wurden anschließend Dosis-Wirkungskurven (DWKs) angepasst. Diese beschreiben die Wahrscheinlichkeit einer lokalen Kontrolle des Tumors in Abhängigkeit von der Dosis.

3.2.1 Einzeitbestrahlungen (1 Fx)

Nachfolgend sind die DWKs für einzeitbestrahlte H-, HI- und AT1-Tumore mit Photonen und ^{12}C ([Abb. 12](#)) abgebildet. Die Ergebnisse der AT1-Sublinie dienen als Vergleichswert für einen anaplastischen/undifferenzierten Tumor.

Für den H- und HI-Tumor wurden zwei verschiedene Endpunkte zur Bestimmung der DWKs gewählt. In Anlehnung an die Ergebnisse des AT1 wurde lokale Tumorkontrolle nach 300 Tagen als primärer Endpunkt verwendet.

Die Photonen- DWKs für den hoch differenzierten H-Tumor und den moderat differenzierten HI-Tumor liegen wie erwartet bei höheren Dosen als die ^{12}C - DWKs, allerdings ist der Abstand beider Kurven wesentlich geringer als beim anaplastischen AT1. Dabei hat sich die Photonen- DWKs für den H-Tumor deutlich an die ^{12}C - DWKs angenähert. Für den HI-Tumor liegt die Photonen- DWKs nur bei etwas kleineren Dosen, als die AT1- DWK.

Insgesamt verschieben sich die ^{12}C - DWKs nur geringfügig zu höheren Dosen mit abnehmender Differenzierung (H → HI → AT1). In den Photonen- DWKs ist dieser Verschiebungseffekt jedoch wesentlich ausgeprägter. Dies bestätigt eine höhere Effektivität der ^{12}C - Ionen für alle drei Sublinien, die mit dem Entdifferenzierungsgrad des Tumors zunimmt.

Wie bereits in den Wachstumskurven veranschaulicht ([Abb. 6](#) und [Abb. 7](#)), blieb nach Bestrahlung von H-Tumoren ein Restvolumen zurück, in dem eventuell wiederauftretende Rezidive aufgrund der geringen Wachstumsgeschwindigkeit dieses Tumors nur sehr schwer zu erkennen waren. Daher wurden die Restknoten nach 300 Tagen entnommen und histologisch auf ihre Proliferationsfähigkeit untersucht. Mit diesem Parameter wurde der zweite Endpunkt „die Abwesenheit von proliferierenden Tumorzellen“ definiert ([Abb. 12](#)). Es zeigte sich, dass die DWKs für diesen sekundären Endpunkt zu höheren Dosen tendieren, wobei die Verschiebung bei Photonen ausgeprägter war. Allerdings wurde auf Grundlage des sekundären Endpunktes der biologische Endpunkt 100% lokale Tumorkontrolle bei keiner der mit Photonen und Kohlenstoffionen applizierten Strahlendosen erreicht.

Im Vergleich zu den generell sehr steilen ^{12}C - DWKs und den Photonen- DWKs des AT1 ist die deutliche Abflachung der Photonen- DWKs für HI- und insbesondere H-Tumore besonders auffallend.

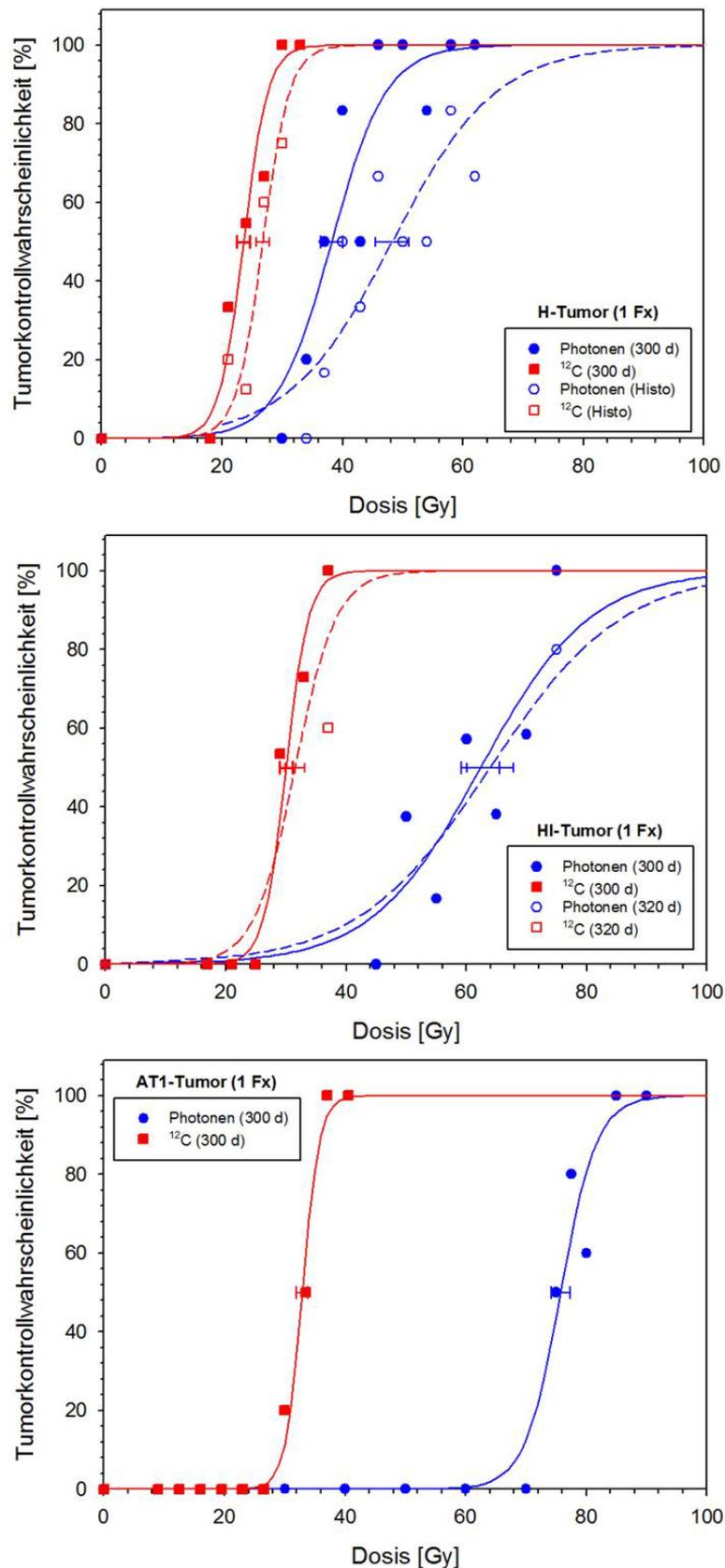


Abb. 12: Dosis-Wirkungskurven nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C von H- (oben), HI- (Mitte) und AT1-Tumor [52] (unten). Tumorkontrollwahrscheinlichkeiten sind in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis aufgetragen. Der Standardfehler des TCD_{50} -Wertes ist eingezeichnet. Die durchgezogenen Linien beziehen sich auf den Endpunkt lokale Kontrolle nach 300 Tagen Beobachtungszeit. Zusätzlich wurde ein zweiter Endpunkt („Histo“ für den H-Tumor und „320 d“ für den HI-Tumor) eingeführt (gestrichelte Linien, ungefüllte Symbole).

Der HI-Tumor zeigte normalerweise deutlich unterhalb der Beobachtungszeit von 300 Tagen Rezidivbildung (**Abb. 11**), aber für einzeitbestrahlte HI-Tumore konnten jeweils in der höchsten Dosisgruppe für Photonen- (1 Rezidiv nach 305 d) und ^{12}C - RT (2 Rezidive nach 320 d) Rezidive später als 300 Tage nach Bestrahlung detektiert werden. Deshalb wurde die Analyse auch für den sekundären Endpunkt „lokale Kontrolle nach 320 Tagen“ durchgeführt.

Es lässt sich feststellen, dass die Analyse der DWKs nach 320 Tagen, in denen jeweils ein lokal kontrolliertes Tier in den höchsten Dosisgruppen zu einem unkontrollierten Tier herabgestuft wird, kaum Einfluss auf den TCD_{50} - Wert hat.

3.2.2 Zweifachbestrahlungen (2 Fx)

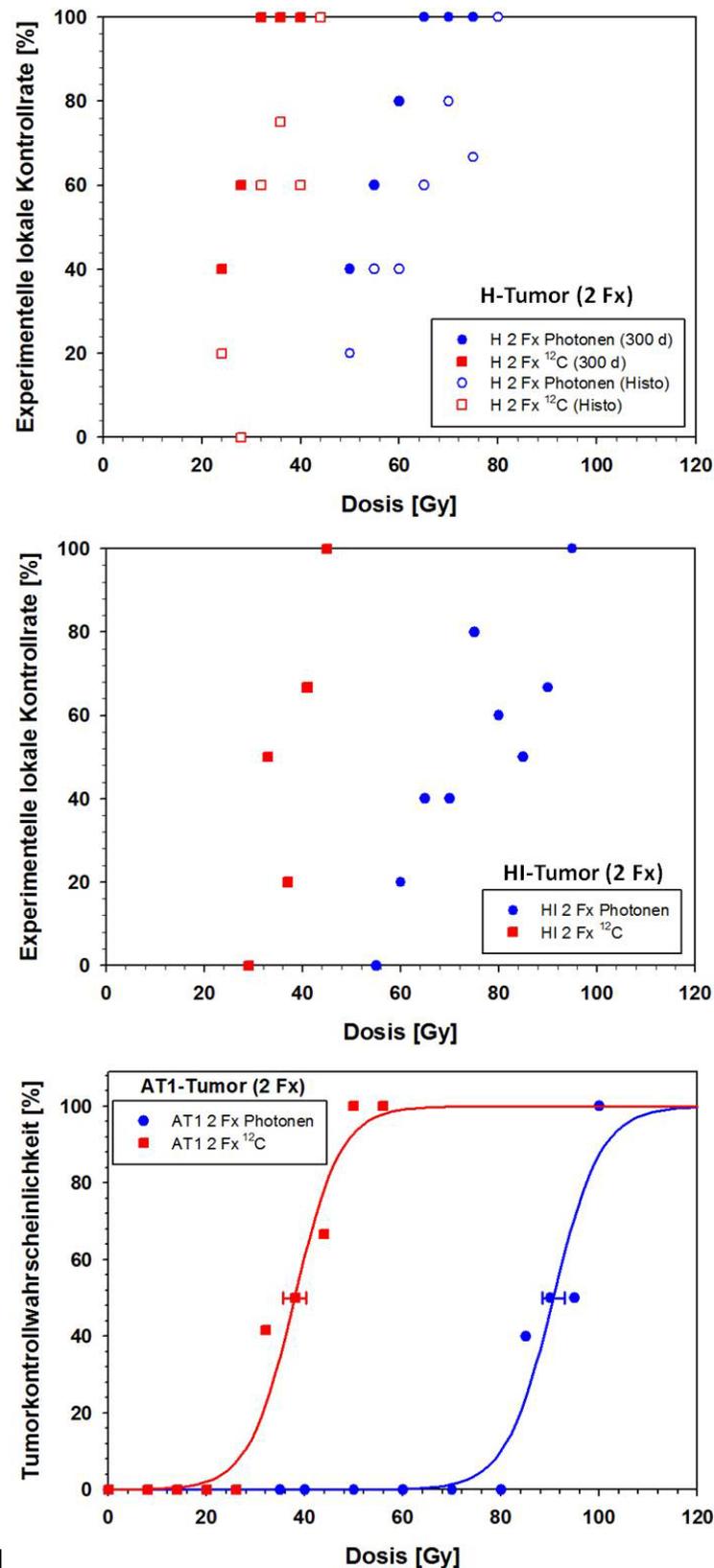
Neben den Einzeitbestrahlungen (**Abb. 12**) wurden auch Zweifachbestrahlungen (**Abb. 13**) durchgeführt. Der Verlauf aller 2 Fx DWKs ist mit den 1 FX DWKs vergleichbar.

Wie erwartet, verschiebt sich die Gesamtdosis bei 2 Fx hin zu höheren Dosen. Dabei erhöht sich der TCD_{50} -Wert für ^{12}C - bestrahlte AT1-Tumoren nur leicht, während er für Photonen um mehr als 10 Gy ansteigt. Dadurch wird der Abstand zwischen beiden DWKs für 2 Fx größer.

Für den H-Tumor haben die verwendeten Bestrahlungsdosen nur den oberen Teil der DWK abgedeckt. Daher wurde ein weiteres Experiment mit zusätzlichen Dosispunkten im unteren Bereich der DWK durchgeführt (35 bis 50 Gy für Photonen bzw. 16 und 20 Gy für ^{12}C), das sich allerdings noch in der Nachbeobachtungszeit befindet. Deswegen konnten an diese Daten keine DWKs angepasst, sondern nur TCD_{50} - Werte abgeschätzt, werden. Die Photonen-DWK für 2 Fx ist im Vergleich zu der ^{12}C - DWK deutlich stärker zu höheren Dosen hin verschoben, was wiederum auch für den H-Tumor zu einer Vergrößerung des Abstandes der beiden Kurven und damit zu einer höheren relativen biologischen Effektivität führt.

Auch für 2 Fx-RT wurde der sekundäre Endpunkt „histologische Abwesenheit von proliferierenden Tumorzellen“ untersucht. Wie bereits für 1 Fx ersichtlich (**Abb. 12**), führt die Einführung dieses sekundären Endpunktes zu einer Verschiebung der Datenpunkte zu höheren Dosen (**Abb. 13**). Insgesamt ändert sich das Verhältnis von Photonen- zu ^{12}C - DWKs nicht, da beide Kurven ungefähr um den gleichen Wert zu höheren Dosen hin verschoben sind. Eine genaue Aussage wird aber erst nach Berechnung kompletter DWKs mit Dosisgruppen, die 100% und 0% lokale Kontrolle enthalten, möglich sein. Im Vergleich zum AT1 müssen deutlich geringere Photonendosen appliziert werden um den H-Tumor lokal zu kontrollieren. Im Gegensatz dazu sind die ^{12}C - Dosen nur unwesentlich geringer.

Da die Beobachtungszeit der 2 Fx-RT für HI-Tumore gerade erst beendet wurde, wurden aus den experimentellen Daten noch keine kompletten DWKs berechnet, sondern nur der Wert für TCD_{50} abgeschätzt. Auch für 2 Fx ist der Kurvenverlauf für Photonen-RT deutlich flacher als für ^{12}C - RT. Beide Kurven sind unabhängig von der Strahlqualität nach rechts zu höheren Dosen hin verschoben, der Abstand ist vergleichbar zur 1 Fx-RT (**Abb. 12**).



21

Abb. 13: Dosis-Wirkungskurven nach 2 Fx Photonen oder ^{12}C von H- (oben), HI- (Mitte) und AT1-Tumor [52] (unten). Tumorkontrollwahrscheinlichkeiten sind in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis aufgetragen. Der Standardfehler des TCD_{50} -Wertes ist eingezeichnet (AT1). Die durchgezogenen Linien beziehen sich auf den Endpunkt lokale Kontrolle nach 300 Tagen Beobachtungszeit. Zusätzlich wurde ein zweiter Endpunkt („Histo“ für den H-Tumor) eingeführt (ungefüllte Symbole). Bisher wurden keine kompletten DWKS für H- und HI-Tumor berechnet, da die Beobachtungszeit noch nicht (H) bzw. erst kürzlich beendet wurde (HI).

Da später als 300 Tage keine Rezidive mehr detektiert wurden, gibt es für die 2 Fx nur eine Analyse mit dem primären Endpunkt.

3.3 Relative biologische Wirksamkeit (RBW) von Kohlenstoffionen

In **Tab. 6** sind die aus den DWKs (**Abb. 12**, **Abb. 13**) erhaltenen TCD₅₀-Werte eingetragen.

Nach Einzeitbestrahlung nimmt die RBW auf Grundlage des primären Endpunktes „lokale Tumorkontrolle“ mit abnehmendem Differenzierungsgrad (H > HI > AT1) von $1,62 \pm 0,11$ auf $2,30 \pm 0,08$ zu. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Erhöhung der RBW v.a. auf dem stärkeren Anstieg der TCD₅₀-Werte für Photonen mit zunehmender Differenzierung basiert.

Tab. 6: Übersicht der TCD₅₀-Werte und zugehörige RBW-Werte von H-, HI- und AT1-Tumoren mit 1 Fx oder 2 Fx Photonen- und ¹²C- RT. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar. Für 2 Fx Experimente des H- und HI-Tumors wurden wegen noch laufender bzw. erst gerade abgeschlossener Nachbeobachtungen nur Abschätzungen angegeben.

Endpunkt	TCD ₅₀ [Gy]		RBW
	Photonen	Kohlenstoffionen	
1 Fraktion			
H-Tumor			
LC (300 d)	38,2 \pm 1,8	23,6 \pm 1,1	1,62 \pm 0,11
Histo	48,3 \pm 2,8	26,8 \pm 1,0	1,80 \pm 0,13
HI-Tumor			
LC (300 d)	62,4 \pm 3,2	30,0 \pm 1,1	2,08 \pm 0,13
LC (320 d)	63,9 \pm 3,9	31,6 \pm 1,6	2,03 \pm 0,16
AT1-Tumor	75,7 \pm 1,6	32,9 \pm 0,9	2,30 \pm 0,08
2 Fraktionen			
H-Tumor			
LC (300 d)	\approx 52	\approx 27	\approx 1,9
Histo	\approx 62	\approx 30	\approx 2,0
HI-Tumor			
LC (300 d)	\approx 75	\approx 36	\approx 2,1
AT1-Tumor	90,6 \pm 2,3	43,7 \pm 2,3	2,67 \pm 0,15

Die Einführung des sekundären Endpunktes „lokale Kontrolle nach 320 Tagen“ für den HI-Tumor lieferte keine nennenswerte Veränderung der RBW, da sich die TCD₅₀-Werte im selben Verhältnis leicht erhöhen. Im Gegensatz hierzu beeinflusst der sekundäre biologische Endpunkt „histologische Abwesenheit von proliferierenden Tumorzellen“ die RBW erheblich,

weil dadurch der TCD_{50} -Wert für ^{12}C - RT nur um 3 Gy, aber für Photonen- RT mehr als 10 Gy zunimmt.

Bei Aufteilung der applizierten Strahldosis in zwei Fraktionen im Abstand von 24 Stunden ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Hier waren die vorläufigen RBW-Werte für 2 Fx-bestrahlte HI-Tumore nur unwesentlich höher als für 1 Fx und damit nur geringfügig höher als der RBW für 2 Fx des H-Tumors. Dies ist konträr zum AT1-Tumor, bei dem ein deutlicher Anstieg des RBW von 1 Fx zu 2 Fx beobachtet wurde.

3.4 Fraktionierungsverhalten

Aus dem Vergleich der 1 Fx und 2 Fx Studien ergab sich eine Verschiebung der DWKs und somit der TCD_{50} -Werte für 2 Fx zu höheren Dosen hin. Diese Verschiebung war für den AT1-Tumor sehr stark ausgeprägt und auch für den HI-Tumor deutlich zu beobachten (**Tab. 6**). Dagegen zeigen die vorläufigen Daten für den H-Tumor nur eine marginale Verschiebung der Dosen zwischen 1 und 2 Fx Experimenten.

Die Erhöhung des RBWs mit zunehmender Fraktionenzahl ergibt sich durch eine stärkere Erhöhung der TCD_{50} -Werte für Photonen als für ^{12}C - Ionen bei 2 Fx.

Zur Berechnung zuverlässiger effektiver α/β -Werte müssen die Ergebnisse der 6 Fx Experimente abgewartet werden.

3.5 Mechanistische Untersuchungen

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den zugrundeliegenden Mechanismen nach Kohlenstoffionentherapie. Aufbauend auf den zuvor beschriebenen Studien zur relativen biologischen Wirksamkeit stehen die folgenden drei Themenbereiche im Fokus:

- Funktionelle und strukturelle Veränderungen der Tumorgefäßversorgung nach Bestrahlung
- Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung von Tumorzellen und Normalgewebsanteilen nach Photonen- und ^{12}C - RT in differenzierten Experimentaltumoren
- Wirkungsweise von Photonen und ^{12}C auf individuelle Tumor-induzierende Subpopulationen

Die Untersuchungen erfolgten in Form von Zeitverlaufsstudien unter Einsatz von nicht-invasiven bildgebenden Verfahren über histologische und durchflusszytometrische Techniken bis hin zu molekularen Genexpressionsanalysen.

3.5.1 Bestimmung des Blutflusses mittels Ultraschall

Der Einfluss auf den funktionellen Parameter „Blutfluss“ sollte mit Hilfe des nicht-invasiven Doppler-Ultraschalls untersucht werden.

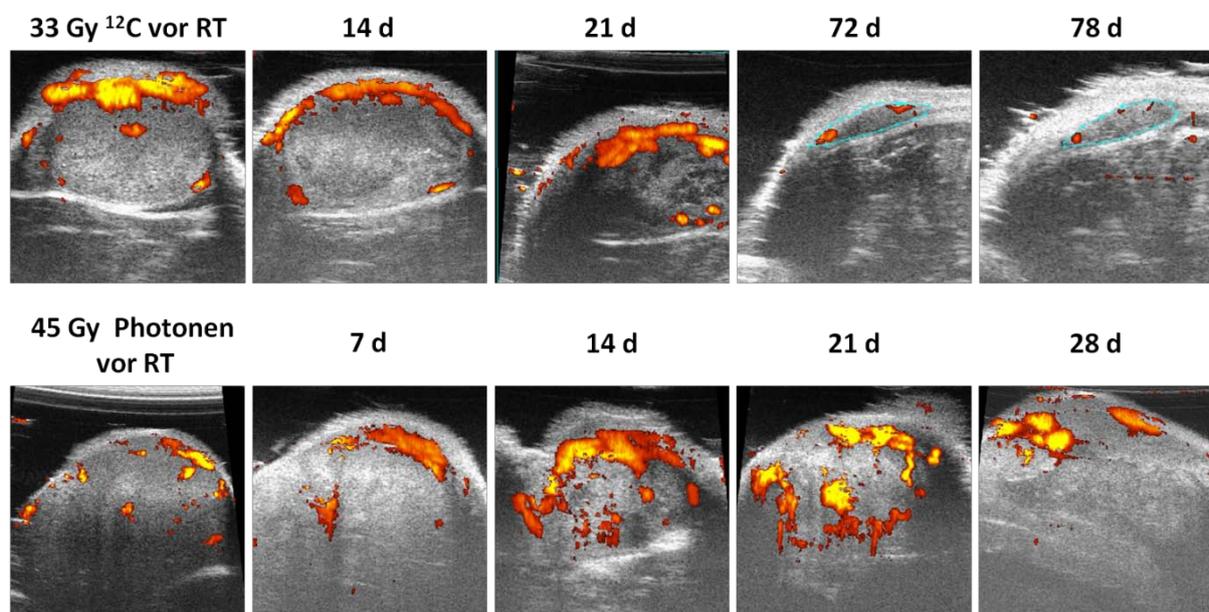


Abb. 14: Repräsentative Bilder des Doppler-Ultraschalls aus einer Tumormittelschicht: Die gelben und roten Pixel geben den detektierten Blutfluss wider. Im oberen Zeitverlauf ist ein mit 33 Gy ^{12}C - bestrahlter HI-Tumor (lokale Kontrolle) im Zeitverlauf zu sehen. Die blauen Linien in den Bildern nach 72 d und 78 d kennzeichnen das Tumorrestvolumen. Der untere Zeitverlauf zeigt einen mit 45 Gy Photonen-bestrahlten HI-Tumor (nicht kontrolliert) mit steter Volumen- und Blutflusszunahme. Aufgrund dessen sind nur Bildausschnitte der Tumormittelschicht gezeigt und nicht der gesamte Tumorquerschnitt. Die Ausschnitte entsprechen den Bildbereichen des oberen Zeitverlaufs, damit die Volumenzu- oder -abnahme ersichtlich bleibt.

Die **Abb. 14** zeigt beispielhaft Bilder des Doppler- Ultraschalls von der Tumormitte des HI-Tumors in Abhängigkeit von der Zeit. Für 45 Gy Photonen war die Volumenzunahme mit der Zeit deutlich erkennbar, jedoch für 33 Gy ^{12}C (lokale Kontrolle) nahm das Tumorumfang kontinuierlich ab. Das Pixelvolumen, d.h. der Blutfluss, nahm in nicht kontrollierten Tumoren immer weiter bis zu einem tumorcharakteristischen, stagnierenden Wert zu und blieb anschließend konstant. Außerdem ist der hohe Blutfluss bedingt durch großkalibrige Gefäße bzw. drüsige Strukturen des HI-Tumors gut wiedergegeben. Ebenfalls war die Verteilung des Blutflusses über das gesamte Tumorumfang zu erkennen. Hingegen war bei 33 Gy ^{12}C -bestrahlten Tumoren der Blutfluss hauptsächlich oberflächlich konzentriert. Die Volumenabnahme ging mit einer deutlichen Reduktion des Blutflusses in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung einher.

Durch das Einzeichnen einer „ROI“ (*region of interest*) in jede Schicht des gesamten Tumorumfangs wurde das relative Pixelvolumen, das dem Blutflussvolumen entspricht, bestimmt. Dieses ergibt sich aus der Anzahl an Pixeln bezogen auf das Gesamtvolumen. Der Verlauf des Blutflussvolumens nach Photonen und ^{12}C - RT des H- (**Abb. 15**) und HI-Tumors (**Abb. 16**) ist jeweils für lokal kontrollierte (LC) und nicht kontrollierte (nLC) Tumore dargestellt.

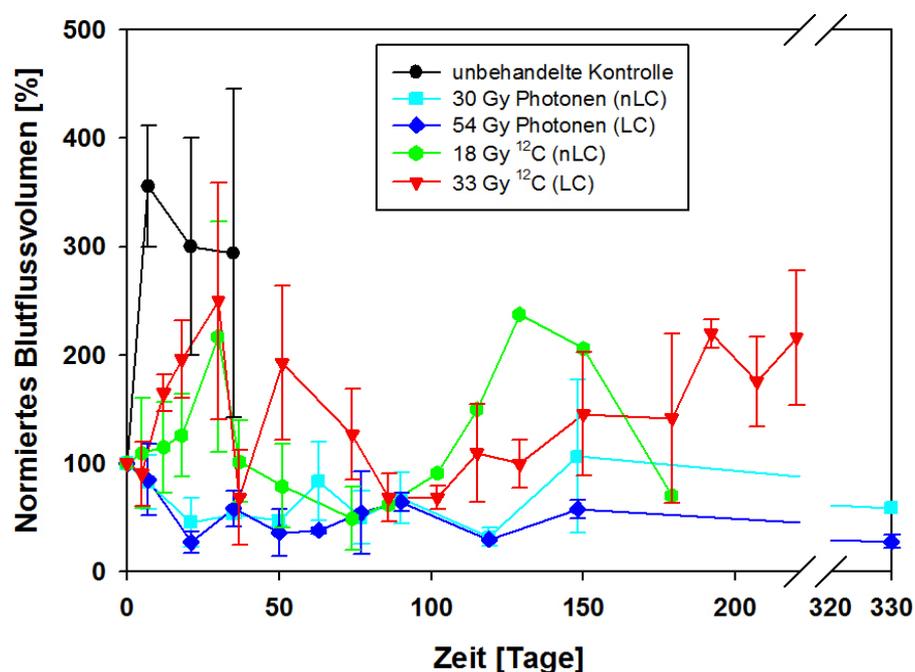


Abb. 15: Blutflussvolumenänderungen des H-Tumors in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C : Die Normierung erfolgte auf das Blutflussvolumen am Tag vor der Bestrahlung (Tag 0). Die Doppler-Ultraschall-Messung wurde wöchentlich bis zu einem Zeitpunkt von 330 Tagen nach Bestrahlung durchgeführt. Die unbehandelte Kontrolle konnte wegen der raschen Tumorumfangszunahme nur über wenige Wochen verfolgt werden. Die Bestrahlungsgruppen wurden in lokal kontrolliert (LC) und nicht kontrolliert (nLC) aufgeteilt. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM für Gruppen von 3-5 Tieren dar.

In **Abb. 15** zeigt sich, dass die unbehandelten H-Kontrolltumore zu Beginn an Blutfluss zunahmten und dann bei weiterer Volumenzunahme ein konstantes Blutflussvolumen aufwiesen, d.h. das Verhältnis von Blutflussvolumen und Zunahme an Gesamttumorvolumen blieb konstant. Auffallend ist ein Unterschied in der Anfangsphase nach Bestrahlung. Bei beiden Photonen-RT Gruppen nahm das Blutflussvolumen direkt nach RT unabhängig vom späteren lokalen Kontrollstatus ab. Im Gegensatz dazu stieg es bei beiden ^{12}C -RT Gruppen an. Jedoch waren 70 Tage nach RT keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen zu erkennen. Insgesamt lässt sich zu späteren Zeitpunkten keine klare Voraussage anhand des Blutflussvolumens machen, ob ein Tumor kontrolliert oder unkontrolliert war. Allerdings konnte im Falle der lokal kontrollierten ^{12}C -bestrahlten Tumore (rote Linie) ein Anstieg des Blutflussvolumens, gleichbedeutend mit einer Neovaskularisierung, in den Tumorrestvolumen beobachtet werden.

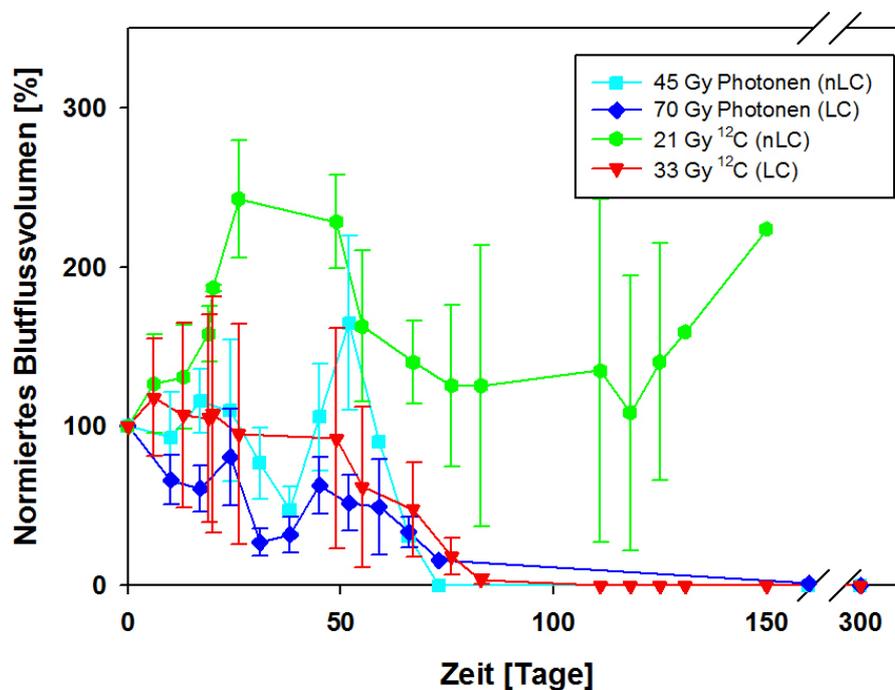


Abb. 16: Blutflussvolumenänderungen des HI-Tumors in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C : Die Normierung erfolgte auf das Blutflussvolumen am Tag vor der Bestrahlung (Tag 0). Die Doppler-Ultraschall-Messung wurde wöchentlich bis zu einem Zeitpunkt von 330 Tagen nach Bestrahlung durchgeführt. Die Bestrahlungsgruppen wurden in lokal kontrolliert (LC) und nicht kontrolliert (nLC) aufgeteilt. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM für Gruppen von 3-5 Tieren dar.

Die Ultraschalluntersuchungen wurden auch bei moderat differenzierten HI-Tumoren durchgeführt (**Abb. 16**). Im Allgemeinen war eine starke Abnahme des Blutflusses nach Bestrahlung erkennbar. Jedoch in später nicht kontrollierten ^{12}C -bestrahlten HI-Tumoren zeigte sich unmittelbar nach Bestrahlung ein deutlicher und langanhaltender Anstieg des Blutflusses. Für lokal kontrollierte ^{12}C -bestrahlte HI-Tumore kann keine klare Aussage über kurzfristige Änderungen nach der Bestrahlung getroffen werden, da die individuellen

Unterschiede der Tiere in der Gruppe sehr groß waren. Nur die mit 21 Gy ^{12}C - bestrahlte Gruppe fiel durch einen erhöhten Blutfluss zu Zeitpunkten > 100 Tage auf. Allerdings sind Rückschlüsse auf den Kontrollstatus nicht zuverlässig möglich, da die Abweichungen innerhalb der Gruppe sehr groß waren und für eine ebenfalls unkontrollierte Gruppe, die 45 Gy Photonengruppe nicht bestätigt werden konnten. Die lokal kontrollierten Gruppen zeigten ab Tag 100 nach RT keinen detektierbaren Blutfluss mehr. Ein Problem war in diesem Zusammenhang allerdings, dass sehr kleine Tumorreste kaum noch von der darüber liegenden Hautschicht abzugrenzen waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der Ultraschalltechnik kein signifikanter Unterschied im Blutflussvolumen zwischen kontrollierten oder unkontrollierten Tumoren detektiert werden konnte. Obwohl kurz nach Bestrahlung ein differenzieller Unterschied im Blutfluss zwischen Photonen- und ^{12}C - RT vorhanden war, verliert sich dieser aber zu späteren Zeitpunkten wieder.

3.5.2 Untersuchung der Perfusion mittels MRT

Insbesondere wegen der Limitationen des Doppler-Ultraschalls, aber auch um einen weiteren Parameter der Gefäßveränderung, die Permeabilität, zu untersuchen, wurden dynamisch Kontrast- verstärkende Magnetresonanztomographien (DCE-MRT) durchgeführt.

Hierzu wurden am Beispiel der Sublinie AT1 sowohl isoeffektive Strahlendosen (16 Gy ^{12}C vs. 37 Gy Photonen und 37 Gy ^{12}C vs. 85 Gy Photonen) als auch identische physikalische Strahlendosen (37 Gy ^{12}C und Photonen) vergleichend untersucht.

Nachfolgend sind die T2- gewichteten Bilder vor Kontrastmittelgabe ([Abb. 17](#)), die T1- gewichteten Bilder nach Kontrastmittelgabe ([Abb. 18](#)) sowie die DCE-Bilder ([Abb. 19](#)) für ein Zeitintervall von 21 Tagen dargestellt.

In den T2- gewichteten Bildern ist eine stetige Volumenzunahme bei unbehandelten Kontrolltumoren gut erkennbar, während bei bestrahlten Tumoren eine Verlangsamung bzw. Stagnation des Wachstums zu beobachten war. Die helle Kontrastierung ist Kennzeichen einer Ödemisierung, wogegen die dunklen Bereiche für nekrotische Regionen charakteristisch sind ([Abb. 17](#)). Im Zeitverlauf zeigte sich die Ödemisierung kurz nach Bestrahlung am Tag 3-7 für 16 Gy ^{12}C , 37 Gy und 85 Gy Photonen sowie am Tag 7-14 für 37 Gy ^{12}C .

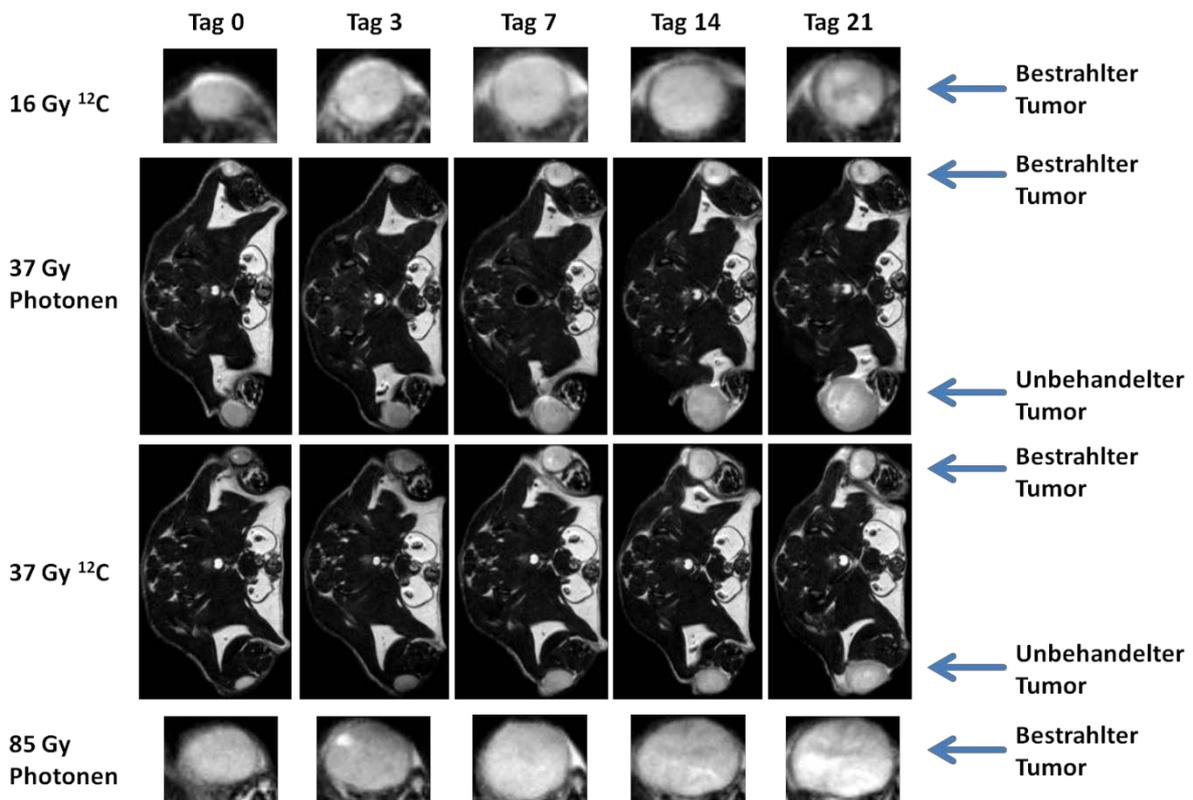


Abb. 17: T2- gewichtete MR-Bilder des AT1-Tumors vor Kontrastmittelzugabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C : Es sind jeweils Isodosen- (37 Gy ^{12}C und Photonen) sowie Isoeffekt-Vergleiche (16 Gy ^{12}C und 37 Gy Photonen bzw. 37 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen) dargestellt. Als interne Kontrollen wurden jeweils unbehandelte Tumore am linken Bein des Tieres mitgeführt. Zur besseren Übersicht sind für 16 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen nur die vergrößerten bestrahlten Tumore ohne die interne Kontrolle abgebildet.

Die nekrotischen Areale sind in den T1- gewichteten Bildern als dunkle Bereiche sichtbar (**Abb. 18**). Hier waren sowohl die größer werdenden Zentralnekrosen in stetig wachsenden unbehandelten Kontrolltumoren, als auch die fokalen Nekrosen in bestrahlten Tumoren zu erkennen. Insgesamt konnte man deutlich sehen, dass für 85 Gy Photonen und der isoeffektiven Dosis von 37 Gy ^{12}C 21 d nach RT ausgeprägte Nekroseareale schneller entstanden. Allerdings wurden die Nekrosen in den ^{12}C - Bilder von der KM-Anreicherung (helle Bereiche) überlagert, da es sich um T1- gewichtete Bilder nach KM-Gabe handelte.

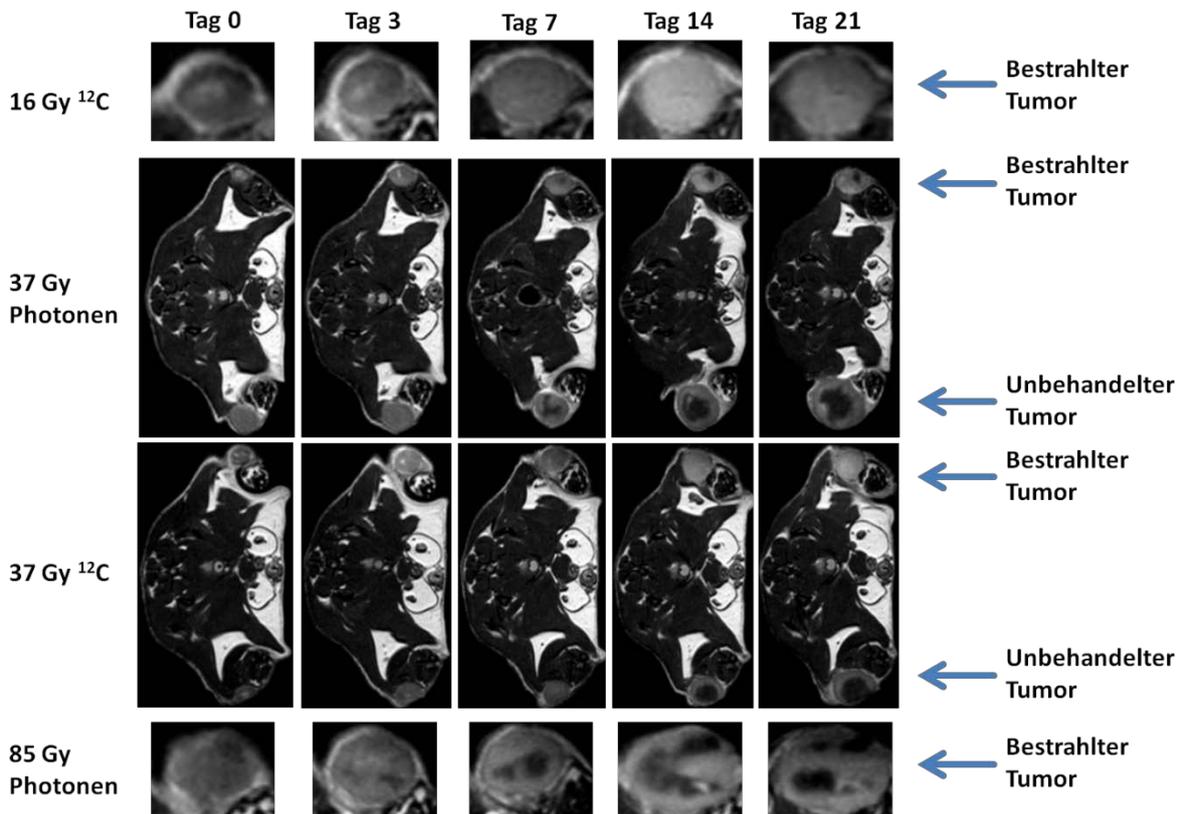


Abb. 18: T1-gewichtete MR-Bilder des AT1-Tumors nach Kontrastmittelzugabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C : Es sind jeweils Isodosen- (37 Gy ^{12}C und Photonen) sowie Isoeffekt-Vergleiche (16 Gy ^{12}C und 37 Gy Photonen bzw. 37 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen) dargestellt. Als interne Kontrollen wurden jeweils unbehandelte Tumore am linken Bein des Tieres mitgeführt. Zur besseren Übersicht sind für 16 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen nur die vergrößerten bestrahlten Tumore ohne die interne Kontrolle abgebildet.

Zusätzlich zu dieser morphologischen Bildgebung wurde eine funktionelle Messung mittels Kontrast-verstärkter MRT (DCE) durchgeführt (Abb. 19). Um die Unterschiede innerhalb der DCE-Messung zu verdeutlichen wurde nur jeweils ein repräsentativer Zeitpunkt (Bild 400), zur Veranschaulichung ausgewählt. Unbehandelte Tumore waren kaum erkennbar, da sie nur wenig KM akkumulieren. Zu späten Zeitpunkten (Tag 21) war die Zentralnekrose ebenfalls durch Fehlen einer KM-Anreicherung deutlich als dunkler Fleck zu erkennen. In allen bestrahlten Tumoren war eine starke Erhöhung der KM-Anreicherung gegenüber den Kontrollen erkennbar. Beim Vergleich der unterschiedlichen Dosisgruppen fällt auf, dass ^{12}C -bestrahlte Tumore einen deutlicheren KM-Anstieg verzeichnen. Interessanterweise ergibt der Vergleich der Grauwerte eine äquivalente KM-Anreicherung für 16 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen. Zusätzlich war die Intensität bei 37 Gy ^{12}C nochmals erhöht. Es zeigt sich somit eine Dosis-Abhängigkeit für beide Strahlqualitäten mit einer deutlich stärkeren KM-Anreicherung für ^{12}C -RT. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese einer höheren Effektivität von Kohlenstoffionen und legen einen möglichen unterschiedlichen Wirkmechanismus nahe.

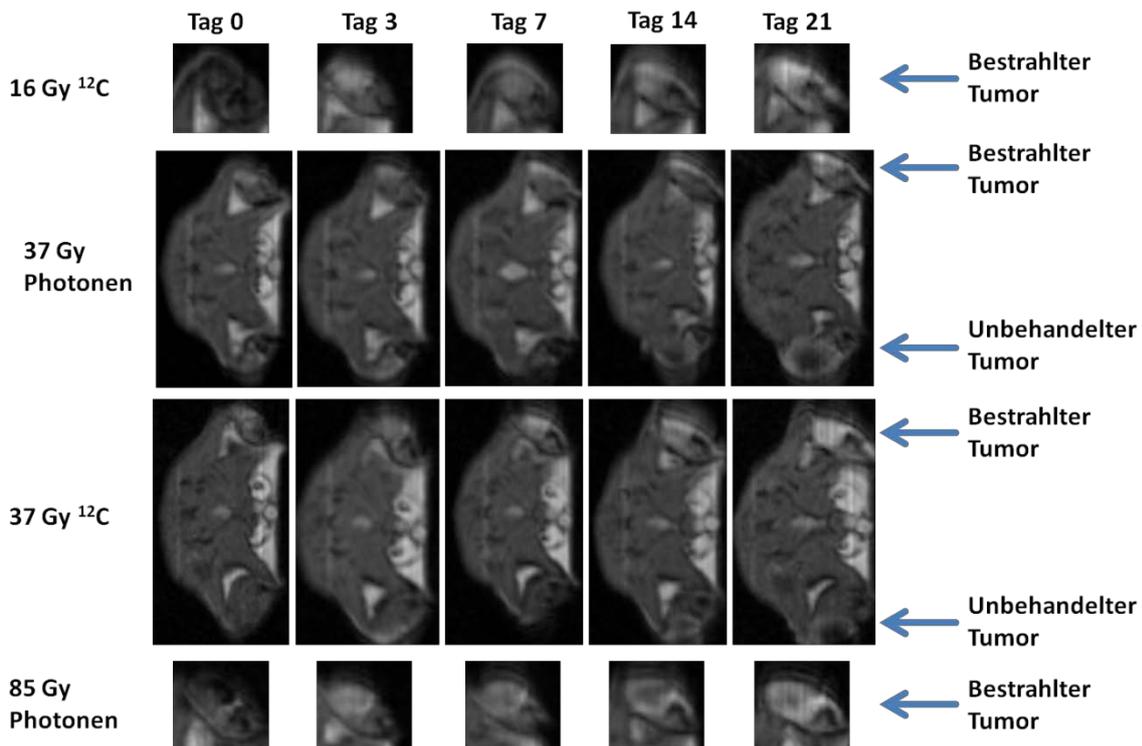


Abb. 19: Dynamisch Kontrast-verstärkte MRT (DCE-MRT) des AT1-Tumors nach Kontrastmittelgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C : Es sind jeweils Isodosen (37 Gy ^{12}C und Photonen) sowie Isoeffekt-Vergleiche (16 Gy ^{12}C und 37 Gy Photonen bzw. 37 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen) dargestellt. Als interne Kontrollen wurden jeweils unbehandelte Tumore am linken Bein des Tieres mitgeführt. Zur besseren Übersicht sind für 16 Gy ^{12}C und 85 Gy Photonen nur die vergrößerten bestrahlten Tumore ohne die interne Kontrolle abgebildet. Aus der Serie von 512 Bildern ist hier das Bild 400 mit gleichen Kontrasten dargestellt um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten.

Mit den 512 DCE-Bildern konnte eine quantitative Analyse mittels pharmakokinetischer Modelle berechnet werden. Die in **Abb. 20** dargestellte Parameterkarte des Blutvolumens A wurde nach dem Zwei-Kompartiment-Modell nach Brix [81] erstellt.

Die Parameterkarten offenbarten bereits qualitative Unterschiede zwischen Kontrolltumoren und den verschiedenen isoeffektiven und isodosen Bestrahlungsgruppen. Bestrahlte Tumore hatten ein höheres Blutvolumen A als unbehandelte Kontrollen, die im Bereich der Zentralnekrose kein KM anreicherten. Im zeitlichen Verlauf nahm A in allen Tumoren zu.

Eine erste vorläufige Auswertung der A Parameterkarte ist in **Abb. 21** dargestellt. Darin ist ein Trend der Zunahme des Parameters A nach ^{12}C -RT erkennbar. Die ausgeprägte intertumorale Heterogenität in dieser funktionellen Untersuchung verursachte extreme Standardabweichungen innerhalb der Gruppen, weshalb erweiterte Analysen unter Einbeziehung verbesserter pharmakokinetischer Modelle angestrebt werden sollten.

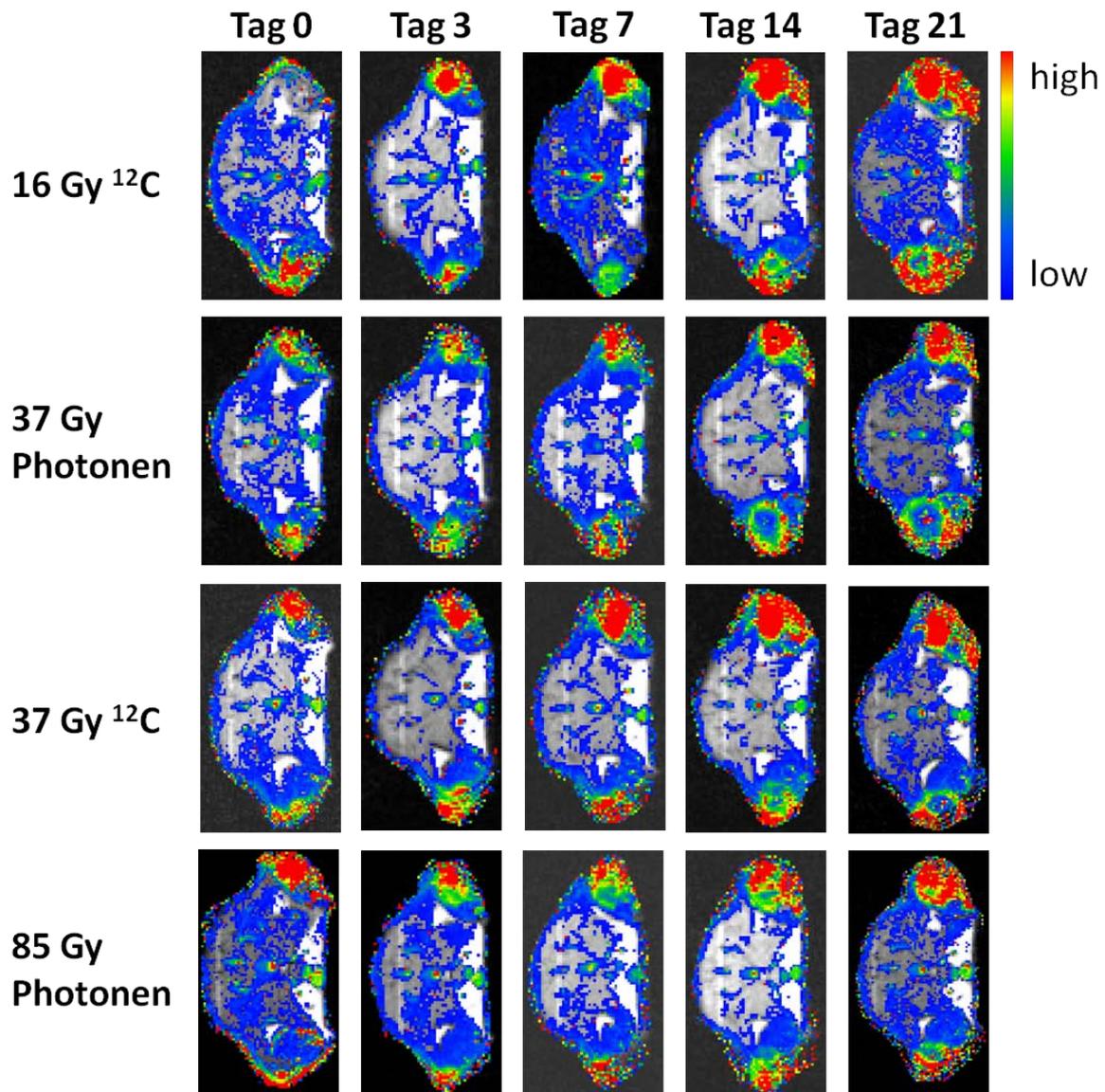


Abb. 20: Parameterkarte A einer DCE-MRT des AT1-Tumors nach Kontrastmittelgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C : Die Parameterkarten des Blutvolumens A sind mit den T1-gewichteten Bildern überlagert. Der obere rechte Tumor ist jeweils bestrahlt, hingegen der untere linke unbehandelt. Die rote Einfärbung spiegelt einen hohen A Parameter wider.

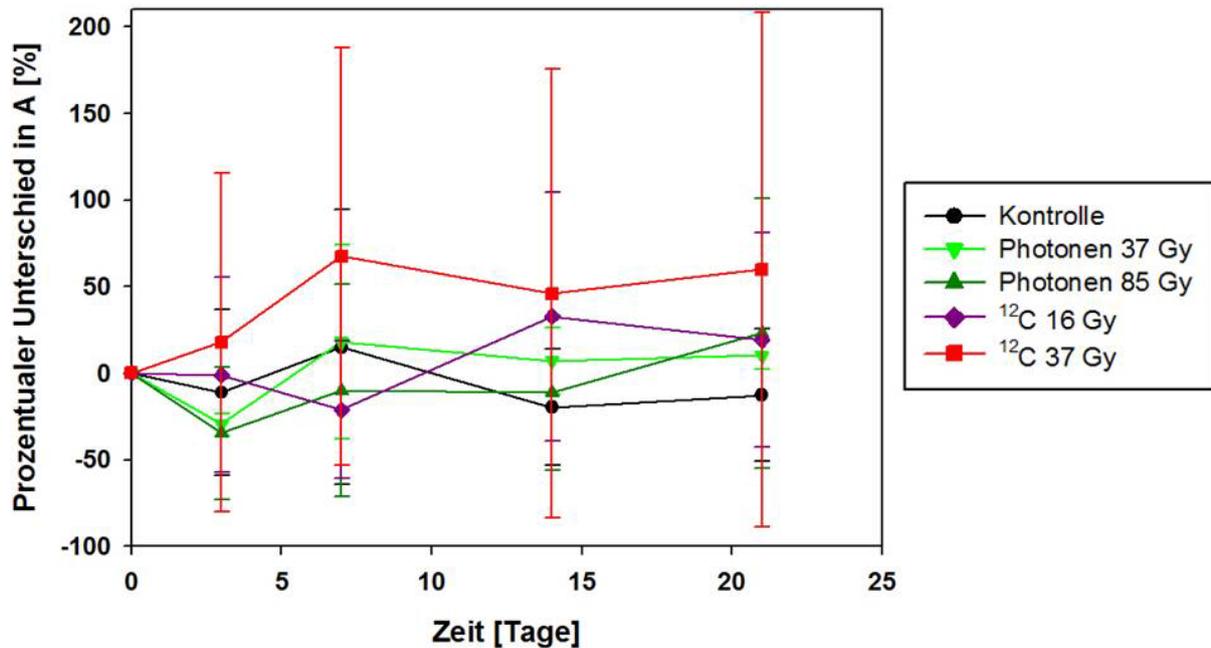


Abb. 21: Bestimmung des Parameters A einer DCE-MRT des AT1-Tumors nach Kontrastmittelgabe in Abhängigkeit von der Zeit nach 1 Fx Photonen oder ¹²C: Der prozentuale Unterschied in A im Gesamttumorvolumen im Vergleich zur Messung vor Bestrahlung (Tag 0) ist im Zeitverlauf dargestellt. Die Punkte spiegeln Mittelwerte \pm SD von 3 Tieren pro Gruppe wider.

3.5.3 Strukturelle und funktionelle Untersuchungen auf histologischer Ebene

3.5.3.1 Strukturelle Veränderungen: Tumormorphologie

Die Charakterisierung der zellmorphologischen Veränderungen in den Tumoren nach Bestrahlung erfolgte auf der Basis Hämatoxylin / Eosin (HE) gefärbter Schnitte. Hierbei handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, die eine klare Unterscheidung von Zellkernreichen Arealen (blau), Blut (rot-orange), Bindegewebs- und stromalen Anteilen (rosa) sowie umgrenzendem Haut und Muskelgewebe (rot mit Syncytien) ermöglicht. Nachfolgend sind Übersichten des H- (Abb. 22) und HI-Tumors (Abb. 23) nach Photonen- und ¹²C- RT im Zeitverlauf abgebildet. In beiden Fällen wurden jeweils Bestrahlungsdosen gewählt, die zu 100% lokaler Kontrolle, d.h. zu einem kompletten Absterben des Tumors führten, damit ein Isoeffekt-Vergleich mit demselben Endpunkt möglich war. Allerdings war die Kinetik der morphologischen Veränderungen zwischen beiden Strahlqualitäten unterschiedlich.

8 h nach Bestrahlung waren keine strukturellen Veränderungen sichtbar, alle Tumore sahen wie unbestrahlte Kontrolltumore aus.

Allgemein zeigte sich eine deutlich schnellere Abfolge und stärkere Ausprägung der morphologischen Änderungen nach ¹²C- Bestrahlung im Vergleich zu Photonen. Bereits nach 18 h, stärker jedoch nach 72 h kam es zu ausgeprägten morphologischen Veränderungen im H-Tumor (Abb. 22), erkennbar an der verstärkten Eosin-Färbung und zeitgleich zu einer Abnahme der Tumorzellzahl. Nach 7 Tagen sind vorwiegend die strahlenresistenteren

Gefäßstrukturen und die robusteren drüsigen Strukturen des Normalgewebsanteils zurück geblieben. 14 bzw. 21 Tage nach 33 Gy ^{12}C - RT waren nahezu alle Tumorzellen abgebaut und die Einwanderung von Fibroblasten abgeschlossen. Nur einige Gefäßstrukturen waren noch vorhanden. Nach 28 Tagen war eine erhöhte fibroblastische Aktivität in Form eines klassischen Fibroms auffallend, die sich bis zum Beobachtungsendzeitpunkt von 300 Tagen nach RT kaum noch veränderte. Dieses Fibrom besteht aus sehr zellarmen Bindegewebe, einer kollagenen Matrix mit wenigen Fibroblasten oder Fibrozyten mit charakteristischen langgezogenen, spindelförmigen Zellkernen. Ursprüngliche Tumorstrukturen waren nicht mehr zu erkennen.

Grundsätzlich war die gleiche Abfolge auch für Tiere, die mit 62 Gy Photonen bestrahlt wurden, gegeben, allerdings waren v.a. die stromalen Veränderungen deutlich schwächer ausgeprägt und die Gefäßstrukturen auch nach 28 Tagen noch vorhanden. Der Zellverlust im Tumor verlief ebenfalls langsamer und wurde erst ab 14 - 21 Tagen sichtbar. Nach 56 Tagen war auch nach Photonen-RT ein Fibrom, das dem nach ^{12}C - RT entspricht, zurückgeblieben.

Im Allgemeinen treffen alle obigen Aussagen auch für die Zeitreihe nach Bestrahlung des HI-Tumors (**Abb. 23**) zu. Da der HI-Tumor von seiner Grundstruktur deutlich größere drüsige und zystische Strukturen mit muzinösem Prostatasekret besitzt, waren bereits zu frühen Zeitpunkten nach RT große zelleere Areale und zerrissene Bereiche aufzufinden. Zusätzlich zu einem per se hohen Flüssigkeitsanteil, folgte eine Ödemisierung nach Bestrahlung, die wiederum zu einer Volumenzunahme und Aufschwemmung des Gewebes sowie zu Problemen bei der Tumorpräparation und Konservierung führt. Deshalb war ab Tag 14 teilweise kaum noch eine Tumorstruktur, aber auch kein klassisches Fibrom, erkennbar. Der Zellverlust fand im HI-Tumor deutlich schneller statt. Nach 30 Tagen war bei lokalen Kontroll Dosen das komplette Tumolvolumen resorbiert, so dass spätere Histozeitpunkte nicht möglich waren. Auch in diesem Fall verlief die Zerstörung und Resorption der Tumorbestandteile nach ^{12}C - schneller als nach Photonen-RT, die Unterschiede waren aber nicht so stark ausgeprägt wie im noch stärker differenzierten H-Tumor mit seinen größeren stromalen „Normalgewebsanteilen“.

Morphologische Änderungen im Stromaanteil

Da sowohl der H- als auch der HI-Tumor einen sehr hohen bzw. hohen Stromaanteil besitzen, wird darauf im Folgenden näher eingegangen. In den 8 h Zeitpunkten waren keine Veränderungen detektierbar. Bereits 18 h nach RT war in H-Tumoren eine Aufquellung der Fibroblasten sowohl nach Photonen- als auch nach ^{12}C - RT sichtbar (**Abb. 21**). Auch nach 72 h blieben die Fibroblasten stark vergrößert und die stromalen, eosinophileren Anteile überwiegen im gesamten Tumorgewebe.

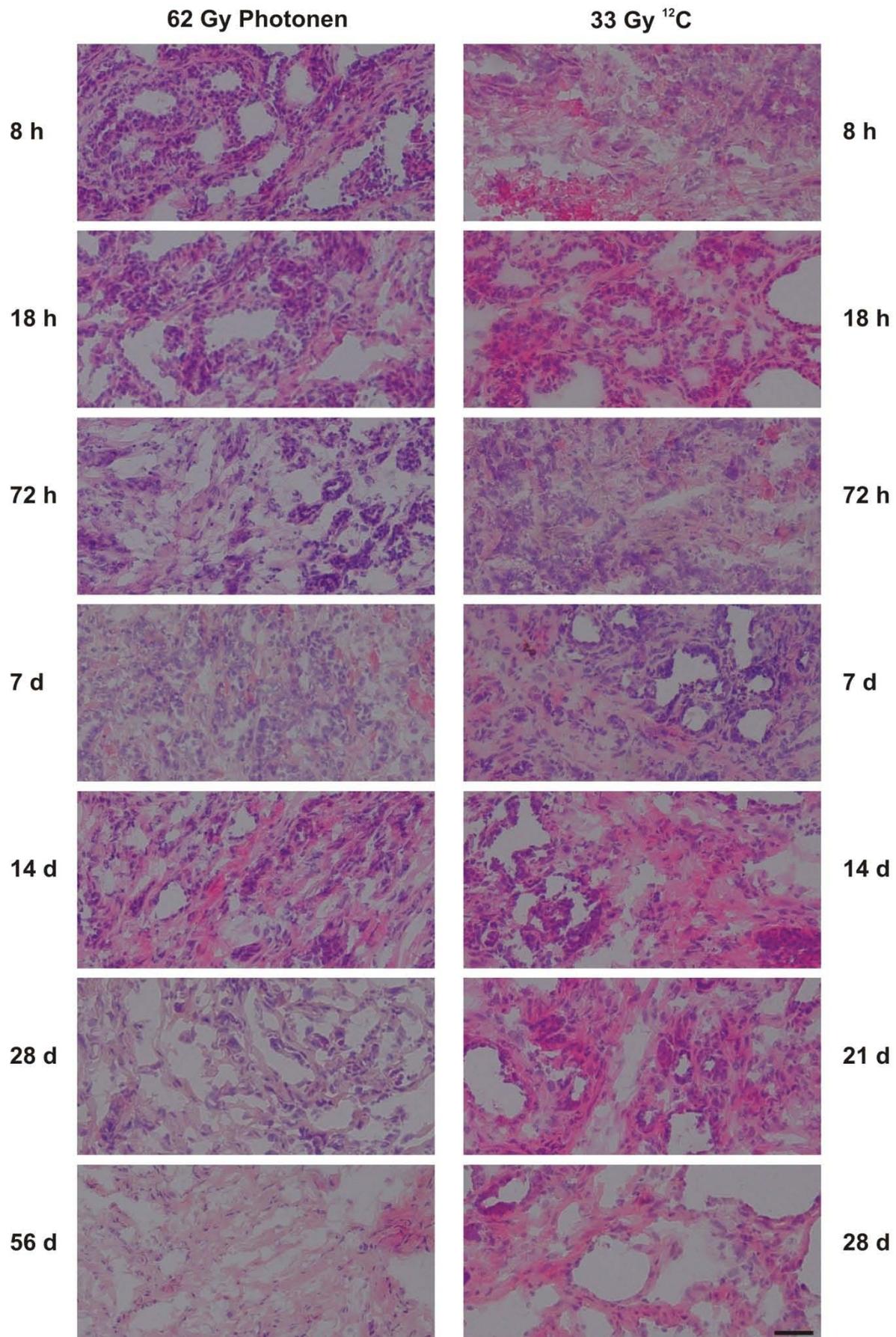


Abb. 22: Strukturelle Veränderung in Tumoren der Sublinie H zu verschiedenen Zeitpunkten nach 1 Fx Photonen- und ^{12}C - Bestrahlung. Größenmaßstab: 50 μm . Vergrößerung: 100- fach.

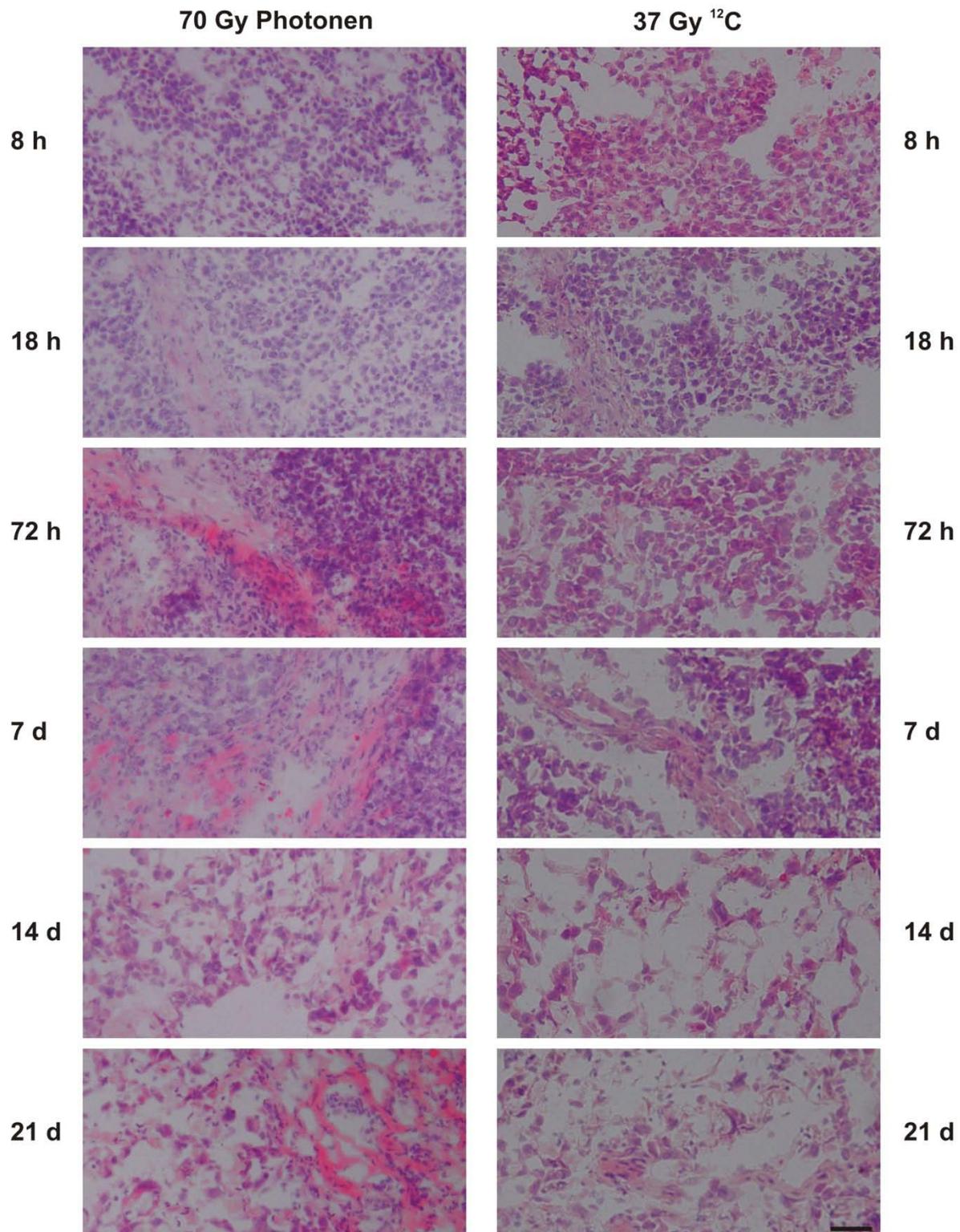


Abb. 23: Strukturelle Veränderung in Tumoren der Sublinie HI zu verschiedenen Zeitpunkten nach 1 Fx Photonen- und ¹²C- Bestrahlung. Größenmaßstab: 50 µm. Vergrößerung: 100- fach.

Ab Tag 14 nach Photonen- bzw. 7 d nach ¹²C- RT nahmen die Fibroblasten eine deutlich größere und langgezogene Struktur an. Zu späteren Zeitpunkten waren dann nur noch Fibroblasten und Bindegewebsstrukturen vorhanden.

Insgesamt enthält der HI-Tumor deutlich weniger stromale Anteile als der H-Tumor. Bis 72 h nach Photonen- RT waren keine Veränderungen sichtbar. Anschließend war eine Zunahme des Stromaanteils zu beobachten, der aber auch mit dem Absterben von Tumorzellen erklärt werden kann. Die Fibroblasten zeigen sich geringfügig vergrößert, waren aber bei weitem nicht so ausgeprägt und groß wie im H-Tumor. Ab Tag 14 waren auch im HI-Tumor nur noch stromale Anteile vorhanden.

Kohlenstoffionen-bestrahlte HI-Tumore wiesen bereits nach 72 h vergrößerte Fibroblasten und einen erhöhten stromalen Anteil auf, aber die strukturellen Veränderungen sind weit weniger prominent, wie beim H-Tumor und laufen nur geringfügig schneller ab, als nach Photonen-RT.

Zusammenfassend waren die Unterschiede in der stromalen Reaktion zwischen Photonen- und ^{12}C - RT gering und nur der zeitliche Ablauf für ^{12}C geringfügig erhöht. Viel auffälliger waren die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Tumorsublinien.

3.5.3.2 Strukturelle Veränderungen: Gefäßmorphologie

H-Tumore

Weiterhin wurde CD31 / SMA in den Tumoren der Longitudinalstudie von H- und HI-Tumoren (siehe [Kapitel 2.9](#)) detektiert. Die [Abb. 24](#) zeigt charakteristische Fluoreszenzbilder von Photonen- und ^{12}C - bestrahlten H-Tumoren in Abhängigkeit von der Zeit. In den überlagerten Bildern sind nahezu keine Perizyten sichtbar, ausgenommen die späteren Zeitpunkte nach Photonen- RT, vorhanden sind. In ^{12}C - bestrahlten Tumoren war bereits nach 18 h eine deutliche Disruption der Gefäßstruktur sichtbar, nur einzelne Endothelzellen in den Gefäßen waren CD31⁺. Diese Disruptionen traten in vergleichbarem Ausmaß auch bei Photonen auf, allerdings erst nach 7 oder teilweise 14 Tagen. Zu späteren Zeitpunkten (28 Tage) war nach beiden Bestrahlungsarten Neovaskularisierung zu beobachten.

Die Auszählungen von CD31⁺- und SMA⁺- Zellen sind in [Abb. 25](#) dargestellt. 8 h nach RT nahm die Zahl an CD31⁺- Zellen deutlich ab ([Abb. 25 A](#)). Für Photonen war nach 72 h und für ^{12}C nach 7 Tagen ein Wiederanstieg an CD31 zu beobachten. Im späteren Verlauf war für Photonen und ^{12}C eine gleichmäßige Abnahme bis Tag 28 bzw. Tag 21 zu erkennen. 28 Tage nach ^{12}C - RT nahm die Menge an CD31 erneut zu. Dieser späte Anstieg korreliert auch mit einer Zunahme von SMA ([Abb. 25 B](#)). Insgesamt ist der SMA- Anteil klein und verringert sich im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig. Auffallend ist der komplette SMA-Verlust 72 h, 7 d und 21 d nach ^{12}C - sowie 7 d und 14 d nach Photonen- RT. Der extreme Anstieg 18 h nach ^{12}C - RT lässt sich in diesem Zusammenhang nur schwer einordnen.

Der Gefäßdurchmesser war in allen Bestrahlungsgruppen deutlich herabgesetzt gegenüber der Kontrolle, allerdings waren keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf detektierbar ([Abb. 26 B](#)).

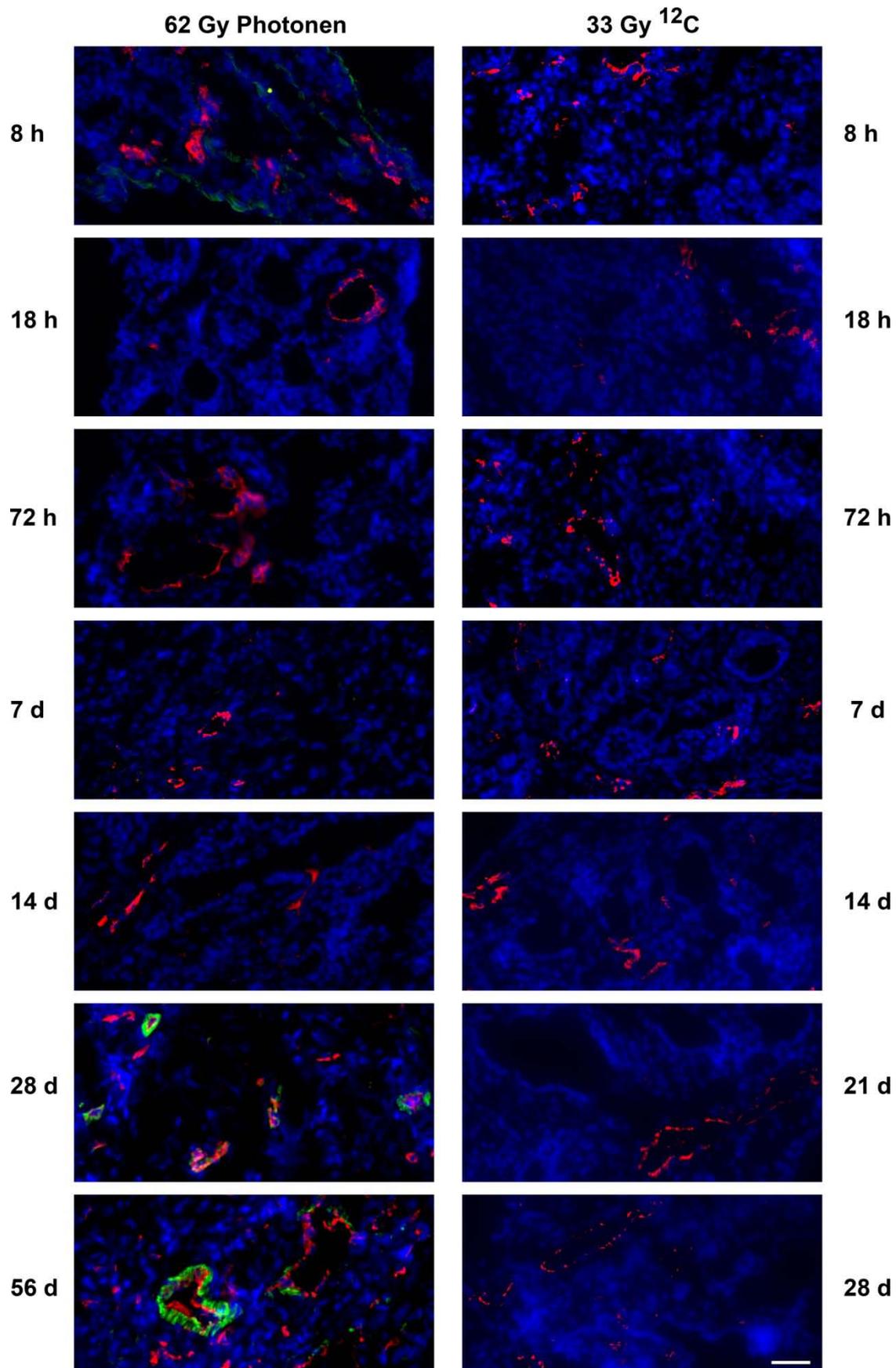


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CD31/SMA doppelgefärbten H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Die Endothelzellen wurden mit dem Oberflächenmarker CD31 angefärbt (rot). Die SMA-Färbung (grün) markiert die Perizyten ausgereifter Blutgefäße. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Größenmaßstab: 50 μm . Vergrößerung: 200-fach.

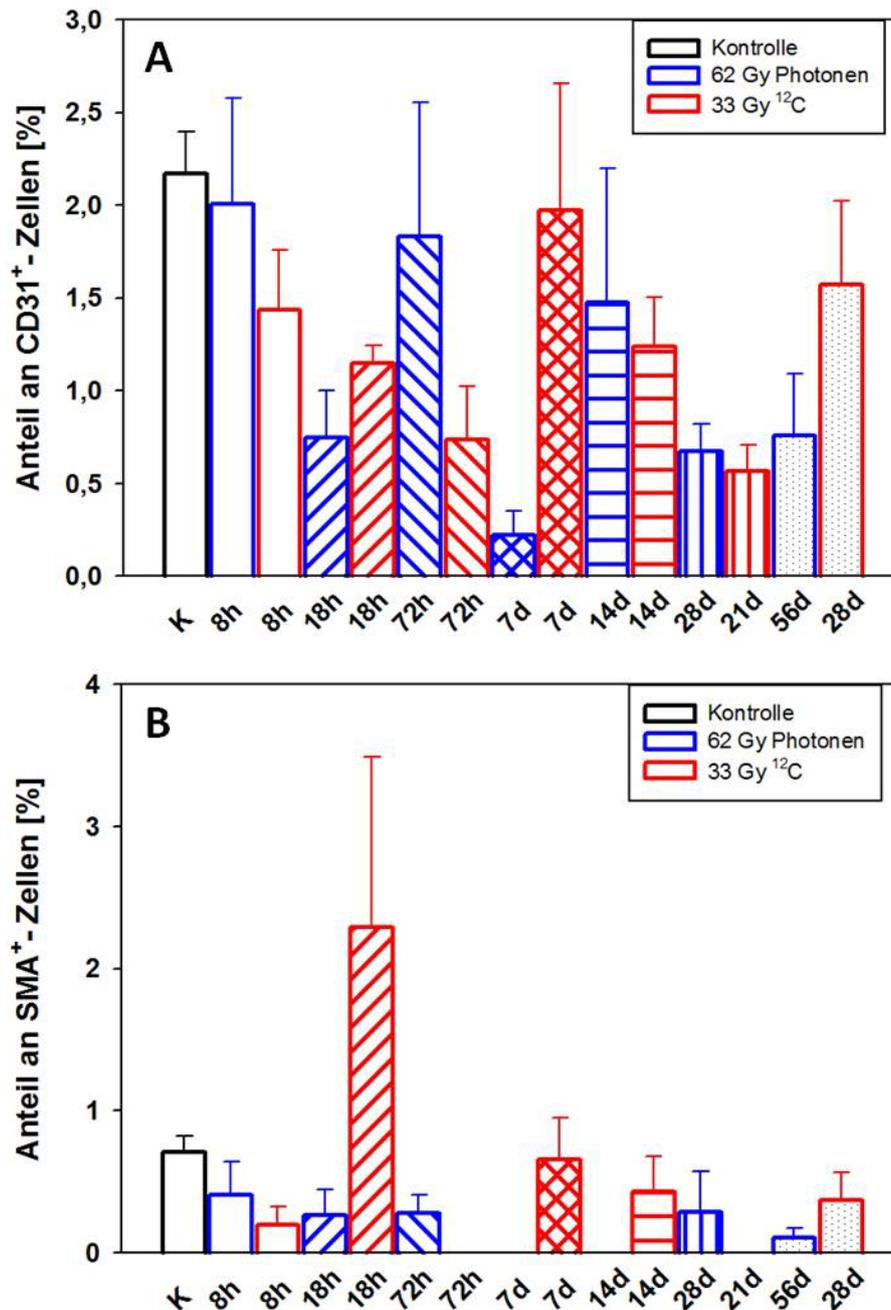


Abb. 25: Quantifizierung von CD31⁺- (A) und SMA⁺-Zellen (B) in H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹²C. Pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ¹²C: rot) wurden je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert ± SEM). Dazu wurde die positive Fläche pro Gesamtbildfläche mit Hilfe der Cell F-Software berechnet. Zeitpunkte ohne Balken zeigten keinerlei Färbung.

Die Anzahl an Gefäßen nahm sofort nach Photonen- RT deutlich ab und erreichte nach 7 Tagen den Minimalwert (**Abb. 26 A**). Anschließend nahm die Gefäßdichte wieder sukzessive zu, bis sie nach 56 Tagen nahezu das Ausgangsniveau vor RT erreicht hatte. In ¹²C- bestrahlten Tumoren ging die Gefäßanzahl nur langsam zurück, erreichte 7 Tage nach RT einen neuen Höchstwert und pegelte sich anschließend bei 10-15 Gefäßen pro Bildausschnitt ein.

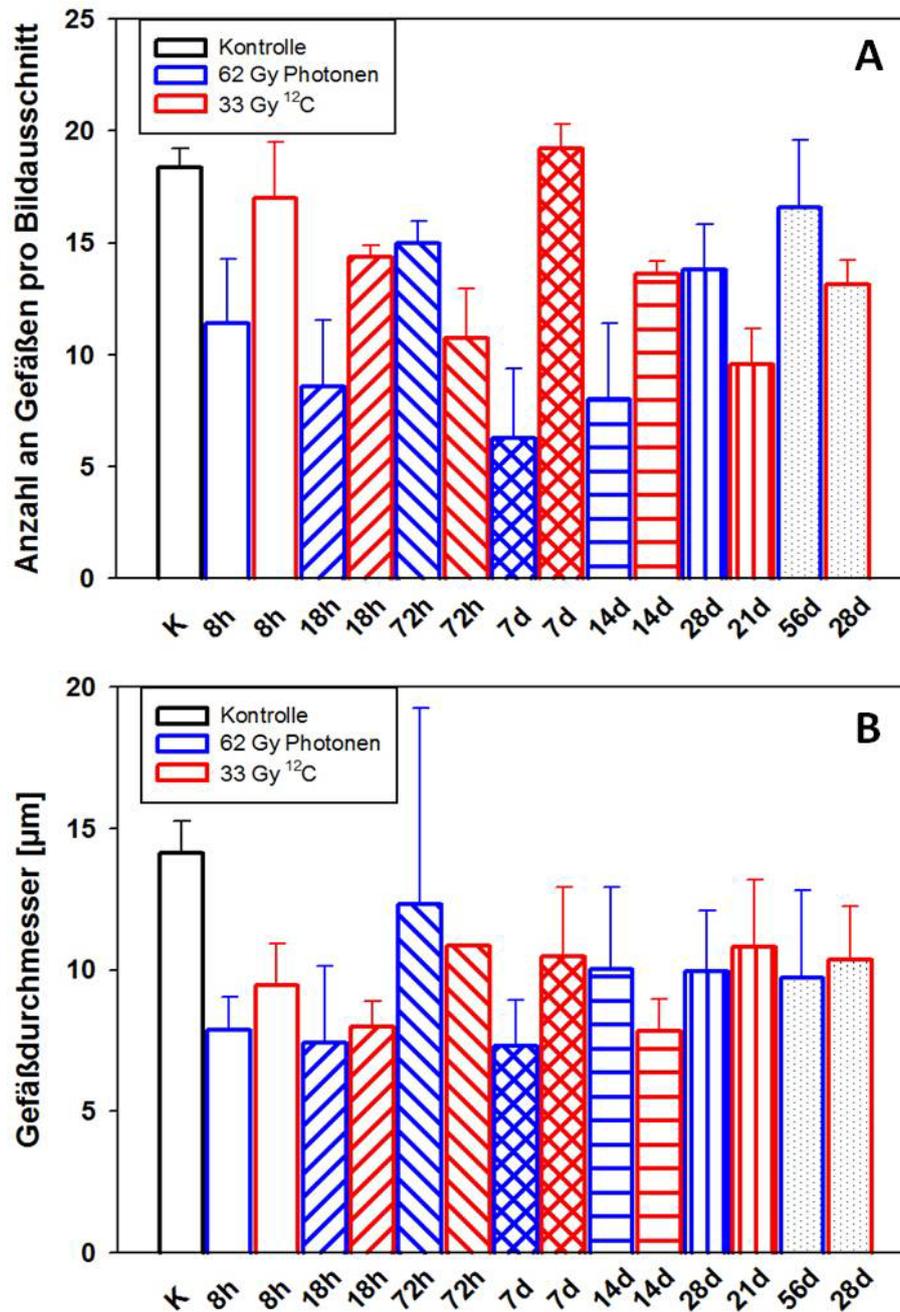


Abb. 26: Bestimmung der Gefäßdichte (A) und des Gefäßdurchmessers (B) in H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹²C. Alle CD31⁺-Gefäße (CD31/SMA- Färbung) pro Bild wurden gezählt (A) und von diesen jeweils die Gefäßdurchmesser (B) bestimmt. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ¹²C: rot) je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert ± SEM).

In unbehandelten HI-Tumoren (**Abb. 27 A**) war mehr CD31 detektierbar als in den H-Tumoren (**Abb. 25 A**). Jedoch wiesen diese HI-Tumore kein SMA⁺-Strukturen auf (**Abb. 27 B**).

Bereits 8 h nach RT war sowohl bei Photonen als auch bei ¹²C die CD31-Menge auf ein Viertel der Ausgangsmenge reduziert (**Abb. 27 A**). Anschließend stieg die Expression für 18 h bzw. 72 h wieder leicht an, um dann nach 7 d das Niveau von 8 h erneut zu erreichen. Für ¹²C-RT blieb der Anteil an CD31⁺-Zellen danach auf niedrigem Niveau relativ konstant.

In Tumoren, die mit Photonen- RT behandelt wurden, war 14 Tage nach RT ein Anstieg der CD31- Menge zu verzeichnen, der deutlich über der Menge in Kontrolltumoren lag. Nach 21 Tagen war dieser Anstieg bereits wieder reduziert. Letztendlich blieb der CD31- Anteil in Photonen- bestrahlten Tumoren ab Tag 14 immer deutlich über dem der ^{12}C - bestrahlten.

HI-Tumore

Da die Menge an SMA⁺- Perizyten in HI-Tumoren sehr gering war, sind präzise Aussagen schwierig (Abb. 27 B).

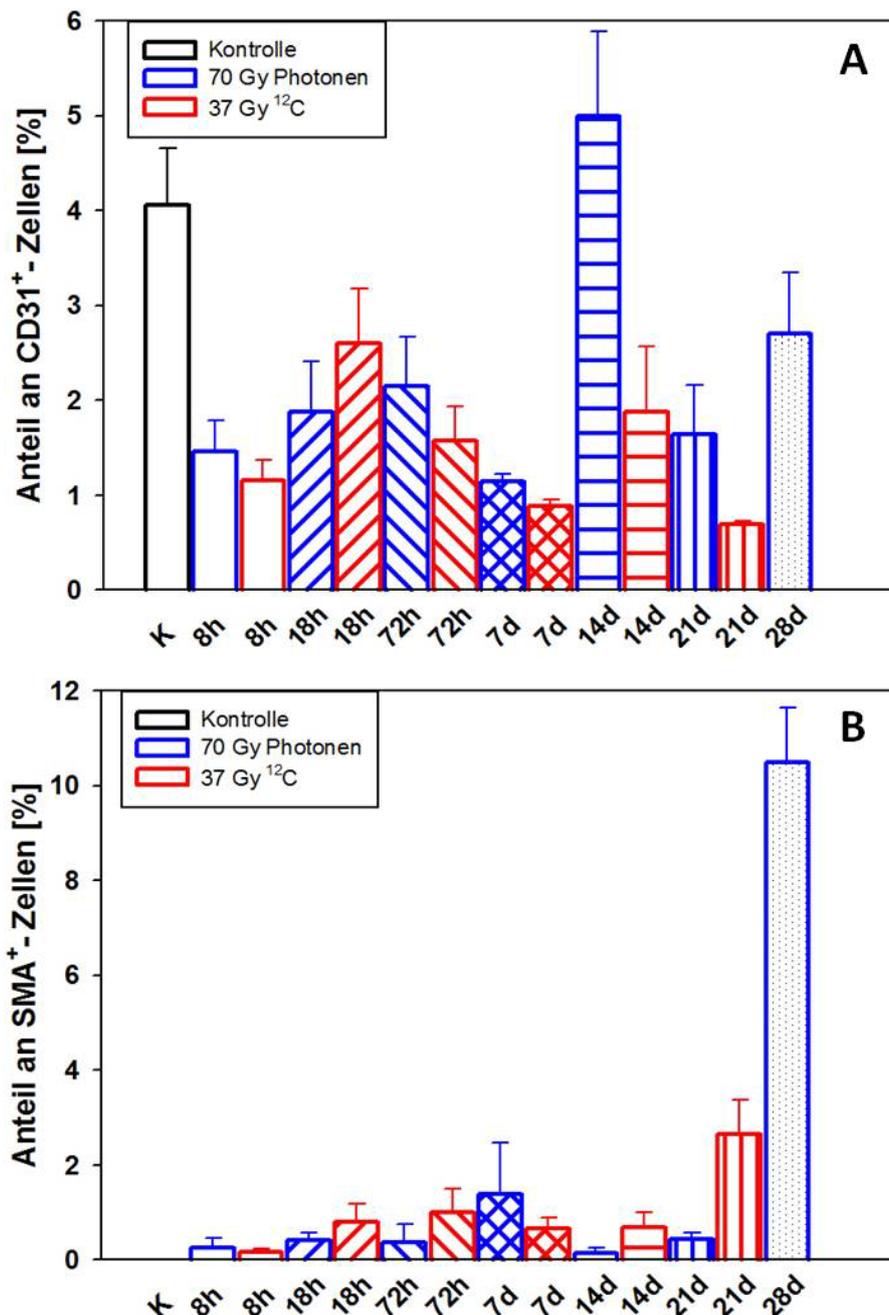


Abb. 27: Quantifizierung von CD31⁺- (A) und SMA⁺-Zellen (B) in HI-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ^{12}C : rot) wurden je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert \pm SEM). Dazu wurde die positive Fläche pro Gesamtbildfläche mit Hilfe der Cell F-Software berechnet. Die Kontrolltumore zeigten keinerlei Färbung.

Der SMA- Anteil nahm sowohl in ^{12}C - als auch in Photonen- bestrahlten Tumoren bis Tag 7 leicht zu, stagnierte dann und stieg für 21 Tage nach ^{12}C - RT deutlich an. Im Fall von Photonen- RT erreicht der SMA-Anteil mit 10% einen Höchstwert.

Auch für den HI-Tumor wurde die Gefäßanzahl im zeitlichen Verlauf bestimmt (**Abb. 28 A**). Nach einem Rückgang der Gefäßdichte 8 h nach RT, erreichte sie für ^{12}C bereits nach 18 h wieder das Ausgangsniveau.

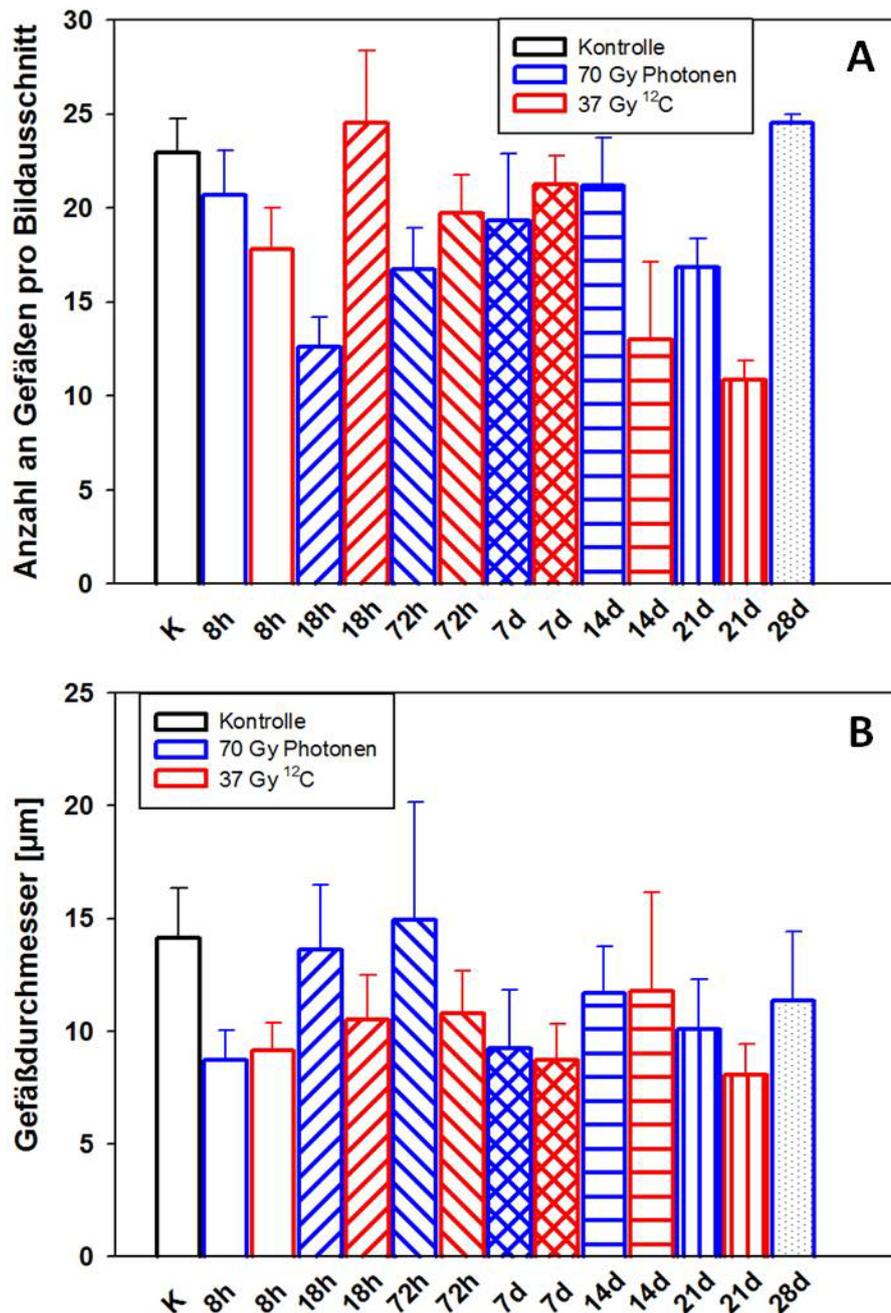


Abb. 28: Bestimmung der Gefäßdichte (A) und des Gefäßdurchmessers (B) in HI-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Alle CD31⁺-Gefäße (CD31/SMA- Färbung) pro Bild wurden gezählt (A) und von diesen jeweils die Gefäßdurchmesser (B) bestimmt. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ^{12}C : rot) je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert \pm SEM).

Für Photonen war nach 18 h der Tiefstwert erreicht. Anschließend war die anfängliche Gefäßdichte nach 7 d wieder hergestellt. Danach war eine deutliche Reduktion für die ^{12}C -Gruppe, jedoch ein Anstieg nach Photonen-RT zu beobachten.

Hinsichtlich des Gefäßdurchmessers gab es keine deutlichen Unterschiede (**Abb. 28 B**). 8 h nach RT war in beiden Gruppen eine Reduktion auf 8 μm Durchmesser detektierbar. Danach blieben sie konstant auf einem Wert von 10 μm .

AT1-Tumore 21 Tage nach RT

Aus dem MRT- Längsschnittexperiment der AT1-Tumore (siehe **Kapitel 3.5.2**) war es möglich zum Zeitpunkt 21 d nach Bestrahlung, die Anzahl und den strukturellen Zustand der Gefäße mittels CD31 / SMA-Färbung zu begutachten (**Abb. 29**). In unbehandelten Tumoren existieren nur wenige große Gefäße, in denen CD31 und SMA koexprimiert wurden. Die Mehrheit der Gefäße bestand aus kleinen Kapillaren mit CD31 aber ohne perizytäre Elemente (d.h. ohne SMA). Dabei war die Lokalisation der CD31⁺ Endothelzellen, die die Gefäße auskleiden und von SMA⁺ Perizyten umgeben sind, eindeutig zu erkennen.

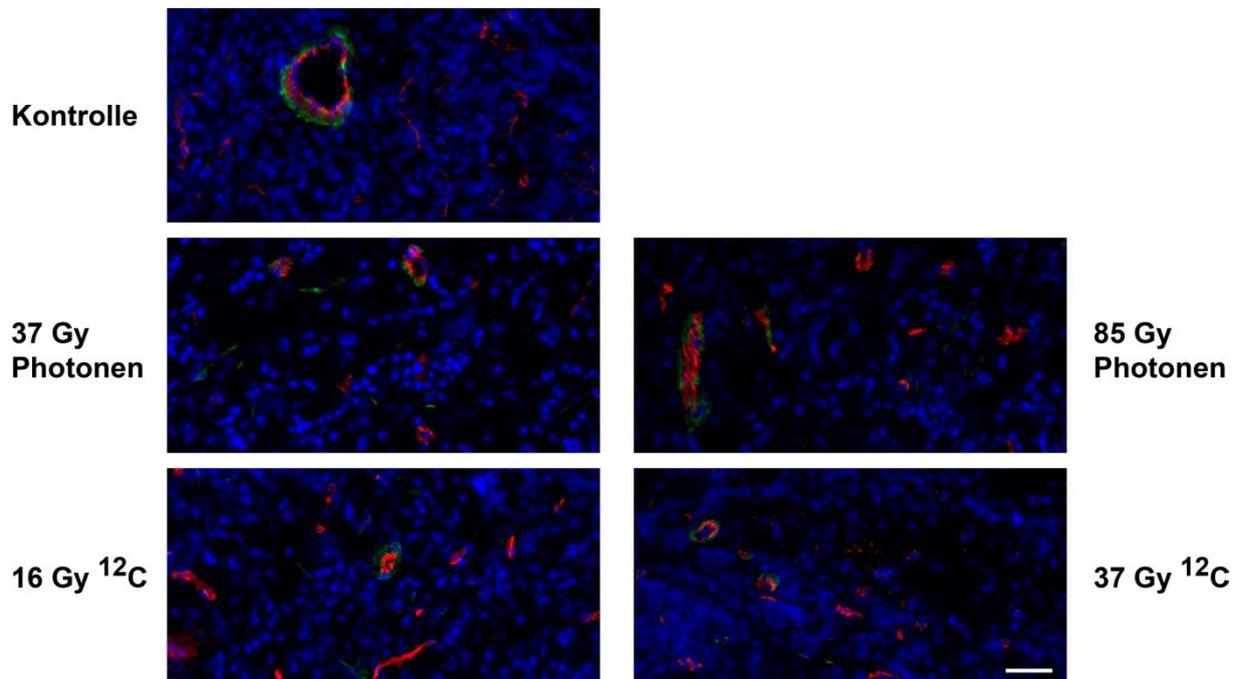


Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CD31/SMA-doppelgefärbten AT1-Tumoren 21 d nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Die Endothelzellen wurden mit dem Oberflächenmarker CD31 angefärbt (rot). Die SMA-Färbung (grün) markiert die Perizyten ausgereifter Blutgefäße. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Größenmaßstab: 50 μm . Vergrößerung: 200-fach

Nach 37 Gy Photonen-RT waren wenige Gefäße übrig, die aber zumeist doppelt positiv waren. Gleiches traf auch auf 85 Gy Photonen zu. Zusätzlich waren hier noch einige

CD31⁺ / SMA⁻ Gefäße sichtbar. 37 Gy ¹²C- RT und 85 Gy Photonen- RT waren vergleichbar. Hingegen waren nach 16 Gy ¹²C- RT mehr Gefäßstrukturen vorhanden sowie SMA⁺- Bereiche ohne assoziierte CD31-Färbung.

Nach 37 Gy und 85 Gy Photonen- RT sowie 37 Gy ¹²C- RT war die Anzahl an CD31⁺- Gefäßen halbiert. Hingegen 21 d nach einer 16 Gy ¹²C- RT war sie auf Kontrollniveau (**Abb. 30 links**).

Der Anteil an SMA⁺- Zellen war in allen Gruppen, 37 Gy Photonen ausgenommen, gegenüber der Kontrolle erhöht (**Abb. 30 rechts**). Der SMA- Anteil in 85 Gy Photonen- bestrahlten Tumoren und 37 Gy ¹²C- bestrahlten Tumoren war vergleichbar.

Zusätzlich wurden die CD31⁺- Gefäße pro Bild ausgezählt (**Abb. 31 links**). Die 16 Gy ¹²C- Gruppe hatte eine leicht erhöhte Gefäßdichte verglichen zu den Kontrolltumoren. Alle anderen Dosisgruppen wiesen eine geringere Anzahl an Gefäßen auf. Eine Dosis- Abhängigkeit war nicht vorhanden.

Der Gefäßdurchmesser war in allen Behandlungsgruppen mit dem der Kontrolltumore vergleichbar (**Abb. 31 rechts**).

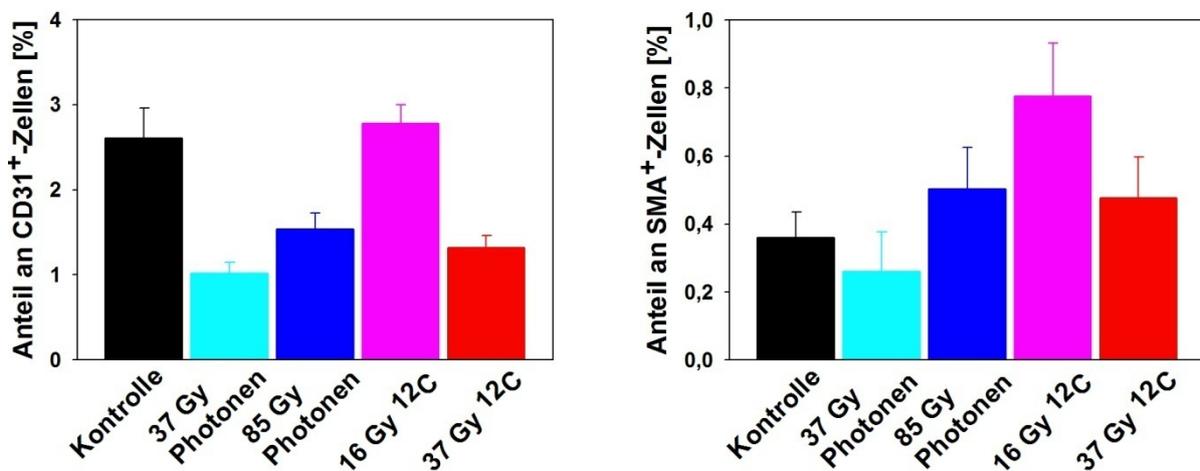


Abb. 30: Ermittelter Anteil an CD31⁺ (links) und SMA⁺ (rechts) - Zellen in AT1-Tumoren 21 d nach 1 Fx Bestrahlung. Die Bestrahlungsdosen erlauben einen Isodosen (37 Gy ¹²C vs. Photonen) sowie einen Isoeffekt Vergleich (16 Gy ¹²C vs. 37 Gy Photonen; 37 Gy ¹²C vs. 85 Gy Photonen). Zur Analyse wurde die Cell F-Software verwendet. Da der AT1-Tumor einen hypoxisch- nekrotischen Zentralbereich hat, wurden nur die peripheren viablen Bereiche für die Analyse verwendet. Die Balken zeigen Mittelwerte ± SEM. Pro Gruppe wurden jeweils 3 Tumore analysiert (mindestens 6 Bilder / Tumor).

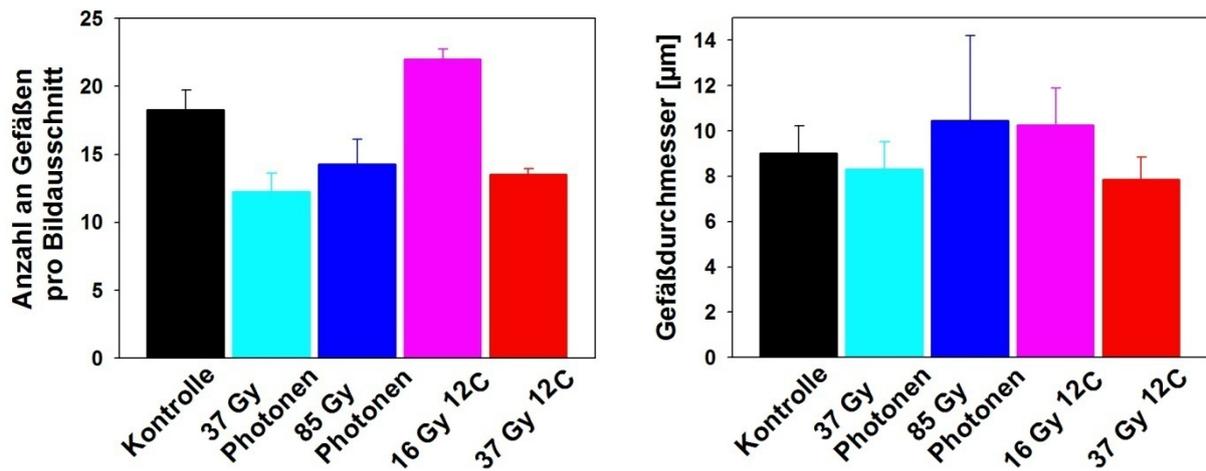


Abb. 31: Bestimmung der Gefäßdichte (links) und des Gefäßdurchmessers (rechts) in AT1-Tumoren 21 d nach 1 Fx Bestrahlung. Die Bestrahlungsdosen erlauben einen Isodosen (37 Gy ^{12}C vs. Photonen) sowie einen Isoeffekt Vergleich (16 Gy ^{12}C vs. 37 Gy Photonen; 37 Gy ^{12}C vs. 85 Gy Photonen). Alle CD31⁺-Gefäße (CD31/SMA- Färbung) pro Bild wurden gezählt (links) und von diesen jeweils die Gefäßdurchmesser (rechts) bestimmt). Zur Analyse wurde die Cell F-Software verwendet. Da der AT1-Tumor einen hypoxisch- nekrotischen Zentralbereich hat, wurden nur die peripheren viablen Bereiche für die Analyse verwendet. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität je 3 Tumore (mindestens 6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert \pm SEM).

Da für die Funktionalität und den Reifegrad der Gefäße nicht nur die Endothelzellen und die Perizyten, sondern auch die Integrität der Basalmembran eine Rolle spielt, wurde diese mit Hilfe der Kollagen IV- Färbung untersucht (**Abb. 32**). Die Beobachtungen nach Photonen und ^{12}C - RT in H- und HI-Tumoren sind relativ vergleichbar, weshalb hier nur Bilder von ^{12}C - bestrahlten HI-Tumoren repräsentativ abgebildet werden.

Unbehandelte HI-Tumoren sind gekennzeichnet durch sehr viele stark gefärbte intakte Basallamina- Strukturen. In diesen war schon zu frühen Zeitpunkten nach RT (18 h bis 72 h) eine starke Verdickung zu erkennen. Nach 7 Tagen zeigte die Verdickung bereits erste poröse Bereiche und zu Zeitpunkten später als 14 Tagen war eine komplette Disruption der Basalmembran sichtbar.

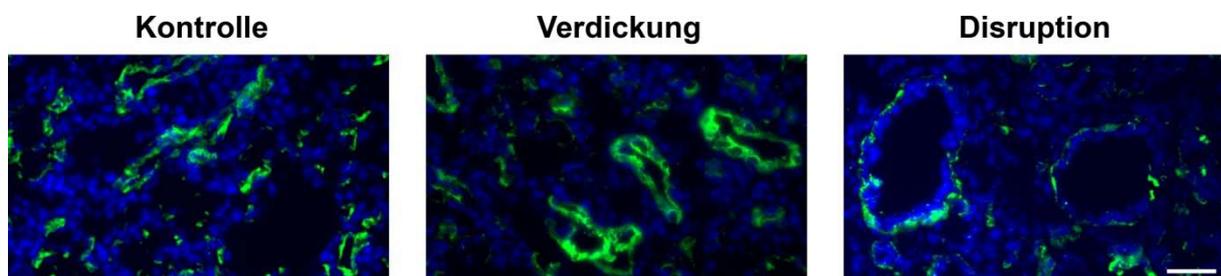


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Kollagen IV gefärbten HI-Tumoren nach 37 Gy ^{12}C . Die Basalmembran von unbehandelten Kontrollen und bestrahlten HI-Tumoren wurden mit dem Kollagen IV (grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Größenmaßstab: 50 μm . Vergrößerung: 200- fach.

3.5.3.3 Funktionelle Veränderungen: Proliferation (BrdU- Inkorporation)

Der proliferative Status von H- und HI-Tumoren wurde durch Einbau von BrdU in die DNA und anschließendem immunhistochemischen Nachweis ermittelt. Um die Lokalisation der BrdU⁺- Zellen im Zeitverlauf darzustellen, sind ausgewählte Mikroskopie-Bilder des H-Tumors in [Abb. 33](#) abgebildet. Die starke Abnahme der Proliferation direkt nach RT und die erneute Zunahme ab Tag 28 waren sowohl für Photonen als auch für ¹²C charakteristisch. Bei den verbliebenen proliferierenden Zellen zu späten Zeitpunkten (> 21 Tage) handelte es sich überwiegend um Endothelzellen und Fibroblasten.

Durch Auszählen der BrdU⁺-Zellen in den mikroskopischen Aufnahmen wurde eine quantitative Analyse der Proliferation in H- ([Abb. 34](#)) und HI-Tumor ([Abb. 35](#)) durchgeführt. Bereits 8 h nach RT hat sich die Anzahl proliferativ aktiver Zellen in etwa halbiert. Für ¹²C-bestrahlte H-Tumore hatte die Proliferation bereits nach 18 h einen Tiefpunkt erreicht, nach 72 h war ein Anstieg zu beobachten, der von einem dauerhaft sehr niedrigen Anteil an BrdU⁺- Zellen ab 7 d nach RT abgelöst wurde ([Abb. 34](#)). Im Gegensatz dazu wurde der BrdU- Anteil zwar auch stark nach 72 h und 7 d für Photonen- bestrahlte Tumore reduziert, aber bereits nach 14 Tagen war ein deutlicher Wiederanstieg feststellbar, der bis zum Ende der Beobachtungszeit von 56 d konstant blieb.

Der Zeitverlauf von BrdU⁺- Zellen bestätigte sich auch für den HI-Tumor ([Abb. 35](#)). Allerdings waren die Unterschiede zwischen ¹²C- und Photonen- bestrahlten Tumoren marginal und die Gruppen insgesamt homogener.

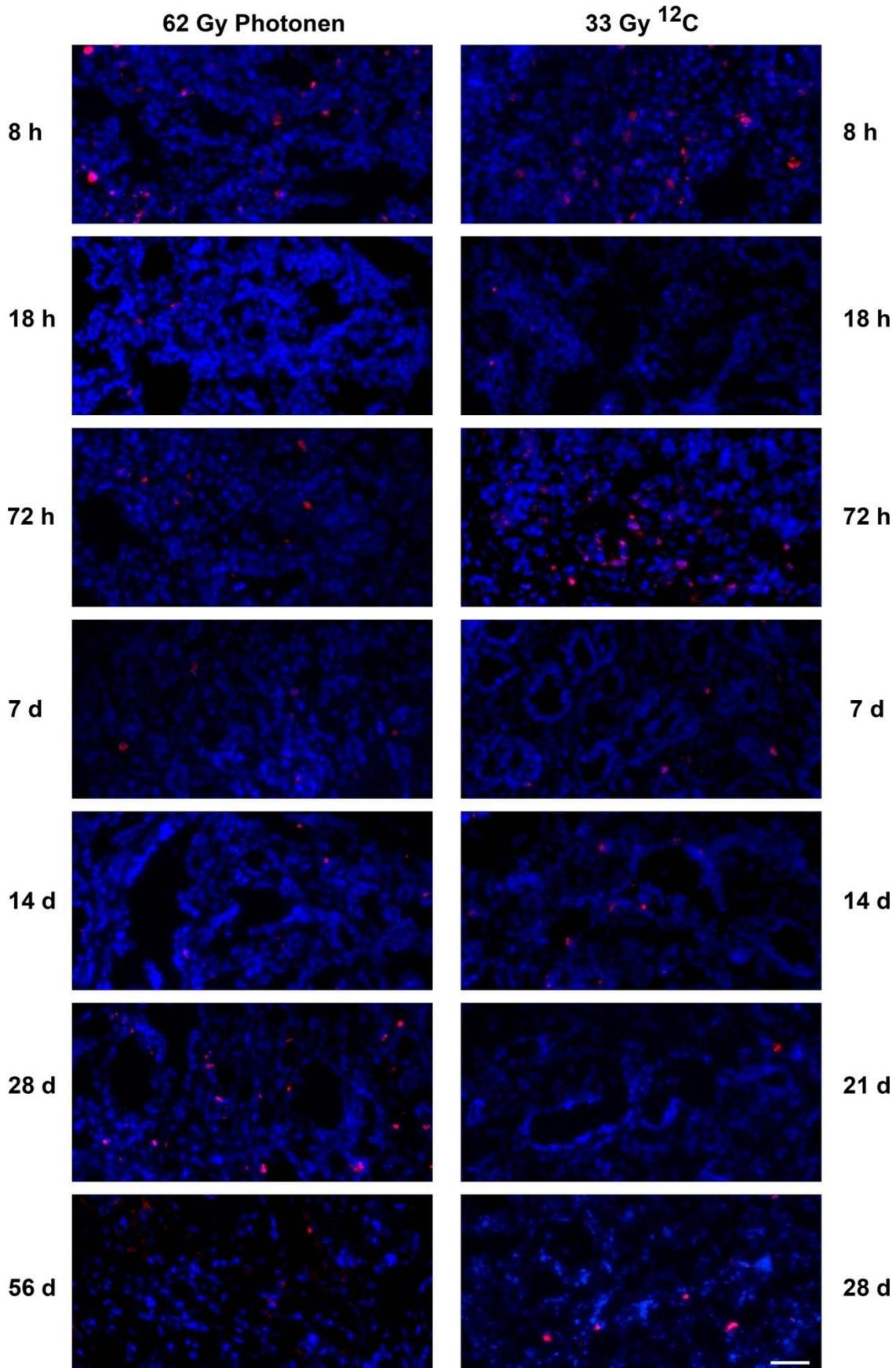


Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BrdU- gefärbten H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Der Proliferationsmarker BrdU wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung nachgewiesen (rot). Eine positive Färbung ist durch Kolokalisation mit dem Zellkern (blau) gekennzeichnet. Größenmaßstab: 50 μm . Vergrößerung: 200- fach.

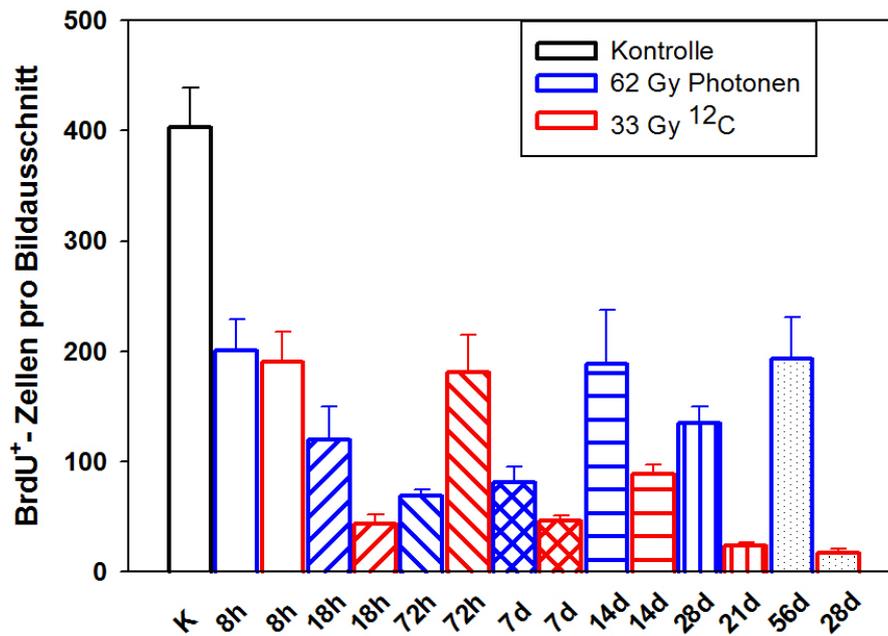


Abb. 34: Quantifizierung von BrdU⁺-Zellen in H- Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹²C. Alle BrdU⁺-Zellen, die mit dem Zellkern (DAPI) kolokalisieren wurden gezählt. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ¹²C: rot) je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert ± SEM).

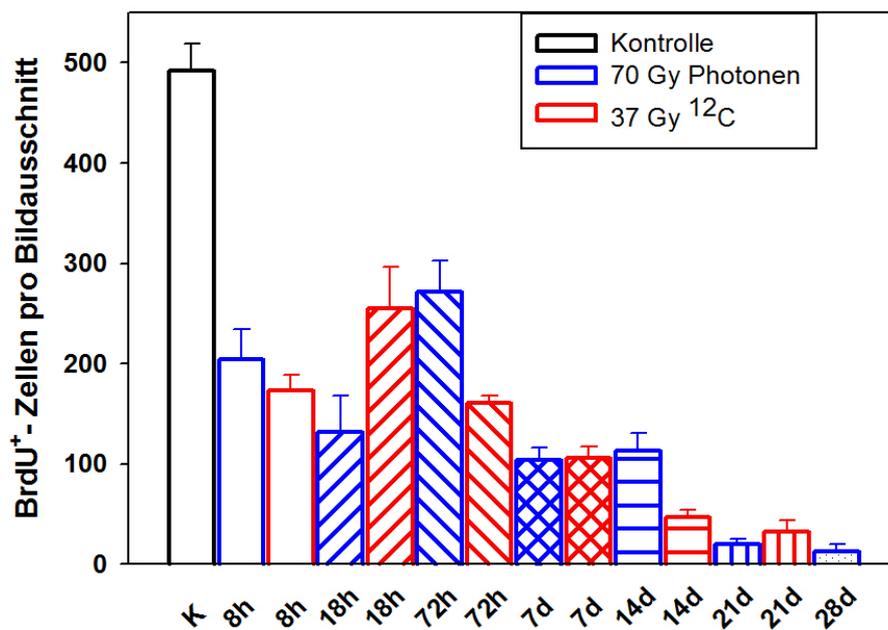


Abb. 35: Quantifizierung von BrdU⁺-Zellen in HI- Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹²C. Alle BrdU⁺-Zellen, die mit dem Zellkern (DAPI) kolokalisieren wurden gezählt. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ¹²C: rot) je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert ± SEM).

3.5.3.4 Funktionelle Veränderungen: Induktion von DNA- Doppelstrangbrüchen

Die strahlenbedingte Induktion bzw. der zeitliche Verlauf der anschließenden Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen nach RT wurde über die Detektion von γ H2AX nachgewiesen. Die histologische Untersuchung erfolgte an den Tumoren der Längsschnittstudie (siehe [Kapitel 2.9](#)). Der zeitliche Verlauf der γ H2AX- Expression war für beide Tumorsublinien identisch, weshalb nachfolgend nur die mikroskopischen Aufnahmen für den H-Tumor dargestellt sind ([Abb. 36](#)).

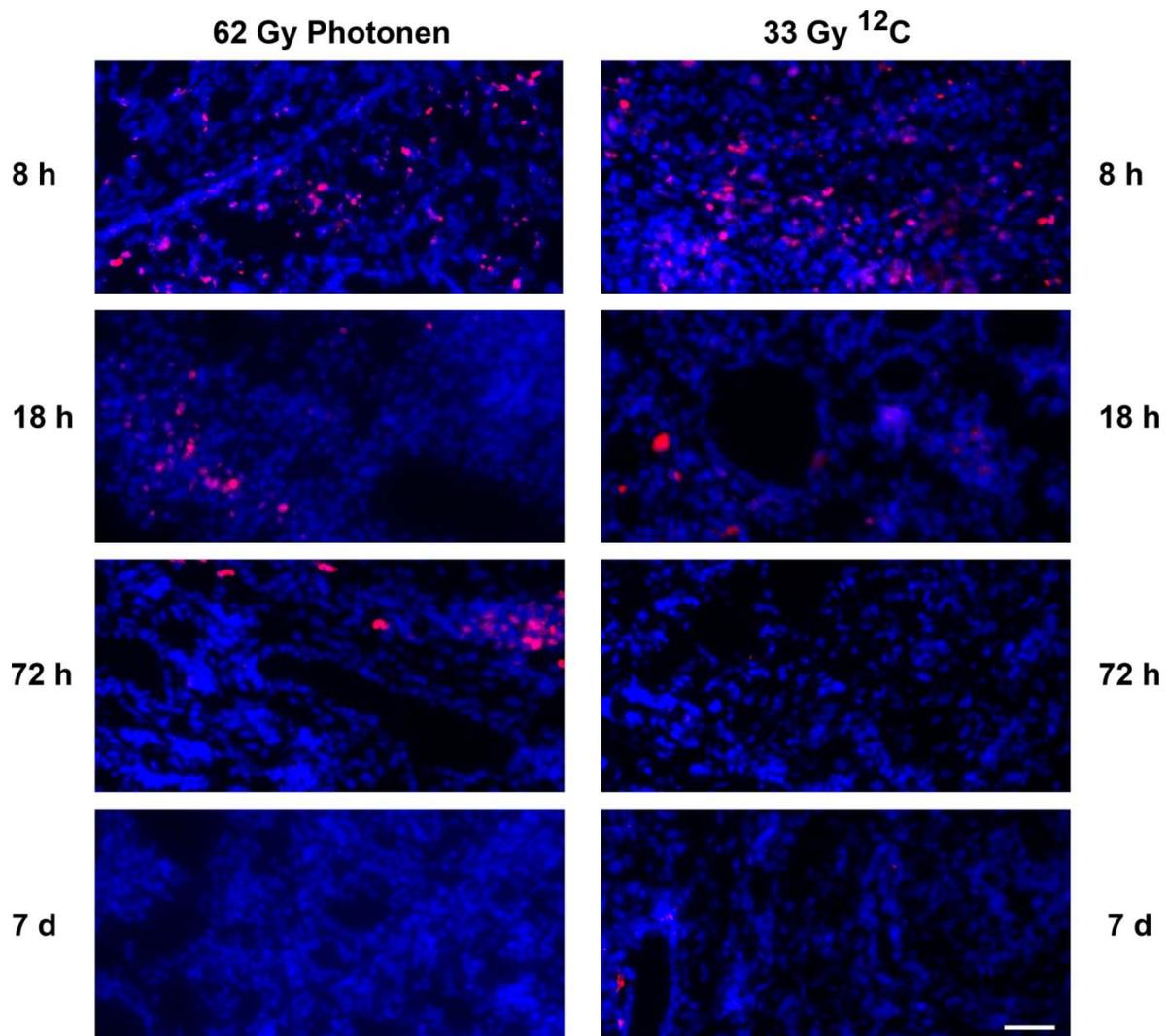


Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von γ H2AX gefärbten H-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ¹²C. Die durch Bestrahlung induzierten DNA- Doppelstrangbrüche wurden mit γ H2AX zu verschiedenen Zeitpunkten markiert (rot). Eine positive Färbung ist durch Kolokalisation mit dem Zellkern (blau) gekennzeichnet. Größenmaßstab: 50 μ m. Vergrößerung: 200- fach.

In unbehandelten Kontrolltumoren konnte kein γ H2AX detektiert werden. Ebenso war in Photonen- und ¹²C- bestrahlten Tumoren ab 7 Tagen nach Bestrahlung γ H2AX nicht mehr

nachweisbar, weshalb auf die graphische Darstellung dieser Zeitpunkte verzichtet wurde (**Abb. 36, Abb. 37**).

Unabhängig von der Strahlqualität wurde nach 8 h die maximale Anzahl positiver Zellen gefunden. Die absolute Menge an strahleninduzierten γ H2AX- Foci lag zumindest in Photonen bestrahlten H-Tumoren höher als in Photonen bestrahlten HI-Tumoren (**Abb. 37**).

In ^{12}C -bestrahlten HI-Tumoren waren im Vergleich zu Photonen nach 8 h doppelt so viele γ H2AX- Foci sichtbar (**Abb. 37 rechts**). Nach 18 h war ein deutlicher Rückgang der Anzahl γ H2AX- positiver Zellen zu verzeichnen. Allerdings war die Abnahme nach Photonen- RT stärker als nach ^{12}C - RT, wo noch zahlreiche positive Signale detektiert werden konnten.

Nach 72 h waren nur noch wenige γ H2AX- Foci auffindbar. In sehr seltenen Fällen ließen sich positive Zellen selbst noch nach 7 Tagen erfassen. Zu allen späteren Zeitpunkten waren die Färbungen negativ (**Abb. 37**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der immunhistologische Nachweis von γ H2AX in perkutan bestrahlten Transplantationstumoren über einen Zeitraum von maximal 7 Tagen möglich ist. Dabei waren durch Kohlenstoffionen erzeugte γ H2AX- Foci im Vergleich zu Photonen nicht nur in einer größeren Anzahl von Zellen zu detektieren, sondern auch über einen längeren Zeitraum nachweisbar.

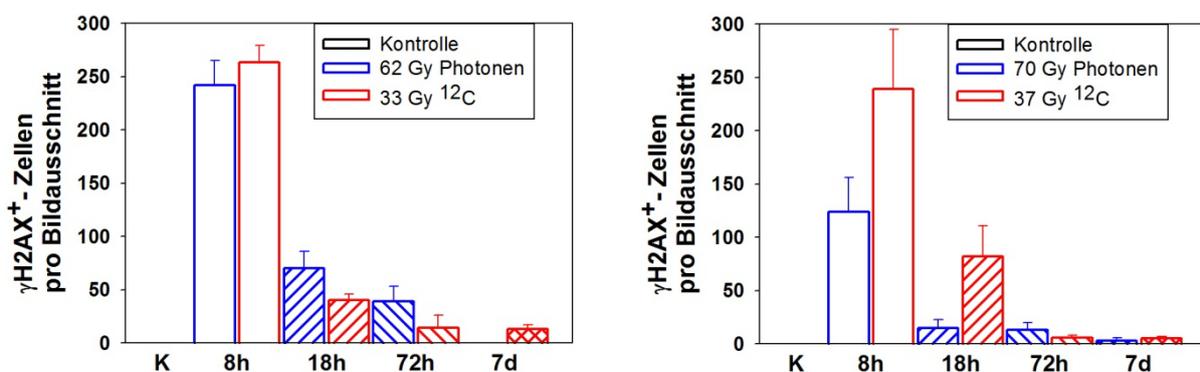


Abb. 37: Quantifizierung von γ H2AX⁺- Zellen in H- (links) und HI- Tumoren (rechts) nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Alle γ H2AX⁺- Zellen, die mit dem Zellkern (DAPI) kolokalisieren wurden gezählt. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ^{12}C : rot) je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert \pm SEM). Zeitpunkte ohne Balken zeigten keine Färbung.

3.5.3.5 Genexpressionsanalysen

Um weitere Hinweise auf differenzielle Mechanismen nach ^{12}C - und Photonen-RT zu erhalten, wurde eine Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene durchgeführt. Die Genfunktion sowie zugehörige Referenzen sind im Anhang tabellarisch aufgeführt (**Tab. 16**).

Unbehandelte Tumore

Insgesamt entsprachen 148 verschiedene Gene den vorgegebenen Diskriminierungskriterien ($p < 1 \times 10^{-4}$) in unbehandelten Tumoren der Sublinie H und HI (**Abb. 38**), d.h. sie waren in beiden Sublinien unterschiedlich reguliert. Aus diesen wurden alle unbekanntes Gensequenzen bzw. Gene mit unklarer Funktion ausgenommen. Von den verbleibenden 32 Genen wurden 19 Gene in HI-Tumoren sowie 13 Gene in H-Tumoren stärker exprimiert (**Abb. 38**).

Gene, die im HI-Tumor überexprimiert vorlagen, sind vorwiegend in folgenden Funktionen involviert: Zellwachstum, Syntheseprozesse, Zelladhäsion, Migration und erhöhte Tumorzellmotilität durch Reorganisation von Aktin. Besonders auffallend war auch die deutlich höhere Expression des IGF-1 Rezeptors im Hormon-unabhängigen HI-Tumor.

Im H-Tumor waren v.a. Gene zur Steuerung metabolischer Aktivitäten sowie Gene für Zelladhäsionsprozesse überexprimiert. Im Vergleich zum HI-Tumor ließen sich zusätzlich hochregulierte Gene finden, die für Komponenten des Immunsystems kodieren.

Bestrahlte HI-Tumore

Die differenzielle Genexpression nach Photonen- und ^{12}C -RT wurde an jeweils vier Zeitpunkten nach Bestrahlung analysiert (**Abb. 39**).

Insgesamt waren 484 Gene mit einem p-Wert $< 1 \times 10^{-4}$ in mindestens einer der untersuchten 9 Gruppen aufgrund von Bestrahlung reguliert. Die wichtigsten 147 Gene mit bekannter Funktion sind nachfolgend dargestellt (**Abb. 39**).

Allgemein wurde nach Bestrahlung die Genexpression der DNA-Reparatur, des Zellzyklusarrest, von bestimmten Komponenten des Immunsystems (z.B. Zytokine, Caspasen), der Ionenkanäle sowie die Erhöhung der Migration (z.B. durch Aktinfilament Reorganisation, ICAM) hochreguliert.

Im Gegensatz dazu wurden v.a. Gene, die in der Zellzyklusprogression, im aeroben Stoffwechsel sowie Angiogenese und Zelladhäsion involviert sind oder für bestimmte Komponenten des Immunsystems (z.B. Mastzellproteasen) kodieren, herunterreguliert.

Zeitlicher Verlauf nach Bestrahlung

Die Dynamik der strahleninduzierten Genregulierung über die Zeit erwies sich als äußerst komplex. Für die beiden Strahlqualitäten wurden nicht nur gegenläufige Expressionsmuster sondern auch Intensitätsveränderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten festgestellt. Charakteristisch für Photonen- und ^{12}C - RT war eine Herunterregulierung von Genen des Immunsystems kurz nach Bestrahlung, erst nach 14 Tagen erreichten oder übertrafen diese wieder Kontrollniveau. Zahlreiche Zellzyklus- und Metabolismus- regulierende Gene wurden ebenfalls nur kurzzeitig nach RT herabreguliert. Nach 14 Tagen wurden sie dann erneut niedrig exprimiert.

DNA- Reparatur induzierende Gene (*Ccng1*, *Cdkn1a*) waren 8 und 18 h nach Photonen- und ^{12}C - RT stark hochreguliert und bereits nach 72 h wieder auf dem niedrigen Expressionsniveau der Kontrollen. Im Gegensatz dazu waren die Reparatur reprimierenden Gene (*Ns5atp8*, *PCNA*, *Pttg1*) 8 und 18 h nach Photonen und ^{12}C - RT stark herunterreguliert und bereits nach 72 h wieder auf dem normalen Expressionsniveau der Kontrollen.

Epas 1 (HIF2 α) wurde sowohl nach Photonen- als auch ^{12}C - RT zu späten Zeitpunkten (14 d) stark hochreguliert.

8 h nach RT war unabhängig von der Strahlqualität eine Expression von Stressantwort- Genen und ATPasen sowie Natrium- Kalium- Pumpen beobachtbar. Allerdings war diese Hochregulierung nach Photonen- stets prägnanter als nach ^{12}C - RT.

Differenziell regulierte Gene

Einzelne wenige Gene zeigten unterschiedliche Regulierung nach Photonen- und ^{12}C - RT. So wurde z.B. ein Rezeptor für Wnt- Signalproteine (*Fzd 9*) 18 h nach Photonen- RT deutlich höher exprimiert als nach ^{12}C - RT, wo eine gleichbleibend niedrige Expression detektierbar war. 14 Tage nach RT war in beiden Gruppen eine deutliche Verringerung dieser Genexpression sichtbar. Auch für Caspase 3 wurde ein differenzieller zeitlicher Unterschied festgestellt. Dieses Gen war bereits 8 h nach Photonen- aber erst 18 h nach ^{12}C - RT hochreguliert.

Eine Reihe von Genen (*Pcyt 2*, *Smarcd 3*, *Hes 6*, *Cd109*, *Bbc 3*, *Pias 3*, *Btg 2*, *Lig 4*, *Cgref 1*, *Ephx 1*, *Ada*, *TNFR homolog 1*, *Trp53inp1*, *Fscn 2* und *Gdf15*) war nach Photonen- RT nur zum ersten Zeitpunkt (8 h) hochreguliert, im späteren Zeitverlauf jedoch nicht mehr. Auch Kohlenstoffionen induzierten eine frühe Hochregulierung dieser Gene, allerdings blieb ihre Expression über einen deutlich längeren Zeitraum erhalten. Erst nach 72 h waren diese Gene dann wieder bei beiden Strahlmodalitäten auf vergleichbarem Level.

Das *Myoc*-Gen (kodiert für einen Leucin-Zipper) wurde nach Photonen- und ^{12}C -RT hochreguliert. Während bei Photonen die Expression hoch blieb, wurde dieses Gen 72 h nach ^{12}C -RT deutlich herunterreguliert.

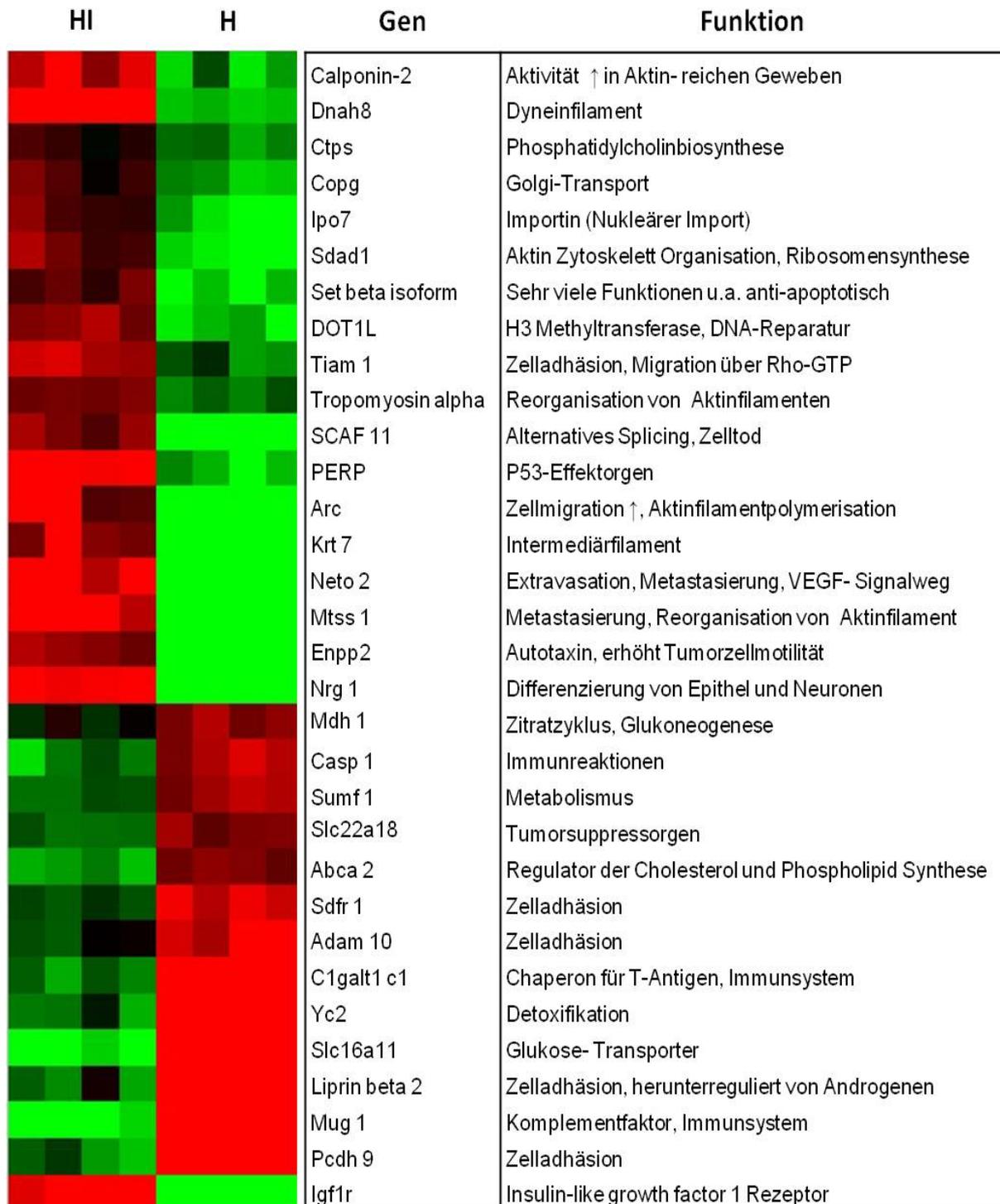
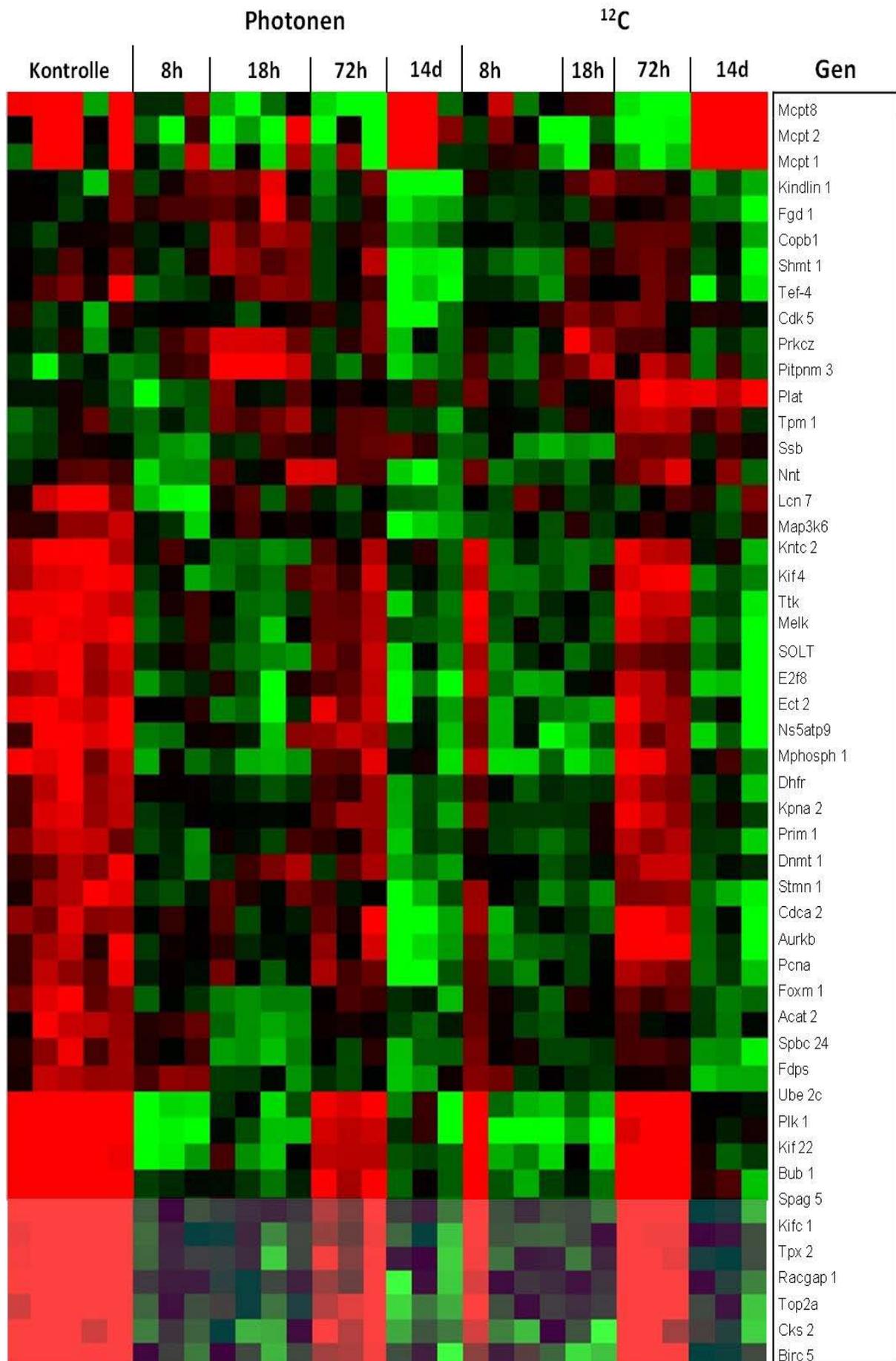
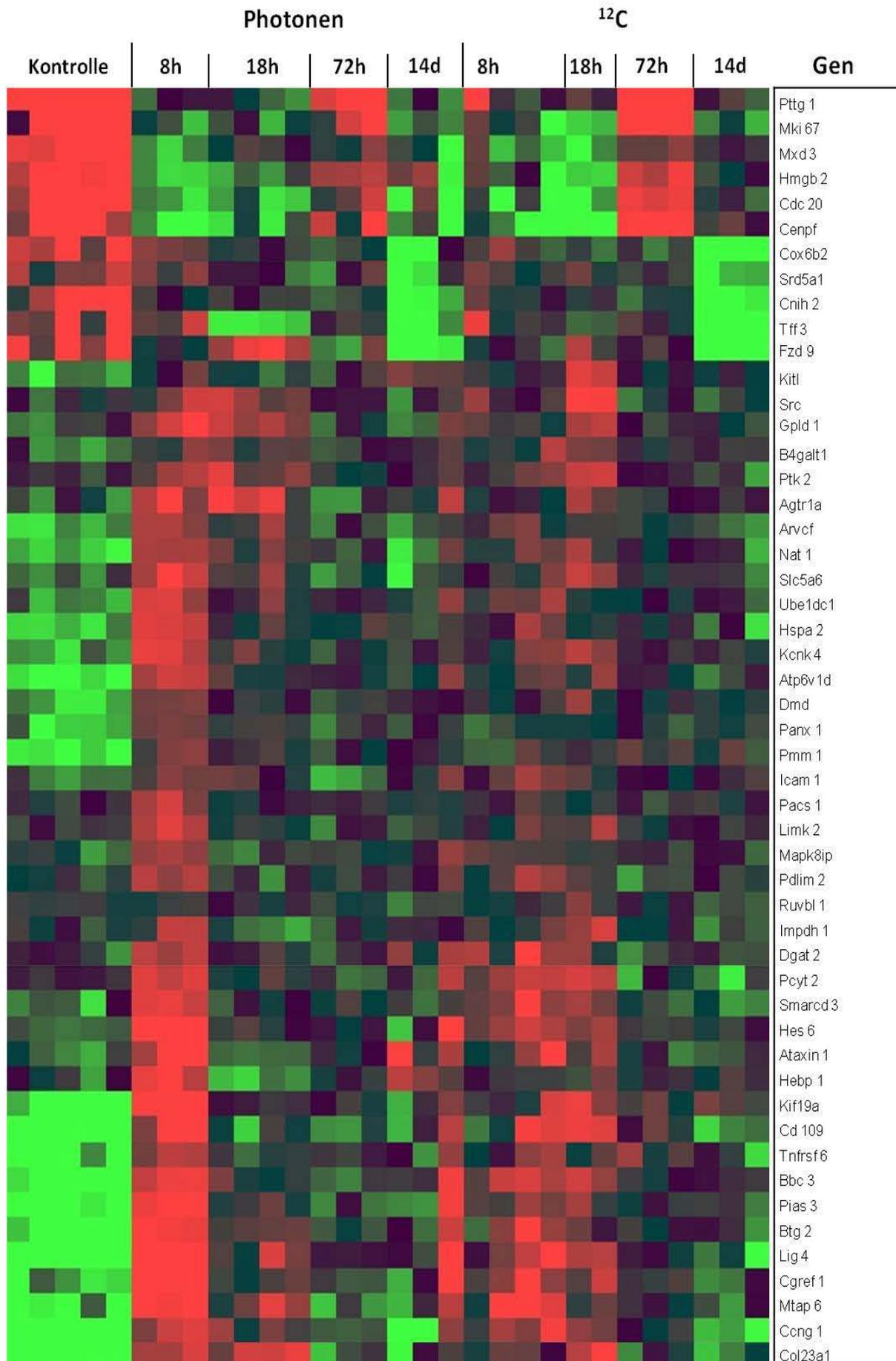


Abb. 38: Heatmap der Genexpressionsanalyse von unbehandelten HI- und H-Tumoren. Die grünen Intensitäten zeigen eine mindestens 2-fache Herunterregulierung, die roten Intensitäten eine mindestens 2-fache Hochregulierung der Gene an. Die Analyse erfolgte mit einem gepaarten zweiseitigen Student's T- test. Alle aufgelisteten Gene lieferten einen p- Wert $< 1 \times 10^{-4}$.





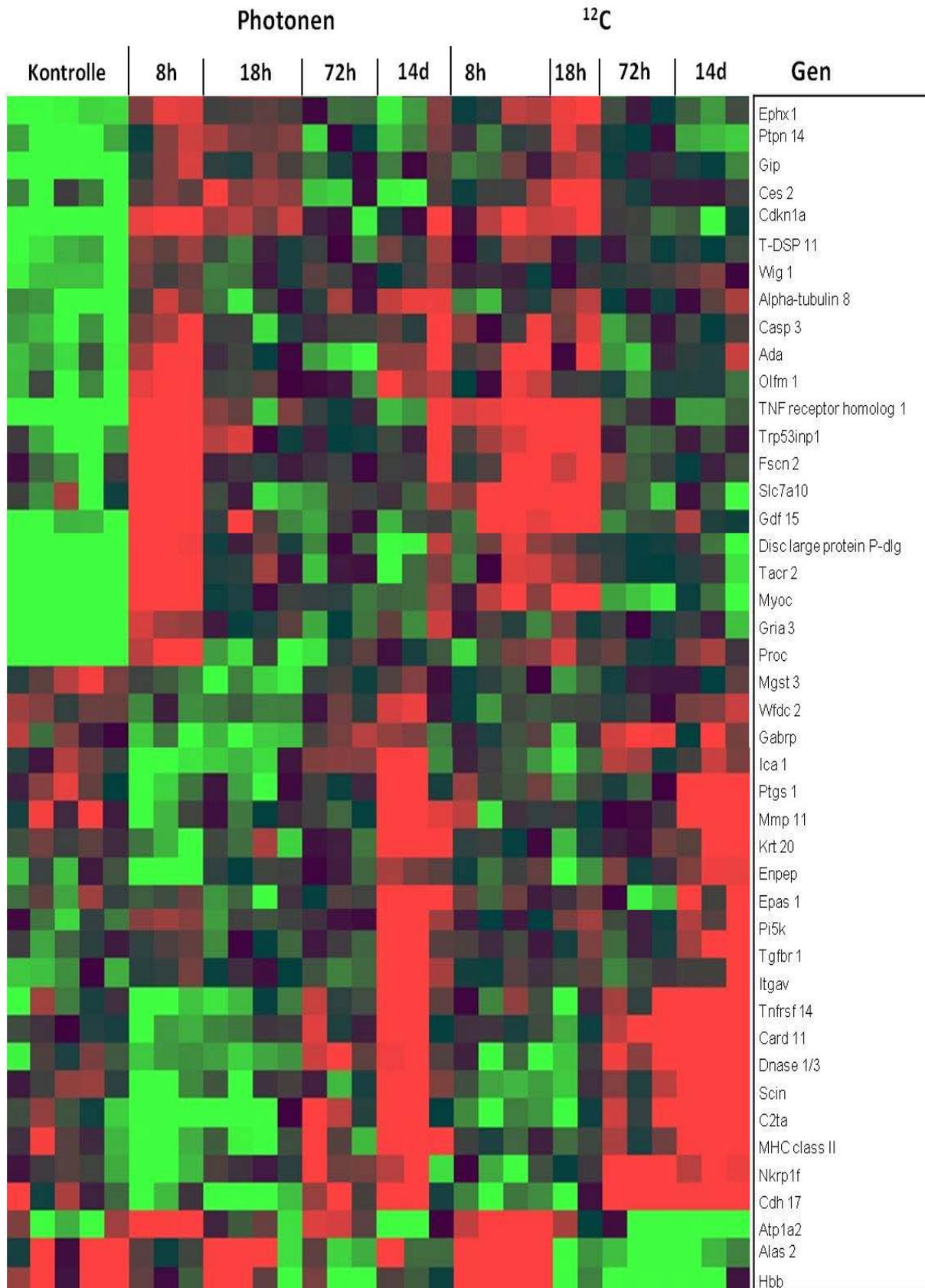


Abb. 39: Heatmap der Genexpressionsanalyse von 1 Fx Photonen oder ¹²C-bestrahlten HI-Tumoren im Zeitverlauf. Die grünen Intensitäten zeigen eine mindestens 2-fache Herunterregulierung, die roten Intensitäten eine mindestens 2-fache Hochregulierung der Gene an. Die Analyse erfolgte mit einer in 9 Gruppen eingeteilten einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA. Alle aufgelisteten Gene lieferten einen p-Wert < 1 x 10⁻⁴.

Für die drei Gene *Atp1a2*, *Alas 2* und *Hbb* zeigte sich bei 8 h nach ^{12}C - RT eine deutliche Erhöhung der Expression und ab 18 h bis einschließlich 14 d nach RT eine starke Runterregulierung. In den mit Photonen- bestrahlten Tumoren waren zwar auch Tendenzen einer frühen Hochregulation zu erkennen, allerdings eher bei 18 h nach RT und die Herunterregulierung erfolgte ebenso später und war sehr viel schwächer ausgeprägt.

Die Gene *Tnfrsf 14*, *Card 11*, *Dnase 1/3*, *Scin*, *C2ta*, *MHC class II Antigen*, *Nkrp 11* und *Cdh 17* wurden bei 8 und 18 h nach Photonen- RT deutlich weniger exprimiert als nach ^{12}C - RT. Jedoch waren diese Gene dann auch bereits bei 72 h nach ^{12}C - RT deutlich eher und stärker hochreguliert als zu vergleichbaren Photonen- Zeitpunkten.

ICAM-1 wurde 8 und 18 h nach RT für beide Strahlmodalitäten hochreguliert. Im Fall von Photonen- RT war ICAM-1 72 h nach RT wieder auf Kontrollniveau. Nach ^{12}C - RT blieb es auch nach 72 h auf einem leicht erhöhten Niveau.

Ausschließlich durch Photonen- RT induzierte Gene

Ein anderes Verhalten zeigt das *Proc*- Gen, welches in die Blutkoagulation involviert ist. Photonen induzierten eine frühe Hochregulierung, die nach 18 h wieder abgeklungen war. Dagegen gab es nach ^{12}C - RT überhaupt keine Regulation.

Des Weiteren wurde 18 h nach Photonen-RT eine Hochregulierung der MAP- Kinase festgestellt, die nach ^{12}C - RT fehlte.

Die Gene *Mgst 3*, *Wfdc 2*, *Gabrp*, *Ica 1*, *Ptgs 1*, *Mmp 11*, *Krt 20* und *Enpep* unterlagen nach ^{12}C - RT keiner Regulation, aber waren 8 und 18 h nach Photonen- RT deutlich herunterreguliert.

Vorwiegend durch ^{12}C - RT induzierte Gene

^{12}C - RT verursachte präferentiell eine Aktivierung der Gene *Tnfrsf 14*, *Card 11*, *Dnase 1/3*, *Scin*, *C2ta*, *MHC class II Antigen*, *Nkrp 11* und *Cdh 17*.

3.6 Charakterisierung von Tumorsubpopulationen

3.6.1 Analyse der drei Tumorsublinien (H, HI, AT1)

In den drei unbehandelten Sublinien des syngenen Dunning R3327- Prostatamodells wurden zunächst individuelle Tumorsubpopulationen durch Bestimmung des DNA-Gehaltes in Korrelation mit verschiedenen etablierten Zelloberflächenmarkern charakterisiert. Es wurden sowohl durchflusszytometrische Messungen, als auch histologische Untersuchungen durchgeführt.

3.6.2 Untersuchung verschiedener Subpopulationen mittels FACS- Analyse

Der Ploidiestatus (DNA- Index), die Zellzyklusverteilung sowie die qualitative und quantitative Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Tumorzellen zeichnen sich durch genomische Veränderungen und Zellzyklusderegulation aus. Alle drei untersuchten Sublinien enthielten einen ähnlichen Anteil an diploiden Zellen, jedoch variierte die Menge und Art an aneuploiden Zellen beträchtlich. Charakteristisch für die beiden gut differenzierten Sublinien H und HI war eine markante peridiploide Population (zwischen 60- 80%) mit einem DNA- Index von 1,07. Zusätzlich existierte noch eine stärker aneuploide Zellart mit einem übereinstimmenden DNA- Index von 1,8 (Tab. 7, Abb. 40: 6% in HI- und 11% in H-Tumoren).

Im Gegensatz dazu besaß der anaplastische AT1-Tumor einen hohen Anteil (33%) einer beinahe tetraploiden Zellfraktion mit einem DNA- Index von 1,8. Peridiploide Zellen waren nicht vorhanden.

Normale murine Prostatazellen waren alle rein diploid und zeigten einen Proliferationsindex (Anteil an proliferierenden Zellen) von 11,5%, was einer moderaten Zellteilungsrate entspricht. Im Vergleich dazu hatten die stark proliferativ aktiven Zellen des AT1-Tumors einen Proliferationsindex von 33% in aneuploiden und 27% in diploiden Zellen. H und HI-Tumoren wiesen eine deutlich geringere proliferative Aktivität auf (Tab. 7, Abb. 40). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Tumordifferenzierung mit der Heterogenität in Prostatatumoren korreliert und das R3327-Modell mit den verschiedenen Sublinien diese Heterogenität widerspiegeln kann.

Tab. 7: Zellzyklusanalyse und DNA- Indices von Prostatagewebe und Prostatakrebssublinien

Gewebe	Zellzyklusphasen [%]	Diploid DI 1,0 [%]	Aneuploid DI 1,07 [%]	Aneuploid DI 1,8 [%]
Prostata	G _{0/1}	88,5 ± 2,7	n.d.	n.d.
	S	3,8 ± 0,6	n.d.	n.d.
	G ₂ /M	7,8 ± 2,2	n.d.	n.d.
	Proliferationsindex	11,5 ± 2,8	n.d.	n.d.
	Gesamt	100,0 ± 0,0	n.d.	n.d.
R3327-H	G _{0/1}	94,0 ± 3,0	82,2 ± 5,3	49,5 ± 18,8
	S	2,7 ± 0,8	15,7 ± 6,3	25,4 ± 22,7
	G ₂ /M	3,3 ± 3,3	2,1 ± 1,8	1,6 ± 1,8
	Proliferationsindex	6,0 ± 3,0	17,8 ± 5,3	27,0 ± 22,6
	Gesamt	33,5 ± 31,3	59,1 ± 32,7	7,3 ± 4,0
R3327-HI	G _{0/1}	28,3 ± 37,5	86,3 ± 6,3	14,8 ± 33,2
	S	42,3 ± 11,8	9,1 ± 5,4	4,5 ± 10,1
	G ₂ /M	2,7 ± 5,0	4,7 ± 1,0	0,6 ± 1,4
	Proliferationsindex	13,5 ± 23,3	13,8 ± 6,3	5,2 ± 11,5
	Gesamt	15,3 ± 22,5	82,2 ± 28,0	2,5 ± 5,6
R3327-AT	G _{0/1}	73,1 ± 2,7	n.d.	66,6 ± 1,2
	S	6,6 ± 0,0	n.d.	20,7 ± 0,6
	G ₂ /M	20,3 ± 2,7	n.d.	12,5 ± 2,2
	Proliferationsindex	26,9 ± 2,7	n.d.	33,2 ± 1,5
	Gesamt	66,5 ± 10,7	n.d.	33,5 ± 10,7

Anmerkung: Zahlen sind aus den Zellzyklusverteilungen entnommen ([Abb. 40](#)) und als Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

n.d.: nicht detektierbar

DI: DNA- Index

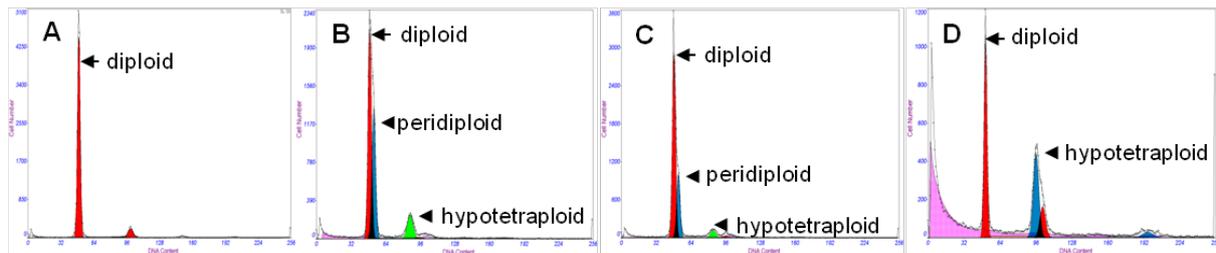


Abb. 40: DNA- Indices und Zellzyklusverteilung für eine Prostata aus der Ratte (A), R3327-H (B), -HI (C) und -AT1 (D) Tumore: Die zwei differenzierten Tumorsublinien R3327-H und -HI sind durch einen peridiploide Fraktion charakterisiert (DNA- Index 1,0; blau eingefärbt) und einer hoch aneuploiden Zellfraktion (grün gefärbt) mit einem DNA- Index von 1,8. Die rot eingefärbte Population repräsentiert die diploiden Zellen. Im Gegensatz dazu hat die anaplastische Sublinie AT1 eine diploide Fraktion (rot) und nur eine aneuploide Fraktion mit einem DNA- Index von 1,8 (blaue Farbe).

Die Expression von möglichen Zelloberflächenmarkern wurde zuerst als Machbarkeitsstudie in Form einer Einzelparameter- Analyse durchgeführt. Hierzu wurden in den Sublinien AT1, H und HI sowie in muriner Prostata Zellpopulationen mit Expression von CD24, CD44, CD133, CD326, Zytokeratin 5/8 und Zytokeratin 19 detektiert (**Tab. 8**). Der anaplastische AT1-Tumor zeigte jeweils den höchsten Gehalt an allen untersuchten Oberflächenmarkern. Jedoch traf dies nicht auf die zytoplasmatischen Zytokeratine zu. Der sehr gut differenzierte H-Tumor zeigte ein vergleichbares Markerprofil zur murinen Prostata, allerdings mit einem starken Gehalt an Zytokeratin 19. Unerwartet waren die sehr geringen Mengen an Zytokeratinen in der murinen Prostata (**Tab. 8**).

Tab. 8: Einzelparameter FACS- Analyse von Oberflächenmarkern und Zytokeratinen. Die Zahlen entsprechen Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Für Zytokeratin 5/8 und 19 sind nur Einzelmessungen vorhanden.

	CD24⁺ [%]	CD44⁺ [%]	CD133⁺ [%]	CD326⁺ [%]	ZK5/8⁺ [%]	ZK19⁺ [%]
murine Prostata	3,0 \pm 0,8	4,8 \pm 6,3	10,5 \pm 7,9	9,3 \pm 6,6	0,7	1,4
R3327-H	5,9 \pm 3,0	8,0 \pm 5,8	2,9 \pm 1,7	6,2 \pm 4,4	2,3	34,5
R3327-HI	8,5 \pm 8,1	20,3 \pm 14,6	6,6 \pm 7,3	11,1 \pm 8,8	4,5	87,1
R3327-AT	15,3 \pm 10,8	24,6 \pm 13,4	16,9 \pm 8,7	20,5 \pm 9,9	1,0	77,7

Die weitere Charakterisierung der Subpopulationen erfolgte über die Detektion von doppelt positiven Zellen (CD24⁺/CD44⁺, CD133⁺/CD326⁺, CD24⁺/CD326⁺, CD133⁺/CD44⁺) in Prostata und Tumoren (**Tab. 9**). Die kleinste Anzahl (0,7 \pm 1,2) doppelt positiver CD133⁺/CD44⁺ Zellen wurde im H-Tumor gefunden. Wie in der Einzelparameter Analyse

hatte der AT1-Tumor mit $17,9\% \pm 8,7$ $CD24^+/CD44^+$ und $9,9\% \pm 7,1$ $CD24^+/CD326^+$ den höchsten Gehalt an doppelt positiven Zellen (**Tab. 9**).

Tab. 9: Multiparametrische FACS- Analyse von Oberflächenmarkern. Die Zahlen entsprechen Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Für mit * markierte Werte sind nur Einzelmessungen vorhanden.

	CD24⁺/CD44⁺ [%]	CD133⁺/CD326⁺ [%]	CD24⁺/CD326⁺ [%]	CD133⁺/CD44⁺ [%]
normale Prostata	$3,5 \pm 4,7$	$8,4 \pm 7,5$	$3,4^*$	$8,1^*$
R3327-H	$3,8 \pm 2,6$	$2,9 \pm 2,3$	$1,2 \pm 1,3$	$0,7 \pm 1,2$
R3327-HI	$5,8 \pm 9,2$	$6,5 \pm 9,4$	$1,5 \pm 1,0$	$2,9 \pm 0,1$
R3327-AT	$17,9 \pm 8,7$	$15,2 \pm 11,4$	$9,9 \pm 7,1$	$9,9 \pm 10,5$

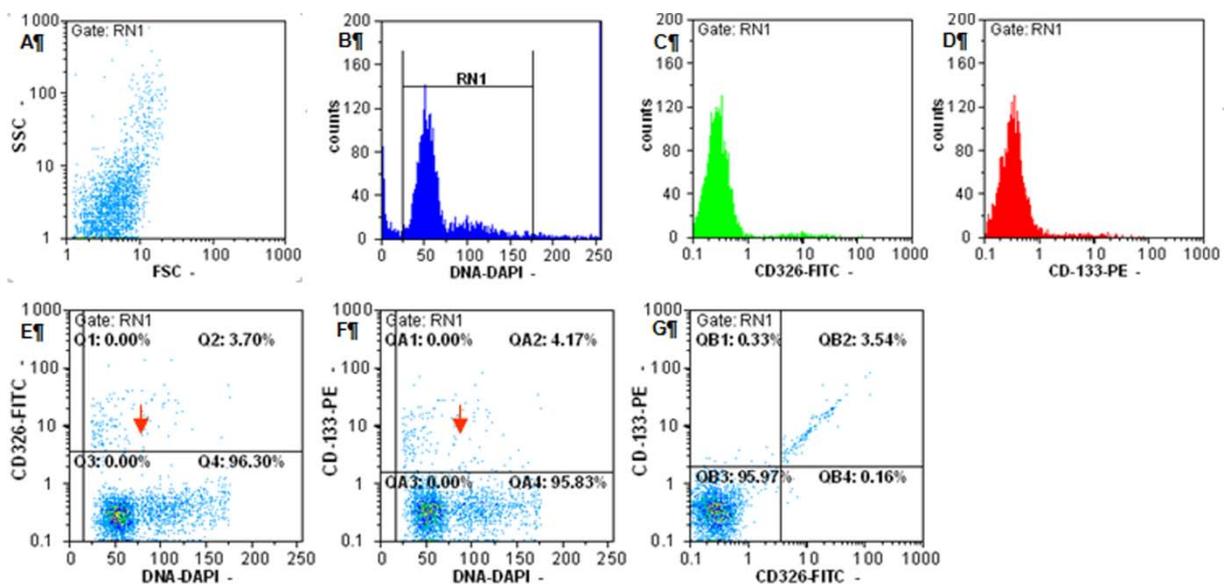


Abb. 41: Multiparametrische Analyse des differenzierten Dunning R3327-H Tumors markiert mit CD326-FITC, CD133-PE und DAPI. (A) Zellgröße und Granularität; (B) DNA-Gehalt mit aneuploiden Zellen mit einem DNA- Index von 1,07 und 1,8; (C) Histogramm für die CD326-FITC Expression; (D) Histogramm für die CD133-PE Expression; (E) Dot Plot Analyse des DNA-Gehalts gegen CD326-FITC, der Pfeil markiert $G_{0/1}$ -Phase der aneuploiden Zellpopulation mit einer geringen Expression von CD326-FITC; die diploide Zellfraktion ist negativ; (F) Dot Plot Analyse des DNA-Gehalts gegen CD133-PE, der Pfeil markiert $G_{0/1}$ -Phase der aneuploiden Zellpopulation mit einer geringen Expression von CD133-PE; die diploide Zellfraktion ist unmarkiert; (G) Dot Plot Analyse von CD326-FITC gegen CD133-PE für die Detektion von CD133-PE (QB1) oder CD326-FITC (QB4) einzelpositiven Zellen sowie $CD326^+/CD133^+$ Zellen (QB2).

Zusätzlich wurde untersucht in welcher Zellzyklusphase sich die Oberflächenmarkerpositiven Zellen befinden und ob eine Korrelation zur aneuploiden Population besteht. Exemplarisch ist diese Analyse für die Marker CD133 und CD326 in AT1, H und HI unten stehend aufgeführt (Abb. 41 bis Abb. 43). Die Pfeile markieren jeweils die positiven Zellen, die aus der aneuploiden Subpopulation hervorgehen. Die Anzahl an CD133⁺- oder CD326⁺-Zellen war im H- sehr gering (Abb. 41), höher im HI- (Abb. 42) und im AT1-Tumor am höchsten (Abb. 43). Für den AT1-Tumor war eindeutig zu erkennen, dass fast alle Marker⁺-Zellen aus der aneuploiden und nicht aus der diploiden Subpopulation stammten. Diese Ergebnisse zeigen damit eine stärkere Expression von putativen Stammzellmarkern in Subpopulationen mit höherem Ploidiegrad. Die höchste Expression wurde bei einem DNA-Index von 1.8 erreicht. Alle untersuchten Oberflächenmarker wurden vermehrt in der G_{0/1}-Phase und nur wenige in der G₂/M-Phase der aneuploiden Zellen exprimiert.

Folglich konnte gezeigt werden, dass die drei untersuchten Tumorklinien eindeutig in ihrem Ploidiestatus differieren. Jeder Tumor hat ein charakteristisches Oberflächenmarkerprofil, welches mit den Zellzyklusphasen und der Menge an genomischen Veränderungen korreliert.

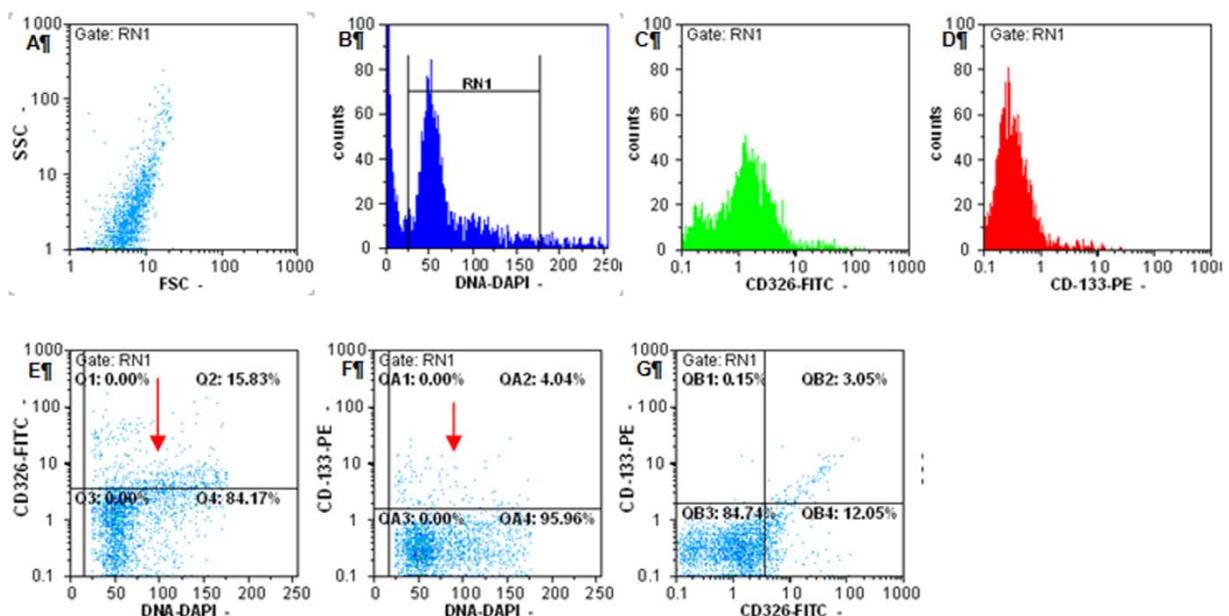


Abb. 42: Multiparametrische Analyse des differenzierten Dunning R3327-HI Tumors markiert mit CD326-FITC, CD133-PE und DAPI. (A) Zellgröße und Granularität; (B) DNA-Gehalt mit aneuploiden Zellen mit einem DNA-Index von 1,07 und 1,8; (C) Histogramm für die CD326-FITC Expression; (D) Histogramm für die CD133-PE Expression; (E) Dot Plot Analyse des DNA-Gehalts gegen CD326-FITC, der Pfeil markiert die G_{0/1}-Phase, rechts davon liegen Zellen in der S-Phase und der G₂/M-Phase, der aneuploiden Zellpopulation mit einer moderaten Expression von CD326-FITC; die diploide Zellfraktion ist negativ; (F) Dot Plot Analyse des DNA-Gehalts gegen CD133-PE, der Pfeil markiert G_{0/1}-Phase der aneuploiden Zellpopulation mit einer geringen Expression von CD133-PE; die diploide Zellfraktion ist unmarkiert; (G) Dot Plot Analyse von CD326-FITC gegen CD133-PE für die Detektion von CD133-PE (QB1) oder CD326-FITC (QB4) einzelpositiven Zellen sowie CD326⁺/CD133⁺ Zellen (QB2).

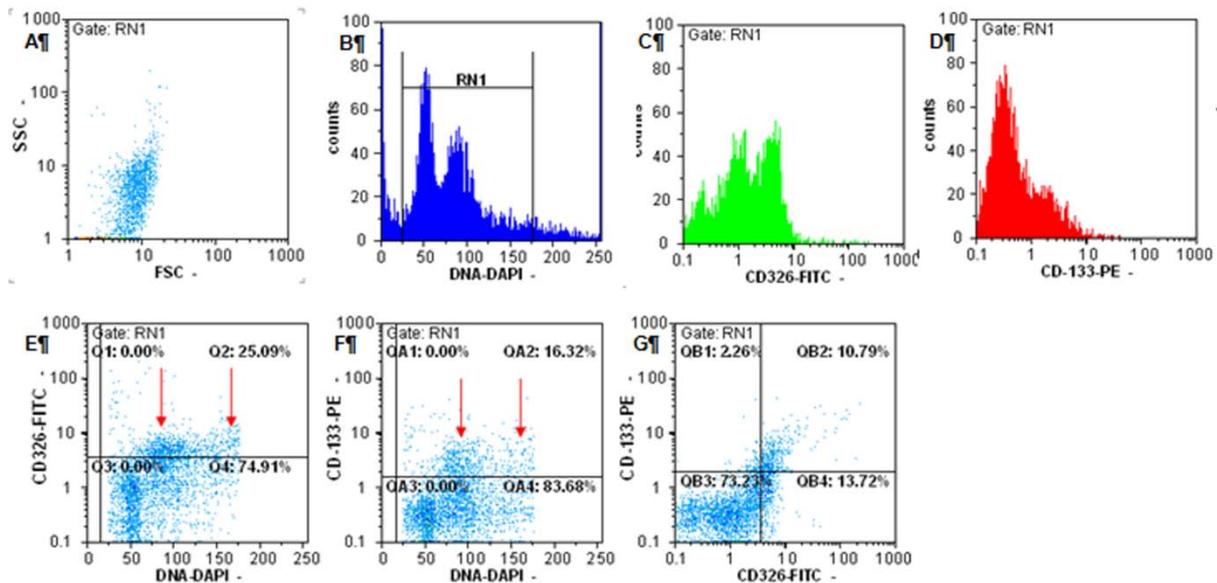


Abb. 43: Multiparametrische Analyse des differenzierten Dunning R3327-AT1 Tumors markiert mit CD326-FITC, CD133-PE und DAPI. (A) Zellgröße und Granularität; (B) DNA-Gehalt mit aneuploiden Zellen mit einem DNA- Index von 1,8; (C) Histogramm für die CD326-FITC Expression; (D) Histogramm für die CD133-PE Expression; (E) Dot Plot Analyse des DNA-Gehalts gegen CD326-FITC, die Pfeile markieren $G_{0/1}$ -Phase und G_2/M -Phase der aneuploiden Zellpopulation mit einer starken Expression von CD326-FITC; die diploide Zellfraktion ist negativ; (F) Dot Plot Analyse des DNA-Gehalts gegen CD133-PE, die Pfeile markieren $G_{0/1}$ -Phase und G_2/M -Phase der aneuploiden Zellpopulation mit einer starken Expression von CD133-PE; die diploide Zellfraktion ist unmarkiert; (G) Dot Plot Analyse von CD326-FITC gegen CD133-PE für die Detektion von CD133-PE (QB1) oder CD326-FITC (QB4) einzelpositiven Zellen sowie CD326⁺/CD133⁺ Zellen (QB2).

3.6.3 Mikroskopische Untersuchung verschiedener Subpopulationen

Um die räumliche Verteilung von Zellen mit definierten Oberflächenmarkern in den drei Tumorsublinien zu erhalten, wurden parallel zu den FACS- Analysen mit denselben Antikörpern histologische Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Repräsentative Bilder sind in **Abb. 44** dargestellt. Da sich herausstellte, dass die Ergebnisse sehr stark von der Fixierungsmethode des Gewebes abhingen, wurden verschiedene Fixative mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in **Tab. 10** zusammengefasst. Mit Ausnahme von Zytokeratin-19 wurden die besten Färbeergebnisse mit Methanol/ Azeton- fixierten Schnitten erzielt. Außer CD133 in normaler muriner Prostata konnten alle Oberflächenmarker in den untersuchten Geweben mit Hilfe der verschiedenen Fixierungstechniken angefärbt werden (**Tab. 10**). Generell sind Intermediärfilamente wie die Zytokeratine leichter anzufärben und damit unabhängiger von der Fixierungsmethode als die fragilen kleinen Epitope der Oberflächenmoleküle.

Tab. 10: Einfluss der Gewebefixierung auf die Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern

	Fixierung	CD24	CD44	CD133	CD326	ZK 5/8	ZK 19
normale Prostata	nativ	+	+	-	+	++	+
	4% PFA/PBS	*	*	*	*	++	*
	Methanol/Azeton	-	-	*	*	++	-
R3327-H	nativ	+	+	-	-	++	+++
	4% PFA/PBS	+	+	+	+	++	+++
	Methanol/Azeton	-	+++	-	-	+++	+
R3327-HI	nativ	++	-	-	-	+++	+++
	4% PFA/PBS	*	+	-	-	+++	+
	Methanol/Azeton	-	+	+	-	+++	-
R3327-AT	nativ	-	+	-	-	-	+++
	4% PFA/PBS	++	+	+	+	+	+++
	Methanol/Azeton	+	+++	+	+	-	-

*: wegen zu hohem Hintergrund keine eindeutige Aussage möglich

-: keine solide Färbung unter diesen Färbebedingungen in diesem bestimmten Gewebe sichtbar

+: markiert eine solide sichtbare und wiederholbare Färbung

(+): nur Einzelzellen angefärbt

(++): mehrere untereinander verbundene positive Zellen

(+++): die Mehrheit der Zellen war positiv

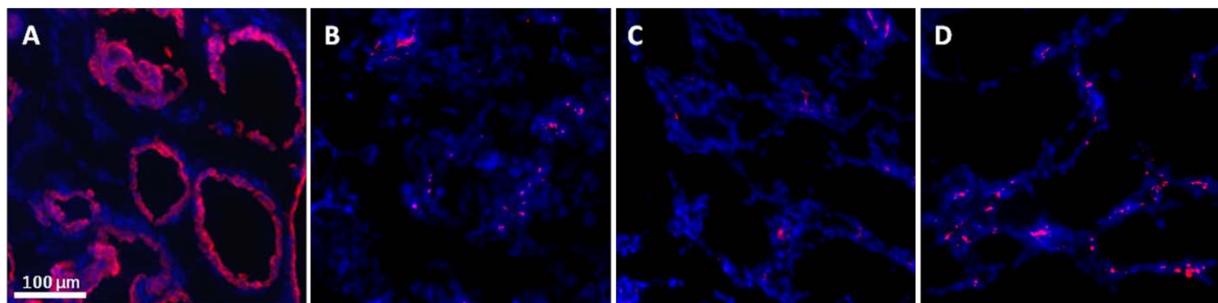


Abb. 44: Immunfluoreszenzdarstellung von Zytokeratinen und Oberflächenmarkern (rot) in den drei Sublinien des Dunning R3327 Prostatakrebsmodells. (A) ZK 5/8 in nativen (luftgetrockneten) H-Tumoren; (B) CD44 in 4% PFA/ PBS fixierten HI-Tumoren; (C) CD133 in Methanol/ Azeton fixierten HI-Tumoren; (D) CD326 in nativen (luftgetrockneten) HI-Tumoren. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Vergrößerung 200-fach. Größenmaßstab: 100 µm.

3.6.4 Etablierung von Tumorsublinien *in vitro*

Um die Ausbeute für zukünftige Zellsortierungen zu erhöhen und um die drei Tumorsublinien weiteren *in vitro* Test zugänglich zu machen, sollten alle drei Linien in der Zellkultur etabliert werden. Die **Tab. 11** zeigt eine Zusammenfassung der durchgeführten Etablierungsversuche.

Es wurden die folgenden drei Versuchsansätze gewählt:

- Gesamttumorverdau und unmittelbare Übertragung in die Zellkultur
- Gesamttumorverdau mit anschließender Anreicherung von CD24⁺ - Zellen mittels MACS- Microbeads
- Gesamttumorverdau mit anschließender FACS- Sortierung nach CD24⁺/CD45⁻ - Zellen

Da das R3327- Prostatakarzinom epithelialen Ursprungs ist, wurde der epitheliale Oberflächenmarker CD24 für die Positivselektion verwendet. Die Grundüberlegung CD45⁺ - Zellen zu eliminieren bestand darin, dass z.B. Fibroblasten, die die Etablierung primärer Zelllinien erheblich stören, diesen Oberflächenmarker ebenfalls tragen könnten.

Tab. 11: Zellkultur-Etablierungsansätze für die drei PCa-Tumorlinien AT1, HI, H.

Ausgangsmaterial	Zellkultur etabliert?		
	AT1	HI	H
Gesamttumorverdau	Ja	Nein (abgestorben nach 5 Passagen)	Ja
MACS- Anreicherung CD24 ⁺	Ja	Ja	Ja
FACS- Sortierung CD24 ⁺ /CD45 ⁻	Ja	Nein (Kontamination)	Nein (kein Wachstum)

Voruntersuchungen ergaben eine Zellvitalität nach MACS- bzw. FACS- Prozedur von 80 - 85%.

Für die AT1-Sublinie war die Etablierung einer Zellkultur mit allen 3 Varianten erfolgreich (**Tab. 11**).

Für die Sublinie HI konnte bisher nur mit den CD24- angereicherten MACS- Zellen eine Zellkultur etabliert werden. Im Falle des H-Tumors konnten sowohl aus dem Gesamtzellverdau, als auch aus der MACS- Anreicherung Zellen gewonnen werden, die *in vitro* passagierbar waren. Allerdings sahen die etablierten Zelllinien morphologisch unterschiedlich aus (**Abb. 45**), so dass eine weitere Charakterisierung nach bewiesener Tumorinduktion (*in vivo*) notwendig ist.

Während die AT1- Zelllinie eine typisch epitheliale Morphologie aufwies, bestand die HI-Zelllinie aus wesentlich kleineren kubischen Zellen, die einen ausgedehnten Zellverband eingingen. Die H- Zelllinie war dagegen durch extrem große flächige Zellen mit wenig kontrastarmem Zytoplasma gekennzeichnet.

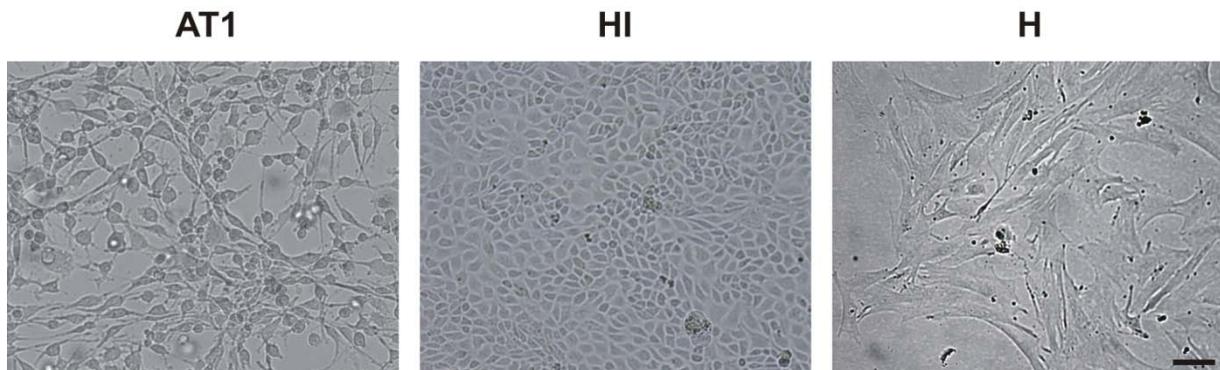


Abb. 45: Lichtmikroskopische Aufnahme von AT1-, H- und HI-Zellen in vitro. Größenmaßstab: 100 μm . Vergrößerung: 100-fach.

Der Erfolg der MACS- Anreicherung wurde durch den Vergleich von FACS- Analysen der $\text{CD24}^+/\text{CD45}^-$ - Zellen vor und nach MACS- Anreicherung bestätigt (**Tab. 12**). Besonders für den H und den AT1-Tumor brachte die Anreicherung gute Ergebnisse. Allerdings war die Ausgangszahl an CD24^+ - Zellen im AT1-Tumor zu gering ($< 1\%$), so dass eine MACS- Anreicherung lediglich zur Erhöhung der Zellzahl für eine anschließende FACS- Sortierung zukünftig verwendet werden sollte. Trotz einer leichten Erhöhung der CD45^+ - Zellen im H-Tumor war die Anreicherung auf 75% CD24^+ - Zellen sehr erfolgreich. Beim HI-Tumor führte die MACS-Prozedur zwar zu einer Verringerung der Zahl an CD24^+ - Zellen, gleichzeitig reduzierte sich aber auch die Anzahl an unerwünschten CD45^+ - Zellen.

Nach einer 4- wöchigen Passage, der aus der MACS- Anreicherung etablierten Zelllinien, wurde eine erneute FACS- Analyse durchgeführt. Für die H-Zellkultur ergab sich ein Wert von 88% CD24^+ - Zellen (vergleichbar zum Zustand nach der MACS- Anreicherung, siehe **Tab. 12**). Im Vergleich hierzu hatte die AT1-Zellkultur weiterhin nur einen geringen Anteil an CD24^+ - Zellen (ca. 6%). Im Gegensatz dazu waren nach 4- wöchiger Zellkultur ca. 80% der HI-Zellen CD24^+ .

Tab. 12: FACS-Analyse der drei Tumorsublinien vor und nach erfolgter CD24 MACS-Anreicherung

Zellen [%]	AT1 (vor / nach)	HI (vor / nach)	H (vor / nach)
CD24^+	0,03 / 17	64 / 50	28 / 75
CD45^+	95 / 34	32 / 10	7,8 / 15
$\text{CD24}^+/\text{CD45}^-$	0 / 14	50 / 37	26 / 47

Nach erfolgreicher Etablierung der Zellkulturen *in vitro*, stellte sich die Frage der *in vivo* Tumorinduktionsfähigkeit. Es wurden alle vorhandenen Zellkulturen (**Tab. 11**) subkutan mit Matrigel in die Oberschenkel von COP-Ratten injiziert. Die Nachbeobachtungszeit läuft bei den meisten Versuchen noch, deshalb hier nur ein kurzer Überblick:

Gesamttumorverdau:

AT1: 150.000 – 800.000 Zellen injiziert → bis zum Tag 111 kein Tumor
 H: 80.000 – 1.500.000 Zellen injiziert → bis zum Tag 102 kein Tumor

MACS- Anreicherung:

AT1: 10 – 200.000 Zellen injiziert → nach 190 Tagen kein Tumor
 (abgeschlossen)
 HI: 1 - 2 Mio. Zellen injiziert → bis zum Tag 83 kein Tumor
 H: 1 Mio. Zellen injiziert → bis zum Tag 83 kein Tumor

CD24⁺/CD45⁻ FACS- SORT:

AT1: 3.000 – 375.000 Zellen injiziert → bis zum Tag 102 kein Tumor

CD24⁻/CD45⁻ FACS- SORT:

AT1: 1.000 – 450.000 Zellen injiziert → nach 103 Tagen (1 Tumor, 450.000 Zellen)
 H: 1.000 – 100.000 Zellen injiziert → bis zum Tag 157 kein Tumor

Anhand dessen zeigte sich bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Tumorinduktionsfähigkeit von Tumorzellen aus den etablierten Kulturen. Die Beobachtungszeit wird mindestens bis 200 Tage ausgedehnt werden, um mögliche spät wachsende Tumore zu detektieren.

Zusätzlich wurden aus den MACS- Anreicherungen für die Zellkultur (siehe **Tab. 12**) auch direkt angereicherte Zellen aller drei Sublinien *s.c.* in den Oberschenkel von COP-Ratten injiziert. Die Zellen standen allerdings weitere 8 h auf Eis, so dass ihre Tumor- induzierende Kapazität wahrscheinlich reduziert war. Nach 300 Tagen Beobachtungszeit konnten für AT1 und H-Sublinie keine Tumore gefunden werden. Im Falle des HI-Tumors sind bei zwei von fünf Injektionen Tumore entstanden, so dass eine Tumor- induzierende Kapazität eindeutig nachgewiesen wurde.

3.6.5 Bestimmung der Tumorinduktionsraten (LDA)

Um den Einfluss von Bestrahlung auf die Tumor-induzierenden Zellen (TICs) zu untersuchen, galt es zunächst Tumorzellen mit klonogener Fähigkeit zu identifizieren. Da im Dunning Prostatatumormodell unter *in vivo* Bedingungen TICs bisher nicht charakterisiert sind, entschieden wir uns aufgrund der Voruntersuchungen (siehe [Kapitel 3.6.4](#)) für eine FACS- Sortierung von CD24⁺/CD45⁻ - Zellen aus den drei Sublinien AT1, HI und H (Methode beschrieben in [Kapitel 2.11](#)).

Die Tumorinduktionsanalyse (*Limiting Dilution assay*, LDA) für den AT1 und H-Tumor sind in [Tab. 13](#) zusammengefasst.

Tab. 13: FACS- SORT von CD24⁺/CD45⁻ - Zellen zur Bestimmung der Tumorinduktionsraten für den AT1 und H-Tumor. Limiting Dilution assay (LDA) wurde mit 10 - 1.000 Zellen (AT1) bzw. 10 - 50.000 Zellen (H) subkutan in den Oberschenkel von COP-Ratten durchgeführt. Angegeben ist die Anzahl an gewachsenen Tumoren / Anzahl an Injektionen (Spots) pro Zellzahl

Sortierung	Injizierte Zellen AT1	Spots	Injizierte Zellen H	Spots
CD24⁺/CD45⁻	10	0 / 4	10	0 / 4
	100	0 / 8	100	1 / 8
	1.000	0 / 8	1.000	0 / 8
			10.000	3 / 8
			50.000	2 / 4
Nachbeobach- tungszeit	145 Tage		180 Tage	Wachstum seit Tag 142 bzw. 167

Für den **AT1-Tumor** wurden 10, 100 und 1.000 CD24⁺/CD45⁻ - Zellen s.c. in den Oberschenkel des Tiers injiziert. Da die Ausgangsmenge an CD24⁺/CD45⁻ - Zellen im AT1-Tumor mit 0,5% sehr gering war, war es nicht möglich höhere Zellzahlen zu sortieren. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte keine Tumorinduktion für AT1-Tumore beobachtet werden. Womöglich sind längere Nachbeobachtungszeiten nötig, bis ein palpierbarer Tumor entsteht.

Im Falle des **H-Tumors** wurden in der FACS- Analyse CD24⁻, CD24^{dim} (intermediär gefärbt) und CD24⁺ (stark positiv) – Zellen detektiert. Es wurden nur stark positive CD24⁺ - Zellen sortiert. Dadurch erhält man lediglich 14% CD24⁺/CD45⁻ - Zellen im Ausgangstumor anstatt 60% für die Gesamt- CD24 - Population (CD24⁺ und CD24^{dim}) im H-Tumor. Aus einem

Ausgangstumor war deshalb bisher nur die Gewinnung von relativ geringen CD24⁺/CD45⁻ - Mengen (Injektionen bis 50.000 Zellen) möglich.

Seit Tag 142 post Injektion waren zwei H-Tumore (10.000 bzw. 50.000 Zellen injiziert) und seit Tag 167 vier weitere Tumore (100, 10.000; 50.000 Zellen) palpierbar, allerdings zeigen alle ein sehr langsames Wachstum.

Zusätzlich wurde eine Negativpopulation mit CD24⁻/CD45⁻ - Zellen (1.000, 10.000, 100.000 Zellen) des AT1- und des H-Tumors injiziert. Zum derzeitigen Zeitpunkt (180 Tage post Injektion) konnten keine Tumore detektiert werden.

Es wurden auch weitere Sortierungen nach CD45⁻/Thy1⁻ - Zellen vorgenommen, die zu einer deutlich höheren Ausbeute führten. Da bereits 56% der Zellen im H-Tumor (und 14% im AT1-Tumor) CD45⁻/Thy1⁻ - Zellen waren, konnten über 2 Mio. Zellen sortiert werden. Es wurden pro Tumorminie 1.000, 10.000, 100.000 und 500.000 CD45⁻/Thy1⁻ - Zellen injiziert, aber auch nach 300 Tagen Beobachtungszeit konnten keine Tumore beobachtet werden.

Im **HI-Tumor** wurden ebenfalls CD24⁺ und CD24^{dim} - Zellen detektiert. Nur die stark positiven CD24⁺ - Zellen (10% des HI-Tumors) wurden sortiert, mit Zellzahlen von 10 - 200.000 injiziert und für 297 Tage nachbeobachtet (**Tab. 14**). In diesem Experiment konnte eine klare Abhängigkeit von injizierter CD24⁺/CD45⁻ - Zellzahl und der Tumorinduktionsrate nachgewiesen werden.

Tab. 14: FACS- SORT von CD24⁺/CD45⁻ - Zellen zur Bestimmung der Tumorinduktionsraten für den HI-Tumor. Limiting Dilution assay (LDA) wurde mit 10 - 200.000 Zellen subkutan in den Oberschenkel von COP-Ratten durchgeführt. Angegeben ist die Anzahl an gewachsenen Tumoren / Anzahl an Injektionen (Spots) pro Zellzahl, die daraus berechnete Tumorinduktionsrate und die Induktionszeit, bestimmt als die Zeit eines erstmalig auftretenden palpierbaren Tumors post Injektion. Die Nachbeobachtungszeit betrug 297 Tage. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD.

Injizierte Zellen	Tumorwachstum	Tumorinduktion [%]	Induktionszeit [Tage]
10	0 / 4	0	-
100	3 / 8	37,5	84 \pm 26
1.000	7 / 8	87,5	71 \pm 23
10.000	6 / 8	75	73 \pm 22
100.000	4 / 4	100	85 \pm 13
200.000	4 / 4	100	63 \pm 20

Nur 100 Zellen waren ausreichend um Tumorwachstum zu induzieren. Je mehr Zellen injiziert wurden, desto höher war die Wahrscheinlichkeit einer Tumorinduktion. Ab einer Zellzahl von 100.000 lag die Tumorinduktionsrate bei 100%. In der Regel war die Zeit bis zum ersten Auftreten der Tumore unabhängig von der injizierten Zellzahl. Lediglich nach Injektion von 200.000 Zellen war die Latenzzeit etwas verkürzt. Bei der kleinsten eingesetzten Zellzahl (10 Zellen) konnten keine Tumore innerhalb von 300 Tagen detektiert werden.

Schlussfolgernd ergibt sich eine hohe Tumorinduktionsrate für CD24⁺/CD45⁻ - Zellen des HI-Tumors, da bereits 100 Zellen in der Lage waren einen kompletten Tumor zu generieren (**Abb. 46**).

Ein CD24⁺/CD45⁻ - sortierter HI-Tumor der *in vivo* angewachsen war, wurde erneut einer FACS- Analyse unterzogen (**Tab. 15**). Er wies weiterhin einen hohen Anteil an CD24⁺ - Zellen vergleichbar zum Zeitpunkt nach dem Sortieren auf, aber die Anzahl an CD45⁺ - Zellen war deutlich erhöht. Diese CD45⁺ - Zellen könnten ein immunogenes Infiltrat darstellen, so dass ein gewisser Anteil an CD45⁺ - Zellen *in vivo* immer vorhanden sein wird (syngenes Modell). In der Zellkultur (etabliert aus der MACS- Anreicherung) sowie direkt nach dem SORT waren alle CD45⁺ - Zellen eliminiert.

Tab. 15: Analyse des HI-Tumors vor und nach erfolgter CD24⁺/CD45⁻ - FACS- Sortierung sowie eines subkutan gewachsenen CD24⁺/CD45⁻ Tumors aus dieser Sortierung. Es sind lediglich die CD24⁺ d.h. stark positiven Zellen angegeben, da diese auch für den FACS- SORT verwendet wurden.

Zeitpunkt	Vor SORT [%]	Nach SORT [%]	<i>In vivo</i> [%]
CD24 ⁺ high	10	84	80
CD45 ⁺	4	0	12

Die Morphologie von ursprünglichen HI-Tumoren, die zur Sortierung benutzt wurden, entspricht der Morphologie *in vivo* gewachsener CD24⁺/CD45⁻ - Tumore (**Abb. 46**). In beiden Tumoren waren sowohl die für den HI-Tumor typischen cribriformen Zellen sowie stromale Bereiche und Gefäßstrukturen sichtbar. Zusätzlich waren auch die rotgefärbten Mucin sezernierenden drüsigen Strukturen zu erkennen.

Von den CD24⁺/CD45⁻ - induzierten HI-Tumoren (**Tab. 14**) wurden Fragmente *in vivo*, nach der für Bestrahlungsexperimente üblichen Methode (siehe **Kapitel 2.3**), weitertransplantiert. Alle Sekundärtumore aus diesen Fragmenten zeigten Wachstum und hätten nach 4 Wochen die gewünschte Bestrahlungsgröße erreicht.

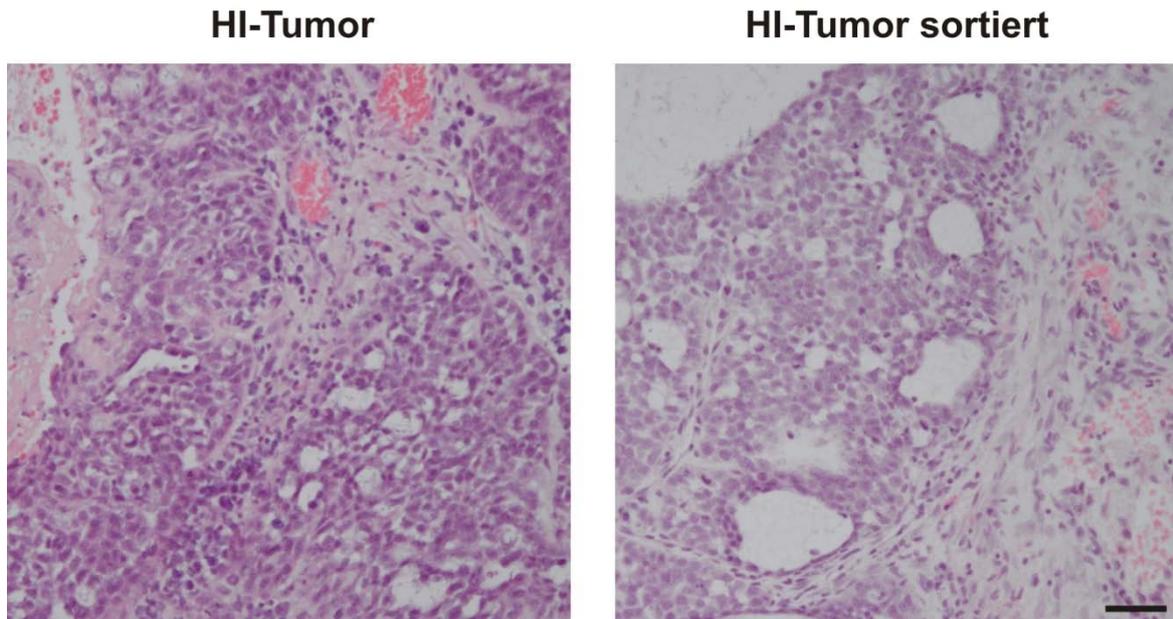


Abb. 46: HE-Färbung eines unbehandelten Donor HI-Tumors und des *in vivo* gewachsenen CD24⁺/CD45⁻ sortierten HI-Tumors. Größenmaßstab: 50 μ m. Vergrößerung: 100-fach.

3.6.6 Einfluss der Bestrahlung auf die CD24- Expression in HI-Tumoren

Um den Einfluss von konventioneller Photonen- RT und hoch-LET Kohlenstoffionenbestrahlung auf die Anzahl Tumor-induzierender Zellen genauer zu prüfen, wurde am Beispiel der HI-Sublinie eine qualitative und quantitative Analyse auf histologischer Ebene durchgeführt. Als Marker für Zellen mit Tumor-initiiender Eigenschaft wurde aufgrund der vorausgegangenen Studien (siehe [Kapitel 3.6.5](#)) ein monoklonaler Antikörper gegen CD24 der Ratte eingesetzt. Das histologische Material wurde aus der Longitudinalstudie entnommen (siehe [Kapitel 2.9](#)).

Die immunhistologischen Ergebnisse zeigen eine hochspezifische Färbung von Oberflächenstrukturen ([Abb. 47](#)) sowie eindeutige zeitliche Unterschiede im CD24- Expressionsmuster zwischen Photonen und ¹²C- RT.

Die Quantifizierung der CD24⁺ - Expression ([Abb. 48](#)) ergab für unbehandelte HI-Tumore einen Anteil von ca. 10%. Nach Photonen- RT war die Anzahl CD24⁺ - Zellen zunächst stark reduziert (ca. 3% nach 8 h), 18 h nach Therapie konnte ein extremer Anstieg (ca. 25%) verzeichnet werden, der auch nach 72 h in einer vergleichbaren Größenordnung lag. Gleichzeitig nahm zu diesem Zeitpunkt die Intensität der Färbung etwas stärker zu. Parallel zu den deutlichen morphologischen Veränderungen im Tumor ab Tag 7, kam es auch zu einem stetigen Abfall der CD24- Expression. In den nekrotischen bzw. apoptotischen Arealen war CD24 nicht detektierbar ([Abb. 47](#)). Hingegen befand sich unter den überlebenden Restzellen ein hoher Anteil an CD24⁺ - Zellen. 28 d nach Bestrahlung war die CD24- Expression auf 10% abgesunken ([Abb. 48](#)).

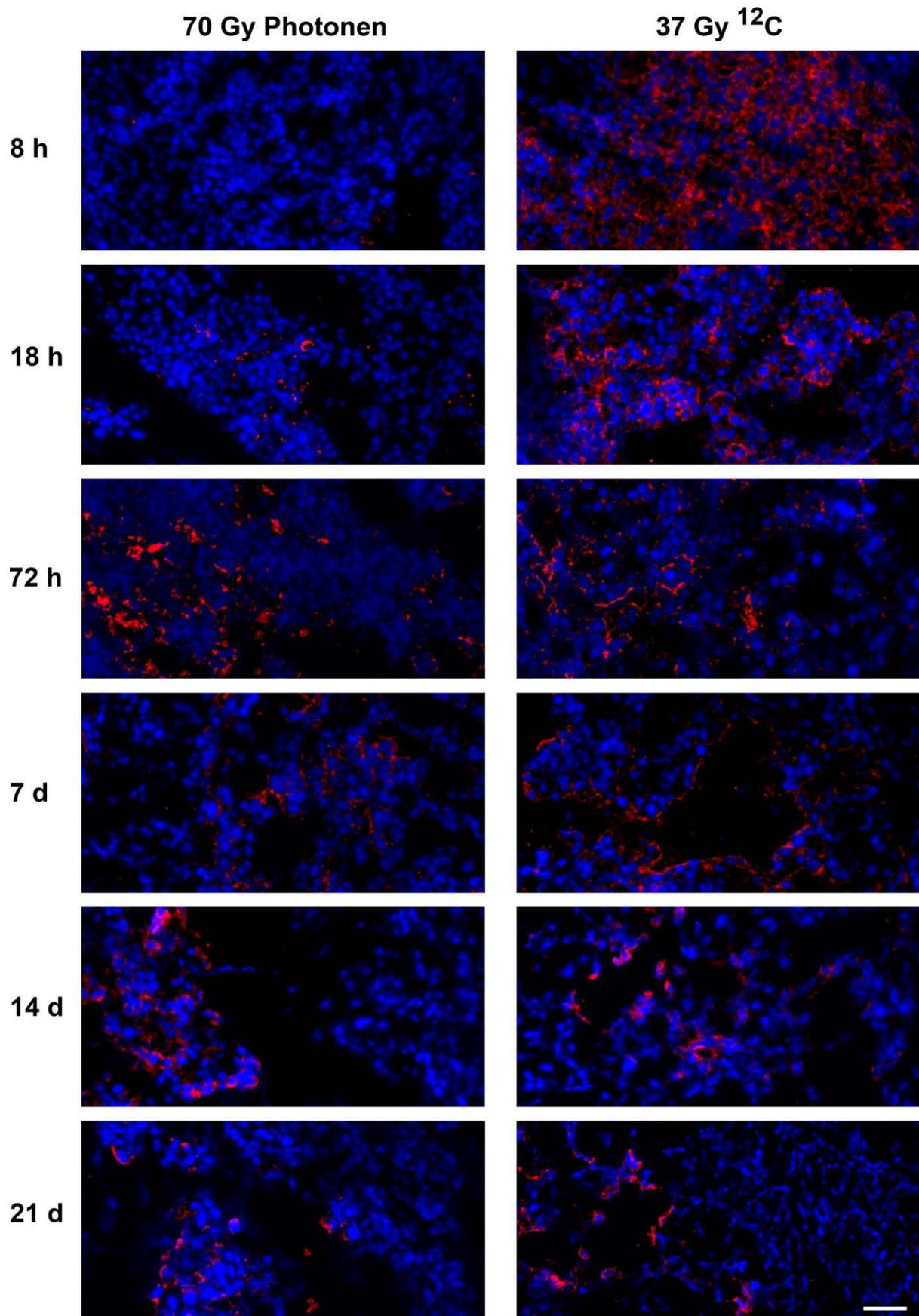


Abb. 47: Zeitliche Dynamik der CD24- Expression in HI-Tumoren nach 1 Fx Photonen oder ^{12}C . Nachweis des Oberflächenmarkers CD24 (rot) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Größenmaßstab: 50 μm . Vergrößerung: 200- fach.

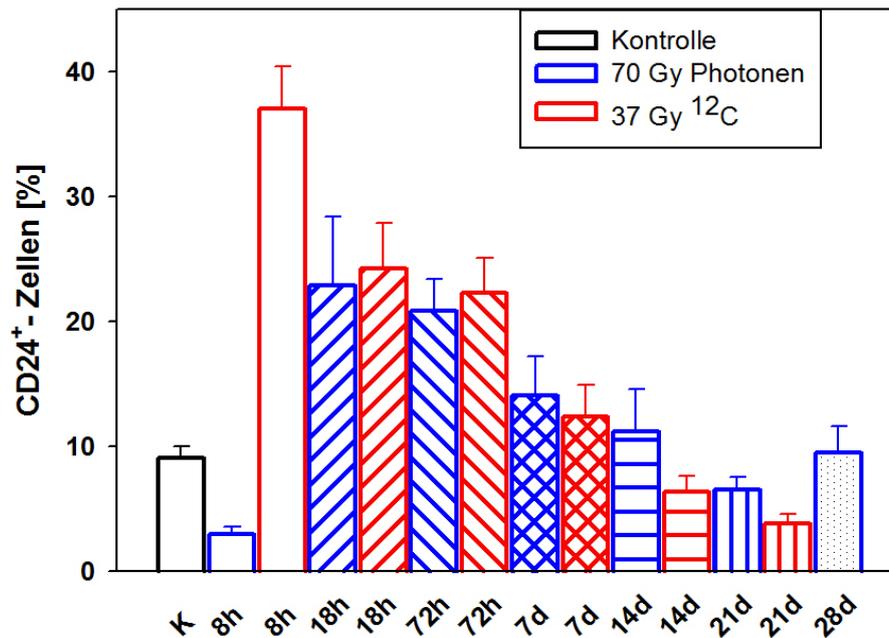


Abb. 48: Quantifizierung von CD24⁺ - Zellen des HI-Tumors nach 1 Fx Photonen oder ¹²C. Es wurden pro Zeitpunkt und Strahlqualität (Photonen: blau; ¹²C: rot) je 3 Tumore (6 Bilder / Tumor) ausgewertet (Mittelwert ± SEM). Dazu wurde die positive Fläche pro Gesamtbildfläche mit Hilfe der ImageJ-Software berechnet.

Auch ¹²C- bestrahlte Tumore zeigten eine erhöhte Menge (ca. 35%) an CD24⁺ - Zellen, die aber im Vergleich zu Photonen bereits 8 h nach Bestrahlung auftrat und bis 72 h konstant auf diesem hohen Niveau blieb. Anschließend konnte eine kontinuierliche Abnahme verzeichnet werden. Am Tag 21 nach ¹²C- RT ließen sich nur noch sehr wenige CD24⁺ - Zellen (ca. 3%) unter den intakten Zellen detektieren.

Auffallend war der äußerst starke Anstieg des Oberflächenmarkers CD24 8 h nach ¹²C- RT. Im Gegensatz dazu war nach Photonen- RT die Menge an CD24 zu diesem Zeitpunkt am geringsten. Insgesamt sank die Expression von CD24 nach ¹²C- RT wieder schneller ab, besonders ab Tag 14 nach RT war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Strahlmodalitäten festzustellen. Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass die Expression des putativen Stammzellmarkers CD24 in HI-Tumoren durch Bestrahlung reguliert wird.

4. Diskussion

Im Vergleich zu Photonenbestrahlungen hat Kohlenstoffionen- RT (^{12}C - RT) aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften und ihrer erhöhten relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) das Potenzial eine bessere Heilungsrate bei gleicher oder geringerer Normalgewebstoxizität zu erreichen [10,13]. In dieser Arbeit wurden präklinische Untersuchungen zur Wirkungsweise von Kohlenstoffionen in drei verschiedenen Sublinien des syngenem Prostatakarzinoms R3327 in der Ratte durchgeführt. Ziel war die Identifizierung von möglichen differenziellen Wirkmechanismen der ^{12}C - RT und Photonen- RT.

4.1 Dosis-Wirkung und RBW

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Durchführung von systematischen und quantitativen Untersuchungen der Reaktion von experimentellen Tumoren auf eine Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Im Mittelpunkt standen dabei Fragen zur RBW und zu möglichen zugrunde liegenden Mechanismen einer ^{12}C - RT im Vergleich zu einer Photonenbestrahlung. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden als Erweiterung früherer Studien [11,52] zunächst Dosis-Wirkungsexperimente an zwei experimentellen Tumorsublinien (R3327-H und -HI) durchgeführt, die sich im histologischen Differenzierungsgrad unterscheiden. Ziel war es, klinisch relevante Parameter, wie die RBW als Funktion der Dosis pro Fraktion für den Endpunkt der lokalen Kontrolle zu bestimmen. Aus zeitlichen und logistischen Gründen war eine Aufteilung der Bestrahlungen in mehrere Teilerperimente notwendig. Ein hieraus resultierender systematischer Fehler kann jedoch ausgeschlossen werden, da das Tumorsystem bereits seit Jahren in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt und ständig mittels sorgfältiger Qualitätskontrollen hinsichtlich seiner biologischen Stabilität überwacht wird.

Die Ergebnisse können mit früheren Untersuchungen [11,52] an der chronisch hypoxischen Sublinie R3327-AT1 des gleichen Tumormodells verglichen werden und bestätigen die Hypothese, nach der eine Abhängigkeit der TCD_{50} -Werte und der RBW-Werte von der Tumorsublinie erwartet wird. Darüber hinaus zeigen die Studien eine klare Korrelation zwischen Tumormorphologie und Strahlwirkung, wobei die RBW mit abnehmender Tumordifferenzierung zunimmt. Die Änderung der RBW resultiert dabei überwiegend aus einer Veränderung der Photonen-Toleranzdosen. So zeigte eine größer werdende Tumordifferenzierung nach Photonen- RT eine deutliche Erniedrigung der TCD_{50} - Werte, während die TCD_{50} - Werte nach ^{12}C - RT kaum sanken. Diese Resultate bestätigen frühere Experimente, in denen gezeigt werden konnte, dass hoch- LET Bestrahlung (z.B. mit ^{12}C) weniger abhängig von biologischen Faktoren ist als die Strahlenreaktion nach Photonen- RT [56,85-87].

So zeigten Takahashi *et al.* [85] mit Hilfe der Zelllinien NMT-1 (WT p53) und NMT-1R (mutiertes p53) *in vitro*, dass der p53-Status die Effektivität von Photon- RT beeinflusst. Mutationen in p53 führten zu höherer Radioresistenz gegenüber Photonen, während die ^{12}C -

Strahlenwirkung unabhängig vom p53 Status war. Dadurch ergibt sich für p53 mutierte Tumore eine höhere RBW. Shibata *et al.* [86] zeigten, dass die Art und Komplexität des DNA- Schadens den Reparaturweg und die Reparaturkinetik beeinflussen. Da ^{12}C - RT komplexere DNA- Schäden auslösen als Photonen [88,89] und der G2-Arrest nach ^{12}C - RT ebenfalls verlängert ist [90,91], werden die unterschiedlichen Reparaturmechanismen zwischen Photonen- und ^{12}C - RT als Hauptgrund für die differenziellen Strahlenantwort angenommen.

Neben diesen intrinsischen Resistenzfaktoren spielen auch epigenetische Aspekte eine wichtige Rolle. Der Sauerstoffgehalt eines Gewebes hat wesentlichen Einfluss auf die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber ionisierender Strahlung. Unter aeroben Bedingungen werden die durch Strahlung erzeugten Radikale oxidiert, wodurch der molekulare Schaden stabilisiert und die Reparatur erschwert werden kann. Diese Abhängigkeit spiegelt sich wider im sogenannten Sauerstoffverstärkungseffekt (*Oxygen Enhancement Ratio*, OER), einer Größe, die beschreibt, wie viel mehr Dosis sauerstoffarmen (hypoxischen) Zellen zugeführt werden muss, um die gleiche Strahlenreaktion, wie bei optimal mit Sauerstoff versorgten Zellen zu erzielen [92]. Experimentell wurde gezeigt, dass der OER einen Wert bis etwa drei annehmen kann. Untersuchungen an Zellkulturen deuten auf eine klare Abhängigkeit des OER vom LET hin, weshalb die Hoffnung besteht, mittels schwerer Ionen wie z.B. Kohlenstoff oder Sauerstoff, hypoxische Tumore mit größerer Wahrscheinlichkeit lokal kontrollieren zu können [56,87].

Diese Beispiele belegen, dass es Tumor- assoziierte Faktoren gibt, die wesentlich zur Radioresistenz gegenüber Photonen beitragen können und die möglicherweise bei Anwendung einer ^{12}C - RT einen geringeren Einfluss besitzen. Umgekehrt ergibt sich daraus, dass Tumore, die bereits nach Photonen- RT hohe Sensitivität aufweisen, aufgrund geringer RBW- Werte, nicht von einer ^{12}C - RT profitieren werden.

Auch die erhobenen RBW- Werte zwischen 1,6 und 2,1 (1 Fx) bzw. 1,9 und 2,1 (2 Fx) stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten [93-95]. So liegen RBW- Werte (Endpunkt: 10% klonogenes Überleben) für verschiedene Tumorzelllinien *in vitro* zwischen 2,0 und 3,0 (dose-averaged LET: 77 keV/ μm) [94]. Matsui *et al.* [93] fanden *in vitro* in Pankreas- karzinom- Zelllinien eine RBW zwischen 1,83 und 2,46 (Endpunkt: 10% klonogenes Überleben, dose-averaged LET: 80 keV/ μm).

Während bei AT1-Tumoren die maximale Latenzzeit bis zum Auftreten von Rezidiven unter 180 Tagen lag [52], entwickelten sich einige Rezidive der Sublinie HI bis kurz vor Ende der Nachbeobachtungszeit von 300 Tagen bzw. noch später (ein Rezidiv bei 305 bzw. zwei Rezidive bei 320 Tagen). Um die Robustheit der TCD₅₀-Werte des HI-Tumors zu bestätigen, wurde eine zweite Analyse für den Endpunkt „320 d“ durchgeführt. Allerdings führte dies nur zu einer geringfügigen Erhöhung des TCD₅₀-Wertes und daraus resultierend nur zu einer insignifikanten Veränderung der RBW. Daher können die RBW-Werte für den primären „300 d“ Endpunkt als verlässlich angesehen werden.

Im Gegensatz zu den lokal kontrollierten AT1- und HI-Tumoren, welche komplett resorbiert wurden, sind bei lokal kontrollierten H-Tumoren kleine Gewebereste zurückgeblieben. Durch das sehr langsame Wachstum dieses Tumors waren späte Rezidive schwierig zu detektieren. Insbesondere zeigte sich keine eindeutige Volumenzunahme innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Deshalb wurde ein sekundärer Endpunkt „histologische Tumorkontrolle“ eingeführt. Hieraus ergab sich zwar eine leichte Erhöhung der RBW, aber die Werte blieben weiterhin unterhalb derer des HI-Tumors. Auch diese Verschiebung resultierte aus einer stärkeren Erhöhung des TCD_{50} -Wertes für Photonen als für ^{12}C - Ionen. Grundsätzlich könnte dieses Phänomen durch eine kleine Subpopulation von Zellen erklärt werden, die resistent gegenüber Photonen-, nicht aber gegenüber ^{12}C - RT ist. Eine Bestätigung dieser Hypothese wäre ein weiteres Beispiel für die geringere Abhängigkeit der ^{12}C - RT von der Heterogenität des Tumors im Vergleich zur Photonenbestrahlung.

Da bereits bekannt ist, dass die Anzahl klonogener Stammzellen (CSC) vor Therapiebeginn ein Kriterium für die Ausbildung von Radioresistenz ist [96,97], könnte ein effektiveres Abtöten von CSCs durch ^{12}C - RT vermutet werden. Für Brustkrebs [98] und Glioblastome [71] konnte bereits gezeigt werden, dass die jeweiligen CSCs durch verstärkte Aktivierung von DNA- Reparaturmechanismen deutlich radioresistenter sind. Auch wurde bereits eine Studie von Cui *et al.* [99] veröffentlicht, die den Einfluss von ^{12}C - und Photonen- RT auf putative Kolonkrebstammzellen untersucht. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass Photonen- RT hauptsächlich nicht- stammzellähnliche Zellen abtötet, wohingegen ^{12}C - RT nicht- stammzellähnliche Zellen als auch CSCs in gleichem Maße zerstört. Diese geringere Radioresistenz von CSCs gegenüber ^{12}C - RT würde implizieren, dass ^{12}C - RT eine vielversprechende Möglichkeit ist, um die Radioresistenz von Stammzellen zu umgehen.

Es wurde eine Korrelation zwischen RBW und histologischer Differenzierung gefunden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das untersuchte Tumorsystem sich nicht nur im Differenzierungsstatus, sondern auch in funktionellen Parametern, wie der Wachstumsrate, Oxygenierung, Ploidiegrad und Metastasierungsneigung unterscheidet [100]. Diese sind jedoch nicht komplett unabhängige Faktoren, da sie an die Entwicklung von einem gut differenzierten zu einem undifferenzierten Tumor gekoppelt sind.

Zusammenfassend, konnte unabhängig von der bekannten LET- und Dosis- Abhängigkeit der RBW [48,50], gezeigt werden, dass die RBW zusätzlich von Tumor- spezifischen Faktoren, wie dem Differenzierungsstatus abhängt. In Bezug auf die klinische Situation impliziert dies einen Vorteil für die Bestrahlung mit ^{12}C - Ionen besonders für radioresistente Tumore, wie die anaplastische Sublinie AT1. Die drei untersuchten Sublinien dienen hierbei als Beispiel für die klinisch beobachtete Heterogenität von Prostatakarzinomen, die auch für ^{12}C - RT derzeit im Fokus steht [38,101], genauso wie als generelles System, um die Abhängigkeit der Tumorantwort von Tumor- spezifischen Faktoren zu untersuchen.

4.2 Wachstumsverhalten und Rezidivbildung

Das Wachstumsverhalten nach Einzeit- und Zweifachbestrahlungen war für alle Tumorsublinien vergleichbar. Weiterhin zeigte sich, dass die Latenzzeit bis zur Rezidivbildung in H-Tumoren für alle Strahlmodalitäten und Fraktionierungsschemata Dosis- abhängig war, d.h. je höher die Bestrahlungsdosis desto später trat die Rezidivbildung ein.

Für den HI-Tumor waren die Latenzzeiten des Rezidivs nach ^{12}C - RT deutlich länger als nach Photonen- RT. Insgesamt laufen die Volumenreaktionen des moderat differenzierten HI-Tumors deutlich schneller ab als bei dem hoch differenzierten H-Tumor. Für die bestrahlten HI-Tumore ergab sich eine klare Dosis- Abhängigkeit der Rezidivzeitpunkte für die ^{12}C - RT, aber nicht für Photonen- RT. Insgesamt entwickelte sich das Rezidiv nach Photonenbestrahlung immer zwischen 50 und 100 Tagen nach Therapie. Dies wurde sowohl bei 1 Fx als auch 2 Fx beobachtet. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wären Sublinien- spezifische Tumorsubpopulationen mit unterschiedlicher Strahlenresistenz [96]. Diese Subpopulationen im HI-Tumor könnten durch genetische oder epigenetische Faktoren höhere Dosen besser überleben, z.B. in hypoxischen Nischen, oder sie entwickeln zusätzliche Eigenschaften, die ihre Tumorinduktionsfähigkeit unabhängig von der überlebenden Zahl an CSCs macht. Um welche Eigenschaften es sich dabei handeln könnte, ist derzeit nicht bekannt. Die Beobachtung, dass ^{12}C - Ionen hinsichtlich der Latenzzeit bei Rezidiventstehung eine Dosis- Abhängigkeit zeigen, lässt auf eine geringere Strahlenempfindlichkeit gegenüber hoch- LET, oder aber auch auf eine Veränderung der intrinsischen protektiven Eigenschaften der Subpopulationen schließen. Diese Hypothesen sollten in zukünftigen Studien untersucht werden. Momentan gilt es als nicht bewiesen, dass stammzellähnliche Subpopulationen, die nach Bestrahlung oder Chemotherapie zu einer Rezidivbildung führen, identisch mit den Tumor- induzierenden Stammzellen sind, die zur Entstehung des Primärtumors geführt haben [96].

Außerdem wurde deutlich, dass in den meisten Fällen, aber v.a. für den HI-Tumor und den histologischen Endpunkt des H-Tumors eine flachere Photonen- DWK im Vergleich zu den ^{12}C - DWKs erreicht wurde. Dies spricht wiederum dafür, dass eine komplette Inaktivierung aller Tumorzellen mit Photonen schwieriger ist und für eine sichere lokale Kontrolle, deutlich höhere physikalische Strahlendosen erforderlich sind.

4.3 Fraktionierungsverhalten

Bei Zweifachbestrahlungen verschieben sich die TCD_{50} -Werte nach oben, aber insgesamt steigen hier die Toleranzdosen für Photonen- RT ebenfalls deutlich mehr an als für ^{12}C - RT, so dass sich für 2 Fx ein Anstieg der RBW gegenüber 1 Fx ergibt. Allerdings war der Anstieg der RBW von 1 zu 2 Fx nur beim AT1-Tumor stark ausgeprägt [11,52]. Dies zeigt, dass offensichtlich auch das Fraktionierungsverhalten vom Differenzierungsstatus des Tumors abhängig ist.

Das einzige präklinische Experiment zur Bestimmung von RBWs unter fraktionierter Bestrahlung wurde mit dem NFSa Fibrosarkommodell auf Mäusen durchgeführt [50]. Aus dieser Studie ergibt sich ein klarer Zusammenhang von RBW und LET. Für den untersuchten Tumor liegt dieser bei einem LET zwischen 14 und 20 keV/ μm bei 1,4 und ist unabhängig von der Anzahl der Fraktionen, während die RBW bei 44 und 74 keV/ μm von 1,8 auf 2,3 bzw. von 2,4 auf 3,0 ansteigt, wenn die Zahl der Fraktionen von 1 auf 4 erhöht wird. Interessanterweise bewirken höhere Fraktionierungen keinen weiteren Anstieg der RBW. Die RBW für Einzeldosen von 2,4 bei 74 keV/ μm steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, allerdings zeigen die Daten unter Zweifachbestrahlung einen deutlich kleineren Anstieg der RBW, was sich möglicherweise mit den unterschiedlichen Endpunkten der Studie erklären lässt. Während Koike *et al.* [50] Isoeffektivität und damit die RBW auf der Basis von Tumor-Wachstumsverzögerung nach subtherapeutischen Dosen definiert, basieren unsere Ergebnisse auf lokaler Tumorkontrolle (TCD_{50}) mit klinisch relevanten therapeutischen Dosen. Dies wirft die Frage auf, ob RBWs, gemessen auf der Grundlage niedriger Strahlendosen, vergleichbar sind mit den in der Regel deutlich höheren Strahlendosen für RBWs aus einem Tumorkontrollexperiment.

4.4 Mechanistische Untersuchungen zur Strahlenwirkung von Photonen- und ^{12}C - RT

Neben den Studien zur relativen biologischen Wirksamkeit von Kohlenstoffionen wurden auch zugrundeliegende Mechanismen genauer untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei die folgenden drei Themenbereiche: (a) funktionelle und strukturelle Veränderungen der Tumorgefäßversorgung nach Bestrahlung, (b) der zeitliche Verlauf der Inaktivierung von Tumorzellen und Normalgewebsanteilen in differenzierten Experimentaltumoren und (c) die Wirkeffekte von Photonen- und ^{12}C - RT auf individuelle Tumor-induzierende Subpopulationen.

4.4.1 Vaskuläre Effekte

Das vaskuläre Endothel ist vielfältig und multifunktional. Seine Rolle als selektive Permeabilitätsbarriere, die metabolischen Eigenschaften wie z.B. Regulation des Blutflusses, Regulation von Immunreaktionen und Entzündungsprozessen sowie Koagulation und Fibrinolyse sind von entscheidender Bedeutung [102]. Nach Bestrahlung sind histologische Veränderungen in der Gefäßstruktur und insbesondere in den Endothelzellen äußerst auffallend. Das Tumorgefäßsystem ist durch eine chaotische Gefäßarchitektur und einen erhöhten interstitiellen Druck gekennzeichnet. Dies wiederum führt zu einem Sauerstoffmangel und einer extrazellulären Azidose. Die Formierung von neuen Blutgefäßstrukturen ist

gekennzeichnet durch das Entstehen von neuen Kapillaren, verworrenen Gefäßverzweigungen und verdrehten Gefäßen [102]. Gleichzeitig treten kurzzeitig verschlossene Gefäße (shunts), verdickte undichte Basalmembranen, Einblutungen sowie fehlende Perizyten- Ummantelung auf. Lose verbundene Endothelzellen und Perizyten sowie ein Anstieg an vesikulären Organellen im Zytoplasma kennzeichnen diesen hyperpermeablen Phänotyp, so dass intravaskuläre Flüssigkeiten und Plasmaproteine austreten.

Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass die Gefäßversorgung von Tumoren die Strahlenantwort beeinflusst. Dabei inaktivieren ionisierende Strahlen nicht nur Tumorzellen, sondern besitzen auch antivaskuläre Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen bei Anwendung hoher Einzeldosen [64,65,103-105]. Außerdem spielen Gefäße bei der Reoxygenierung unter fraktionierter Bestrahlung und zur Überwindung von strahleninduzierter Hypoxie eine wichtige Rolle [83]. Die Gefäßstruktur ist auch bei der Bildung neuer Tumorrezidive nach abgeschlossener Bestrahlung sowie für metastatische Prozesse wichtig. Letztendlich ist im Falle einer Kombinationstherapie die Gefäßreaktion bedeutsam für die Applikation von Medikamenten. Aus diesen Gründen wurden die vaskulären Effekte nach Photonen- und ^{12}C - RT sowohl funktionell mittels Ultraschall und Magnetresonanztomographie (MRT), als auch histologisch im Zeitverlauf untersucht.

4.4.2 Funktionelle Untersuchungen

Der nicht- invasive Power- Doppler Ultraschall war für die Darstellung des Volumens im zeitlichen Verlauf geeignet. Allerdings konnte eine Korrelation des Blutflusses nach Bestrahlung mit einer Dosis- Abhängigkeit nicht gezeigt werden, da Mikrogefäße mit einem Durchmesser von weniger als 40 μm mit dieser Methode nicht detektiert werden können [106]. Dagegen war im Falle von lokal kontrollierten ^{12}C - bestrahlten Tumoren ein Anstieg des Blutflussvolumens im Tumorrestvolumen zu beobachten, was als ein beginnender Prozess einer erneuten Vaskularisierung ab dem Tag 150 nach RT gedeutet werden kann [105]. Diese Neoangiogenese trägt aber nicht zur Rezidivbildung bei, sondern wie später histologisch gezeigt werden konnte, handelt es sich hierbei um eine Gefäßneubildung innerhalb der Normalgewebsstrukturen des zurückbleibenden Fibroms nach Bestrahlung von hochdifferenzierten Tumoren. Im Vergleich hierzu war bei den moderat differenzierten HI-Tumoren später als 100 Tage nach RT kein Blutfluss und anschließend auch kein Tumorrestvolumen mehr detektierbar.

Bis 30 Tage nach Bestrahlung konnte ein differenzieller Unterschied zwischen ^{12}C - und Photonen- RT erfasst werden, der sich aber zu späteren Zeitpunkten verliert. Grundsätzlich waren Blutflussveränderungen im zeitlichen Verlauf nach ^{12}C - Bestrahlung früher messbar, weshalb auf unterschiedliche Mechanismen der Gefäßinaktivierung nach ^{12}C - und Photonen-

RT geschlossen werden kann. Bewertend lässt sich sagen, dass der Doppler-Ultraschall in diesen Tumorsystemen zwar einen einfachen und schnellen Überblick von Blutflussveränderungen nach Therapie ermöglicht, aber nicht in der Lage ist, die Gesamtheit der vaskulären Effekte zu erfassen.

Zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen wurde unter Einbeziehung weiterer funktioneller Parameter eine MRT- Studie durchgeführt.

Hiermit konnte in T1- und T2- gewichteten Bildern sowohl die Ödemisierung als auch die Entstehung nekrotischer Bereiche nach Bestrahlung sowie die Wachstumsnekrosen in großen unbehandelten AT1-Tumoren nachgewiesen werden. Diese Ödemisierung führt zu einer weiteren Erhöhung des interstitiellen Drucks resultierend aus hyperpermeablen Blutgefäßen und schlechtem Lymphabfluss [107]. Für die isoeffektiven Dosen 85 Gy Photonen und 37 Gy ^{12}C (lokale Kontrolle) war die Ödemisierung und die Nekrosen schneller detektierbar und nach 21 Tagen stärker vorhanden, als in den isoeffektiven Dosen ohne lokale Kontrolle. Daraus lässt sich auf eine Dosis- Abhängigkeit der Effekte schließen.

Für eine präzisere Untersuchung der Gefäßfunktion wurde eine dynamische Kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) mit dem Kontrastmittel (KM) Magnevist[®] durchgeführt. Da Magnevist[®] ein kleines Molekül (ca. 500 Dalton) ist, können selbst kleine Permeabilitätsänderungen sichtbar gemacht werden. In allen Bestrahlungsgruppen reicherte sich das KM deutlich stärker als in den unbehandelten Tumoren an. Bei einem Vergleich der Grauwerte zeigte sich eine Äquivalenz der 16 Gy ^{12}C - und der 85 Gy Photonen- RT. Weiterhin war die Intensität der Grauwerte, d.h. der KM- Anreicherung, bei 37 Gy ^{12}C nochmals erhöht. Diese Beobachtungen zeigen eine eindeutige Dosis- Abhängigkeit und zusätzlich stützen sie die Hypothese einer höheren Effektivität der Kohlenstoffionen die Gefäße zu permeabilisieren.

Um genauere Hinweise auf einen differenziellen Wirkmechanismus zwischen Photonen und ^{12}C - RT zu erhalten, reicht diese rein deskriptive Beschreibung der MRT-Bilder nicht aus. Darum wurde der pharmakokinetische Parameter A, der äquivalent zum Blutvolumen ist, nach dem Brix- Modell [81] analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass A in allen bestrahlten Tumoren gegenüber unbestrahlten Kontrollen leicht anstieg. Allerdings war dieser Anstieg nicht signifikant und Dosis- unabhängig. Da dies nicht die deskriptive Beschreibung der DCE-MRT Bilder mit klarem Dosis- abhängigen KM- Anstieg nach RT [106,108], insbesondere nach ^{12}C - RT, widerspiegelt, wird derzeit an einer Möglichkeit der quantitativen Analyse mit dem neueren pharmakokinetischen Zwei- Kompartimenten- Modell nach Brix [109,110] gearbeitet.

Einer der Hauptunterschiede zwischen beiden Modellen ist, dass die arterielle Inputfunktion im Brix- Modell von 2004 dazu genutzt wird, einen Fit an den tatsächlich in der Arterie gemessenen KM- Kinetik durchzuführen, wohingegen im Brix- Modell von 1991 [81] feste Fit- Parameter vorgegeben sind. Zusätzlich wird im ersten Brix- Modell [81] lediglich der KM-

Austausch zwischen den Kompartimenten Blutplasma und peripheres Gewebe berücksichtigt. Im erweiterten Brix- Modell [109] wird die KM- Konzentration eines jeden Kompartiments mit seinem Volumen multipliziert. Dadurch ist es möglich Volumen-änderungen innerhalb der Kompartimente stärker zu berücksichtigen. Zwick *et al.* konnten bereits zeigen, dass das erweiterte Brix- Modell mit arterieller Inputfunktion älteren Modellen vorzuziehen ist [111,112].

Außerdem können mit dem Modell weitere wichtige Parameter, wie das relative Blutflussvolumen, das relative Blutvolumen und das interstitielle Volumen berechnen werden. Da die Ödemisierung nach Bestrahlung zu einer Volumenänderung der Kompartimente führt, erhoffen wir uns hiermit eine genauere und zuverlässigere Auswertung, auch um eventuelle Dosis- Abhängigkeiten aufzuzeigen.

In diesem Zusammenhang beobachteten Lin *et al.* [113] in TRAMP-C1 PCa-Tumoren sowohl einen starken KM- Anstieg als auch eine Erhöhung des Permeabilitätsparameters K^{trans} nach 15 Gy 1 Fx RT. Dies korreliert mit unseren Beobachtungen.

4.4.3 Histologische Untersuchungen

Die beiden Tumorsublinien R3327-H und -HI unterscheiden sich auf struktureller Ebene im Wesentlichen durch unterschiedlich große Anteile von normalen Gewebestrukturen und durch den Reifezustand ihrer vaskulären Elemente. Unbehandelte HI-Tumore besitzen etwa doppelt so viele Gefäße wie H-Tumore, allerdings sind in den meisten dieser Gefäße keine Perizyten (SMA) nachweisbar, d.h. der HI-Tumor ist, die vaskuläre Versorgung betreffend, deutlich weniger differenziert als der H-Tumor [67,114]. Im H-Tumor war dagegen die Hälfte aller Gefäße $CD31^+$ / SMA^+ .

Einer der ersten Strahlenreaktionen ist die Induktion des γ H2AX- Kernproteins, das als Kennzeichen einer ablaufenden DNA- Doppelstrangbruchreparatur herangezogen wird. In beiden Tumoren war nach 8 h das Maximum an DNA-DSBs erreicht und die Signale waren bis 72 h mit abnehmender Anzahl verfolgbar. Dabei zeigten nach ^{12}C - Bestrahlung nicht nur mehr Zellen γ H2AX⁺ - Foci, sie waren auch länger detektierbar.

Jakob *et al.* [54] konnten bereits zeigen, dass Schwerionen (in diesem Fall Bismut Ionen) mehr residuelle γ H2AX- Foci in humanen Fibroblasten induzieren als Photonen. Außerdem sind die durch hoch- LET entstehenden DNA- Schäden geclustert und damit wesentlich komplexer und schwerer zu reparieren. Die Reparaturkinetik von DNA- Doppelstrangbrüchen in HSF-1 Zellen *in vitro* nach ^{12}C - RT ist verlangsamt gegenüber Photonen- RT [86].

Die eingesetzten hohen Strahlendosen führten unabhängig von der Strahlqualität zu einer deutlichen Inaktivierung von proliferierenden Tumorzellen unmittelbar nach RT (8 h). Zurückbleibende proliferierende Zellen waren vorwiegend Endothelzellen und Fibroblasten. Der Rückgang der Proliferation war in H-Tumoren wesentlich stärker ausgeprägt als in HI-

Tumoren, einerseits weil der H-Tumor selbst schon einen geringen Anteil teilungsaktiver Zellen aufweist und andererseits, weil ein deutlich höherer Anteil an proliferierenden Restzellen insbesondere nach Photonen (> 14 Tage) vorhanden war. Die Hauptursache hierfür ist wohl der höhere stromale Anteil des H- gegenüber des HI-Tumors.

Zusätzlich zur Tumorzellinaktivierung war eine starke Auftreibung der gefäßständigen Basalmembranen auffallend, die zu einer Reduzierung der Gefäßdurchmesser in allen Bestrahlungsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte. Diese Veränderungen wurden begleitet von partiellen bis hin zu kompletten Disruptionen vaskulärer Elemente. Auch hier ergab sich ein auffallender zeitlicher Unterschied zwischen Photonen und ¹²C-Ionen bei Anwendung von isoeffektiven Dosen. Bereits 18 h nach ¹²C-RT wiesen die überwiegende Mehrheit der Gefäße Schädigungen auf, unabhängig vom Reifezustand der vaskulären Elemente. Vergleichbare Gefäßveränderungen waren nach Photonenbestrahlung frühestens 7 bis 14 Tagen sichtbar. Als histologisches Korrelat stützen diese Ergebnisse die erhobenen Befunde der Ultraschall- und MRT-Untersuchungen.

Die histologischen Untersuchungen zeigen, dass Bestrahlung vorwiegend unreife Gefäße schädigt. Vaskuläre Elemente mit perizytärer Ausstattung sind deutlich radioresistenter und reagieren aufgrund ihres geringen Anteils an teilungsaktiven Endothelzellen, zumindest nach Photonen-RT mit entsprechender zeitlicher Verzögerung. Außerdem sind kleinere Strahldosen in der Lage, sowohl protektive als auch angiogene Prozesse zu induzieren [115]. Für hohe Einzeldosen wurde dies bisher nicht gezeigt [107].

Für die Neovaskularisierung und die damit verbundene Zunahme der Blutgefäßdichte ist die Proliferation der Endothelzellen essentiell [108,113,116]. Der histologische Befund, dass zu späten Zeitpunkten nach RT sowohl Endothelzellproliferation als auch Gefäßneubildung zu beobachten war, bestätigt frühere Studien, die solche Effekte ebenfalls nach Anwendung von hohen Photonendosen nachgewiesen haben [117].

Bereits 14 Tage nach ¹²C-RT bzw. 28 Tage nach Photonen-RT wurden kleinvolumige Anteile aus zellarmen Bindegewebsstrukturen mit langgezogenen Fibroblasten aber ohne sichtbare Tumorstrukturen vorgefunden, die als klassisches Fibrom bezeichnet werden können. Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte gleichzeitig eine Neubildung von versorgenden Gefäßstrukturen mit SMA⁺ umgebenden perizytären Zellstrukturen beobachtet werden [105,107]. Weiteres Kennzeichen dieser Neovaskularisierung ist eine erneute Zunahme teilungsaktiver Zellen zu diesen späten Zeitpunkten. Im weniger gut differenzierten HI-Tumor ist diese Fibromausbildung nicht vorhanden, da das komplette abgestorbene Tumormaterial innerhalb von 30 Tagen resorbiert wurde. Der stromale Anteil ist im HI-Tumor deutlich schwächer, jedoch der muzinöse Anteil wesentlich stärker ausgeprägt als im H-Tumor. Dies begünstigt wahrscheinlich die schnelle Resorption.

Interessanterweise konnte in den Fibroblasten des H-Tumors bereits 18 h nach RT eine Aufquellung, nach 72 h eine weitere starke Vergrößerung und ab Tag 14 nach Photonen

bzw. 7 Tage nach ^{12}C -RT eine deutliche Verlängerung der Zellstruktur beobachtet werden. Auffallend sind diese Veränderungen nur in den Stromalen Anteilen des H-Tumors, im HI-Tumor waren sie teilweise auch abgeschwächt vorhanden. Allerdings konnte nur ein sehr geringer zeitlicher Unterschied zwischen ^{12}C - und Photonen-RT detektiert werden. Daraus ergibt sich ein geringer Einfluss der Strahlmodalität auf die Stromale Antwort, aber ein wesentlicher Unterschied zwischen Tumoren mit verschiedenen Differenzierungsgraden. Diese Beobachtungen sind mit den beobachteten vaskulären Effekten konsistent.

Aus den histologischen Untersuchungen lässt sich zusammenfassend sagen, dass beide Strahlqualitäten unter Isoeffektbedingungen in teilungsaktiven Tumorzellen und in vaskulären Elementen zwar vergleichbare strukturelle und funktionelle Veränderungen verursachen, die zeitliche Abfolge aber nach ^{12}C -RT beschleunigt ist. Dieser differenzielle zeitliche Strahleneffekt beruht in erster Linie auf unterschiedlichen Wirkmechanismen von Photonen und ^{12}C -Ionen auf ruhende, teilungsinaktive Zellen.

4.4.4 Genexpressionsanalysen

In der Genexpressionsanalyse ergaben sich bereits zwischen den beiden unbehandelten Tumorsublinien H und HI stark unterschiedlich regulierte Gene. Im HI-Tumor waren v.a. Gene mit folgender Funktion überexprimiert: Zellwachstum, Syntheseprozesse, Zelladhäsion, Migration und erhöhte Tumorzellmotilität über Aktin Reorganisation. Besonders auffallend ist auch die deutlich stärkere Expression des IGF-1 Rezeptors im HI-Tumor. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit den bereits bekannten Eigenschaften der beiden Sublinien [67,118,119]. Aufgrund seiner Androgen- Unabängigkeit laufen im HI-Tumor regulative Signalkaskaden über IGF1-R ab, welches zusätzlich eine große Rolle in der HIF-1 α regulierten Hypoxie spielt [120]. Die höhere Wachstumsrate des HI-Tumors bedingt eine stärkere Expression von Genen der Syntheseprozesse und des Zellwachstums [67,114].

Im H-Tumor sind v.a. Gene überexprimiert, welche die metabolischen Aktivitäten beeinflussen sowie die Zelladhäsion verstärken. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in der PCa- Progression E-Cadherin und Vimentin vermindert vorkommen [121,122]. Zusätzlich sind auch einige Immunsystemkomponenten im H- gegenüber dem HI-Tumor hochreguliert. Rubenstein *et al.* [123] untersuchten bereits die Unterschiede *in vivo* in T- Zellkomponenten der verschiedenen R3327- Sublinien und fanden eine Veränderung der Quotienten von T-Helferzellen zu T-Suppressorzellen in Abhängigkeit von der Tumorstadiumsgeschwindigkeit.

Da die Fragestellung der differenziellen Genexpression nach Photonen- und ^{12}C -RT im Vordergrund stand und die beiden Bestrahlungsmodalitäten unterschiedliche Kinetiken aufweisen, wurden Analysen an jeweils vier Zeitpunkten nach HI- Tumorbestrahlung durchgeführt.

Im Allgemeinen fand sich nach Bestrahlung, unabhängig von der Strahlmodalität, eine Hochregulierung von Genen des DNA-Reparatursystems, der Zellzyklussteuerung, von bestimmten Komponenten des Immunsystems (z.B. Zytokine), des Zellabbaus (z.B. Caspasen), der Ionenkanäle sowie die Erhöhung von Migrationsmolekülen (z.B. durch Aktinfilament-Reorganisation, ICAM). Im Gegensatz dazu wurden v.a. Gene, die in der Zellzyklusprogression, im aeroben Stoffwechsel sowie Angiogenese und Zelladhäsion involviert sind oder bestimmte Komponenten des Immunsystems (z.B. Mastzellproteasen), herunterreguliert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den in der Histologie gesehenen Befunden der DNA-Reparatur und der Reduktion der proliferativ aktiven Zellen sowie der Auflösung / Reorganisation der Zellstruktur.

Die Dynamik der strahleninduzierten Genregulierung über die Zeit erwies sich als äußerst komplex. Für die beiden Strahlqualitäten wurden nicht nur verschiedene Expressionsmuster sondern auch Intensitätsveränderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten festgestellt. Charakteristisch für Photonen- und ^{12}C -RT war eine Herunterregulierung von Genen des Immunsystems kurz nach Bestrahlung, die erst nach 14 Tagen das Kontrollniveau wieder erreichten oder übertrafen. Zahlreiche Zellzyklus- und Metabolismus-regulierende Gene wurden ebenfalls kurz nach RT herunterreguliert, hatten jedoch 72 h nach RT wieder Kontrollniveau. Die kurzfristige Herunterregulation steht vermutlich im Zusammenhang mit der Induktion von DNA-Schäden und dem ersten Zellsterben sowie dem Eintreten des Zellzyklusarrests [62]. Die anschließende Reaktion lässt auf die Induktion einer Stressantwort schließen.

DNA-Reparatur induzierende Gene waren zu frühen Zeitpunkten nach Photonen und ^{12}C -RT (8 h und 18 h) stark hochreguliert. Gleichzeitig waren die DNA-Reparatur reprimierenden Gene zu diesen Zeitpunkten stark herunterreguliert. Bereits nach 72 h befanden sich alle Reparatur assoziierten Gene wieder auf dem normalen Expressionsniveau der Kontrollen.

8 h nach RT war unabhängig von der Strahlqualität eine stärkere Expression von Stressantwort-Genen und ATPasen sowie Natrium-Kalium-Pumpen beobachtbar. Diese Hochregulation war nach Photonen-RT prägnanter als nach ^{12}C -RT. Die Regulation von Natrium-Kalium-Pumpen könnte v.a. durch die Ödemisierung induziert sein [107].

Es wurden einige Gene gefunden, die vorwiegend nach ^{12}C -RT, aber nicht durch Photonen-RT, aktiviert werden. Die Funktionen dieser Gene sind: Immunregulation [124,125], Lymphozytenaktivierung [126], T-Zellaktivierung, NF κ B-Ausschüttung [127,128], Zelladhäsion [129] und Apoptoseinduktion [130]. Für die drei Gene *Atp1a2*, *Alas 2* und *Hbb* zeigte sich 8 h nach ^{12}C -RT eine deutliche Erhöhung der Expression und ab 18 h bis einschließlich 14 Tage nach RT eine starke Herabregulierung. *Hbb* kodiert für die Hämoglobin β - Untereinheit [131] und *Alas 2* ist an der Hämbiosynthese beteiligt [132], so dass sie essentiell für die O_2 -Versorgung sind. Dagegen kodiert *Atp1a2* für eine Natrium-Kalium-Pumpe [133].

Außerdem gab es Gene, die ausschließlich nach Photonen-RT reguliert waren. Dazu gehören ein Proteaseinhibitor, der das Tumorwachstum stimuliert [134] sowie die Prostaglandinsynthese, die in der PCa- Proliferation involviert ist [135]. Das Gleiche trifft auch auf Zytokeratin 20, MMP 11 und Aminopeptidase A zu. Alle drei Proteine sind essentiell für Angiogenese, Metastasierung, Invasion und PCa- Progression [135-137]. Die Menge an zirkulierendem Prostaglandin E korreliert zusätzlich noch mit der zunehmenden Aggressivität der Tumorsublinien im R3327-Model [123].

Der Rezeptor für Wnt- Signalproteine (*Fzd 9*) und die MAP-Kinase waren 18 h nach Photonen- RT deutlich höher exprimiert als nach ¹²C- RT, wo eine gleichbleibend niedrige Expression detektierbar war. Der Wnt-Signalweg kontrolliert v.a. die Proliferation und Erhaltung von epithelialen Progenitorzellen in der Prostata [138]. Zusätzlich erhöht der Wnt / β -Catenin Signalweg auch die Radioprotektion von Normalgeweben (z.B. Mucosa) und Tumorzellen [139]. Die MAP-Kinase steuert über VEGF- Expression eine Angiogenese-induktion [140].

Die starke Hochregulierung von Caspase 3 bereits 8 h nach Photonen, aber erst 18 h nach ¹²C- RT, impliziert einen unterschiedlichen Zeitverlauf der Apoptosereaktion zwischen beiden Strahlmodalitäten [141]. Mukherjee *et al.* [142] zeigten, dass γ H2AX auch während der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen von der DNA-PK (Proteinkinase) phosphoryliert wird, so dass γ H2AX in bestimmten Fällen auch als „Apoptosemarker“ eingesetzt werden kann. Auffallend war in den γ H2AX- Färbungen nach Bestrahlung von HI-Tumoren ein deutlich höherer Anteil an γ H2AX- Foci 18 h nach ¹²C- RT verglichen zu Photonen- RT sowie eine bis 7 Tage nach RT andauernde γ H2AX- Expression in ¹²C- bestrahlten H-Tumoren, die nach Photonen-RT zu diesen späten Zeitpunkten nicht mehr detektierbar war. Man könnte vermuten, dass dieser besonders hohe Anteil an γ H2AX- Foci 18 h nach ¹²C- RT ebenfalls ein Hinweis auf verstärkte Apoptose zu diesem Zeitpunkt sein kann. Photonen- RT würde im Vergleich zu ¹²C- RT zu frühen Zeitpunkten zu weniger Apoptose führen und in ¹²C- RT würde die Apoptoseinduktion länger anhalten. Diese Interpretation der histologischen γ H2AX- Färbung wurde mit dem Expressionsmuster der Caspase 3 übereinstimmen.

Eine Reihe von Genen war 8 h nach Photonen- RT hochreguliert, aber bereits 18 h danach nicht mehr. Auch ¹²C- RT regulierte diese Gene früh hoch, allerdings blieb ihre Expression über einen längeren Zeitraum erhalten bis bei späten Zeitpunkten keine Unterschiede mehr detektierbar waren. Diese Gene sind involviert in: der Reduktion von metabolischem Stress durch vermehrte Phospholipidbiosynthese [143], EMT- Aktivierung [144,145], Inhibierung des TGF- β Signalweges [146], p53- abhängige Apoptose [147,148], p53- unabhängige Apoptoseaktivierung [149], Aktivierung von DNA- DSB- Reparatur [150], Zelladhäsion [151], Chemoresistenz über Aktivierung der Cholesterol-Biosynthese [152], Erhöhung der PCa-

Invasion und Metastasierung [153], Verstärkung der Epithelzell- Lymphozyten- Adhäsion [154], Aktivierung von VEGF und HIF1 α in PCa über GDF-15 [155].

Besonders die in unserer Analyse ausgeprägte starke Herunterregulierung von Signalwegen nach ¹²C- RT, welche z.B. mit PI3K / Akt assoziiert sind, wurden auch schon *in vitro* in A549 Zellen nachgewiesen [156].

ICAM-1 wurde 8 und 18 h nach RT hochreguliert und bei Photonen ab 72 h wieder herunterreguliert auf das Level der Kontrollen. Nach ¹²C- RT blieb es auch nach 72 h auf einem leicht erhöhten Niveau. ICAM-1 ist bekannt als positiver Regulator für RT- induzierte Invasion und Migration in Gliomen [157].

Kamlah *et al.* [158] fanden *in vitro* einen Anstieg der „Stem cell factor“ - Expression (Kitl) nach Photonen- RT aber nicht nach ¹²C. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch einen leichten Anstieg 8 bis 18 h sowohl nach Photonen- als auch nach ¹²C- RT im Vergleich zu den Kontrollen.

Außer dem direkten Abtöten von Tumorzellen durch DNA- Schäden, scheint zusätzlich die Schädigung der Tumorumgebung und insbesondere der Endothelzellen essentiell nach RT zu sein [62,103,105]. Die Endothelzellen synthetisieren 20-mal mehr Sphingomyelinase als andere Zellen und schützen dadurch Tumorzellen vor Apoptose. Dies ist bisher nur bei niedrigen Strahlendosen beobachtet worden, sollte aber auch für höhere Dosen, bei denen die Endothelzellen intakt bleiben, relevant sein [103].

Maalouf *et al.* [159] untersuchten zwei p53-mutierte HNSCC- Linien (radiosensitive SCC61 und radioresistente SQ20B) *in vitro* nach Bestrahlung mit ¹²C und Photonen. SCC61- Zellen reagierten mit einer p53-unabhängigen Apoptoseinduktion nach RT. Hingegen zeigten SQ20B- Zellen einen verlängerten G₂/M- Arrest und Anzeichen eines Absterbens nach der Induktion einer mitotischen Katastrophe nach ¹²C- RT. Ausschließlich bei SQ20B- Zellen gab es eine Subpopulation, die auch 10 Tage nach Hochdosisbestrahlung unabhängig von der Strahlart proliferierte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass neben der Strahlmodalität v.a. die individuelle genetische Ausstattung und damit die intrinsische Radioresistenz die Tumorreaktionen nach RT bestimmen.

Unsere Ergebnisse bestätigen teilweise frühere *in vitro* Studien, welche die Genregulation nach Photonen- und ¹²C- RT untersucht haben [63,160,161]. Sowohl die NF κ B- Aktivierung, als auch die p53- Inhibierung und der länger anhaltende Zellzyklusarrest nach ¹²C- RT wurde *in vitro* nachgewiesen [63,160]. Allerdings war zu frühen Zeitpunkten nach Photonen- und ¹²C- RT (Isoeffektvergleich) im HI-Tumor eine Herunterregulierung des Apoptoseinhibitors Survivin (*Birc5*) mit anschließender verstärkter Expression vorzufinden. *In vitro* Untersuchungen von Gong *et al.* [161] beschreiben jedoch eine deutlich stärkere Expression von Survivin nach ¹²C- RT, nutzen hierbei aber einen Isodosenvergleich.

Yashiro *et al.* [162] untersuchten *in vivo* die Regulation von DNA- Reparaturgenen nach Photonen- und ¹²C- RT. Besonders einige Spindelapparatkomponenten sowie DNA-

Checkpoint Proteine waren nach Photonen- RT deutlich schwächer exprimiert als nach ^{12}C -RT. Dies stimmt vollkommen mit unseren Beobachtungen in bestrahlten HI-Tumoren überein. Zusätzlich zeigten Yasiro *et al.* [162] eine signifikant höhere Expression von PCNA nach Photonen- RT, eine Beobachtung, die sich im HI-Tumor nicht bestätigen ließ.

Der von Imadome *et al.* [61] *in vivo* nach ^{12}C - RT gezeigte verstärkte Zellzyklusarrest, die erhöhte ICAM1- Expression sowie die p21- Regulation, ebenso wie die induzierte Stressantwort entsprechen der Genregulation im dem hier untersuchten Prostatatumor der Sublinie HI. Zusätzlich haben Imadome *et al.* [61] noch weitere differenziell regulierte Gene gefunden, die aber ebenfalls den Funktionen Metabolismus, Zellkommunikation und Zellzyklus zugeordnet werden können.

Leider ist in diesen publizierten *in vivo* Studien keine Information zur eingesetzten Strahlendosis zu finden. Zu vermuten ist, dass die gewählten Dosen isoeffektiven Bedingungen entsprechen, wobei der dazu gehörende biologische Endpunkt nicht definiert wurde. Deshalb ist ein genauer Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich.

4.5 Charakterisierung von Tumor- induzierenden Zellen

Da lokale Rezidive und Metastasenbildung vor allem auf dem Überleben einzelner Tumorzellen mit der Eigenschaft einen neuen Tumor zu induzieren [6,96,163], den sogenannten TICs (Tumor- induzierende Zellen), beruhen, sollte auch der Einfluss der Bestrahlung auf diese TICs untersucht werden.

In Prostatakarzinomen sind derzeit mehrere verschiedene Subpopulationen mit möglichen Tumor- induzierenden Eigenschaften beschrieben. Dabei erfolgte die Isolation dieser TICs über FACS- Sortierung von Oberflächenmarkern in den vorhandenen schnell wachsenden und aus Metastasen etablierten Prostatakrebszelllinien DU145 [164], LNCaP [165] und PC3 [166]. Da die Relevanz dieser Ergebnisse aufgrund der Limitation der drei Systeme fragwürdig ist, spielen andere Systeme, wie z.B. die murinen transgenen Modelle TRAMP und Pten, eine bedeutende Rolle in der Prostata- Stammzellforschung. Durch die genetischen Veränderungen durchlaufen die Mäuse die komplette Tumorprogression von einer prostatic intraepithelialen Neoplasie (PIN) bis hin zu einem metastasierenden invasiven Adenokarzinom [167]. Die drei Zelllinien DU145, LNCaP und PC3 wurden nicht aus primären Prostatakarzinomen, sondern aus Metastasen mit niedrigem Differenzierungsgrad, isoliert [168]. Bisher sind keine Oberflächenmarker bekannt, die in mehreren PCa- Modellen zuverlässig TICs sortieren können [167,169]. Momentan gibt es eine anhaltende Diskussion darüber, ob es in der normalen Prostata eine distinkte Stammzellpopulation gibt, oder ob sowohl lumbale als auch basale Stammzellen existieren [5,6]. Daraus würde sich wiederum ableiten, dass auch Prostatakrebs mehrere verschiedene Stammzellpopulation hätte.

4.5.1 Tumorsubpopulationen

Für das R3327- Tumormodell wurden bisher keine Untersuchungen zu TICs durchgeführt. Deshalb wurde zunächst versucht individuelle Tumorsubpopulationen in den Sublinien AT1, H und HI durch etablierte Oberflächenmarker zu charakterisieren.

Eine Machbarkeitsstudie sollte zeigen, dass die verwendeten kreuzreaktiven humanen Antikörper jeweils distinkte Tumorsubpopulationen in unserem syngenem Rattenprostatakarzinom markieren und wie diese mit dem Zellzyklus korrelieren.

Die durchflusszytometrische Analyse des DNA- Index und der Zellzyklusverteilung ergaben Ploidie- Eigenschaften, die für jede Sublinie charakteristisch ist. Die zwei besser differenzierten Sublinien H und HI beinhalten eine peridiploide Population mit einem DNA- Index von 1,07 und eine höher aneuploide Fraktion mit einem übereinstimmenden DNA- Index von 1,8. Zumindest für den H-Tumor wurden bereits ähnliche Eigenschaften publiziert [170]. Der anaplastische AT1-Tumor besitzt eine vergleichbare nahezu tetraploide Subpopulation mit einem DNA- Index von 1,8, allerdings fehlen weitere aneuploide Populationen. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien [171] und sind außerdem in Einklang mit chromosomalen Analysen des AT1, in denen eine durchschnittliche Chromosomenanzahl von 84 (variiert von 77-85) gefunden wurde [172]. Zusätzlich bleibt zu beachten, dass von den drei untersuchten Sublinien nur der AT1 als Zelllinie *in vitro* etabliert ist und nachfolgendes Passagieren der Zellen *in vitro* zu einem Verlust der aneuploiden Zellen führte [170].

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten bestätigen frühere Resultate, die zeigten, dass chromosomale Veränderungen mit Dedifferenzierung von Tumorzellen und schnellerem Tumorwachstum sowie verstärkter Metastasierungsneigung assoziiert sind [173]. Durch die sehr schnelle Wachstumsrate des AT1 entsteht eine Volumen- abhängige chronische Hypoxie im Zentralbereich des Tumors aufgrund von fehlenden reifen Gefäßen [174]. Es gibt bereits Nachweise, dass eine niedrige Sauerstoffversorgung die treibende Kraft für genomische Aberrationen, Genamplifikation sowie Polyploidie und genomische Instabilität in soliden Tumoren ist [175]. Besonders unter chronisch hypoxischen Bedingungen entstehen neue genetische Varianten, die unter sonst letalen Konditionen überleben können. Dies repräsentiert einen möglichen Mechanismus für charakteristische Änderungen, die mit Tumorprogression in Prostatatumoren assoziiert ist [176]. Um die verschiedenen Subpopulationen in den drei Sublinien näher zu charakterisieren, wurde untersucht, ob Oberflächenmarker zu diesem Zweck eingesetzt werden können. Das spätere Ziel dieser Arbeiten war die Identifizierung von Tumor-initiiierenden Zellen. Es wurden die Marker CD24, CD44, CD133 und CD326 (EpCam) benutzt [164,165,177-181]. Um keine Membranstrukturen zu zerstören, wurden die Zellaufarbeitungsschritte komplett ohne enzymatische Verdauungs- und Zentrifugationsschritte durchgeführt. Die drei Sublinien enthielten heterogene Subpopulationen, die sich in ihrer Proliferationsrate und der Expression der Oberflächenmarker unterschieden.

Zusätzlich wurde noch eine Doppelfärbung der Marker angeschlossen. Wenn man die doppelt negativen Zellen ausschließt, erhält man 12 mögliche Kombinationen der vier Marker. Für jede dieser Kombinationen konnten positive Zellen in muriner Prostata und in den drei Tumorsublinien detektiert werden. In allen Fällen korrelierte die erhöhte Menge an positiven Zellen mit einer Dedifferenzierung und einer Zunahme an Aneuploidie. Zusätzlich zeigte sich, dass die positiven Zellen hauptsächlich aus der $G_{0/1}$ -Phase der aneuploiden Subpopulation stammten.

Parallel hierzu wurde die zelluläre Lokalisation der Oberflächenmarker unter Verwendung verschiedener Fixierungsmethoden in allen drei Sublinien und der murinen Prostata nachgewiesen.

4.5.2 Zellkulturetablierung

Neben der Identifizierung von individuellen Tumorsubpopulationen mittels Oberflächenmarker wurde auch die *in vitro* Etablierung der drei Sublinien verfolgt. Da mittlerweile Rattenspezifische CD24 und CD45 Antikörper kommerziell erhältlich waren, wurde für die weitere TIC- Charakterisierung und Zellkulturetablierung auf diese Antikörper zurückgegriffen.

Die größte Limitation bei der *in vitro* Kultivierung einer primären Prostatakrebszelllinie ist zum Einen das starke Wachstum des normalen Prostatagewebes, bestehend aus epithelialen und mesenchymalen Zellen im Vergleich zu den primären TICs und zum Anderen die wirklichen TICs zu isolieren und nicht die differenzierteren Vorläuferzellen mit begrenztem Selbsterneuerungspotenzial [68,120].

Die meisten Studien untersuchten deshalb bereits etablierte Krebszelllinien, die aber nicht aus primären PCa isoliert wurden und deren Langzeitkultur womöglich genetische Veränderungen und andere Oberflächenmarkerprofile induzierten.

Im Verlauf der Arbeit ist es gelungen durch CD24 MACS - Anreicherung AT1-, H- und HI-Zelllinien zu etablieren. Die Morphologie der drei Zelllinien unterscheidet sich deutlich voneinander. Die AT1- Zelllinie weist eine typisch epitheliale Morphologie auf, während die HI- Zelllinie aus wesentlich kleineren kubischen Zellen besteht, die einen ausgedehnten Zellverband eingehen. Im Gegensatz hierzu sind die Zellen der H- Zelllinie extrem groß und flächig mit wenig kontrastarmem Zytoplasma.

Durch erneute FACS- Messungen nach 4-wöchiger *in vitro* Passage, bestätigte sich der weiterhin hohe Anteil an $CD24^+$ - Zellen, der vergleichbar zum Zeitpunkt der erstmaligen Inkulturnahme war. Daraus lässt sich schließen, dass zumindest in dieser Kurzzeitkultur keine Veränderungen dieses Oberflächenmarkerprofils eintraten. Beachtenswert war, dass nach der MACS - Anreicherung und in den etablierten Zelllinien, jeweils die Menge an $CD24^+$ - Zellen mit dem Differenzierungsgrad zunahm ($AT1 < HI < H$). Dies ist konträr zu den

aus der Vorstudie gefundenen Ergebnissen [100]. Möglicherweise beruht der Unterschied auf der Tatsache, dass für die Vorstudie ausschließlich humane kreuzreaktive Antikörper benutzt wurden, wohingegen für die Zellkulturetablierung kommerziell-getestete Rattenspezifische Antikörper eingesetzt werden konnten. Deshalb sind die Ergebnisse der Zellkulturetablierung und Anreicherung der TICs sowie den LDAs im Zweifelsfall glaubwürdiger als die Ergebnisse der Vorstudie.

4.5.3 LDA

Die etablierten Zellkulturen wurden auf ihre *in vivo* Tumorinduktionsfähigkeit untersucht. Die Beobachtungszeit läuft derzeit noch und liegt zwischen 100 und 190 Tagen. Leider sind bisher keine Tumore angewachsen, so dass die Tumorinduzierbarkeit dieser Zelllinien momentan bezweifelt werden muss. Die Injektionen erfolgten subkutan mit Matrigel und sollten möglicherweise besser orthotop in die murine Prostata erfolgen [96]. Allerdings sind die Ursprungssublinien bisher auch subkutan problemlos gewachsen. Es ist jedoch möglich, dass die Einzelzellen für ihre Etablierung auf eine intakte Prostataumgebung angewiesen sind [72].

Um die TICs in den Sublinien AT1, HI und H zu identifizieren wurden CD45⁻ / Thy1⁻ - Zellen sowie CD24⁺/CD45⁻ - Zellen mittels FACS sortiert und verschiedene Zellzahlen subkutan in den Oberschenkel von Ratten injiziert. Nach CD45⁻ / Thy1⁻ - Injektion ist in keinem Fall ein Tumor entstanden (maximal 500.000 injizierte Zellen, 300 Tage Beobachtungszeit), so dass diese Subpopulation keine Tumor-induzierenden Eigenschaften hat. Im Gegensatz dazu waren CD24⁺/CD45⁻ - Zellen in der Lage Tumore zu induzieren. Für die AT1- und die H-Sublinien befinden sich diese CD24⁺/CD45⁻ - LDAs noch in der Nachbeobachtungszeit bei 145 bzw. 180 Tagen.

Da die Ausgangszellzahl an CD24⁺ - Zellen im AT1-Tumor äußerst gering war (0,5%), konnten lediglich bis zu 1.000 Zellen injiziert werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte keine Tumorinduktion nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Zellzahl könnte ein späteres Anwachsen von Tumoren vermutet werden, allerdings ist es wahrscheinlicher das CD24⁺ - Zellen im AT1-Tumor keine TIC- Subpopulation darstellen. Dagegen konnte in den anderen beiden langsam wachsenden Sublinien H und HI jeweils bei gleich niedrigen Zellzahlen zu vergleichbaren Zeitpunkten Tumorwachstum detektiert werden.

Nach 180 Tagen Beobachtungszeit konnten aus CD24⁺/CD45⁻ - Zellen der H-Sublinie sechs Tumore generiert werden. Hier lag die kleinste erfolgreich eingesetzte Zellzahl bei 100 Zellen. Inzwischen sind palpierbare Tumore vorhanden, die aber ein für den H-Tumor charakteristisches sehr langsames Wachstum zeigen, so dass bisher noch keine histologische Untersuchung durchgeführt werden konnte. Für eine genaue Bestimmung der Tumorinduktionsraten muss die angestrebte Beobachtungszeit von 300 Tagen abgewartet

werden. Allerdings ist bereits zum jetzigen Zeitpunkt feststellbar, dass CD24⁺/CD45⁻ - Zellen des H-Tumors offensichtlich Tumore induzieren können. Der Nachweis, dass es sich dabei histologisch um den Donor H-Tumor handelt, steht aber noch aus.

Am erfolgreichsten hat der LDA für die HI-Sublinie funktioniert. Die längste Nachbeobachtungszeit betrug 297 Tage, wobei der späteste Tumor an Tag 110 palpierbar war. Lediglich eine Verdünnung auf 10 Zellen pro Injektion war nicht in der Lage einen Tumor zu induzieren, wobei bei solch geringen Zellzahlen nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine geringere Zellzahl injiziert wurde. 100 CD24⁺/CD45⁻ - Zellen des HI-Tumors waren mit einer Wahrscheinlichkeit von 37,5% in der Lage Tumore zu induzieren. Diese Tumorinduktionsrate steigerte sich zunehmend und erreichte bei 100.000 Zellen 100%. Abgesehen von einer leicht verkürzten Tumorinduktionszeit für 200.000 injizierte Zellen, schien sie, unabhängig von der applizierten Zellzahl, um 80 Tage zu schwanken. Dabei war die Variabilität zwischen den Tieren größer als zwischen den Zellzahlen (10^2 - 10^5).

Schlussfolgernd zeigen diese Ergebnisse, dass CD24⁺/CD45⁻ - Zellen des HI-Tumors hoch potente TICs enthalten, da bereits 100 Zellen ausreichen, um einen schnell wachsenden HI-Tumor zu generieren, der auch histologisch dem Donor HI-Tumor vor Sortierung entspricht. Die aus der Sortierung hervorgegangen *in vivo* HI-Tumoren zeigten alle typischen Strukturen des Donor- HI mit seinen cribriformen Zellen, den Stromalen Bereichen und Gefäßen sowie die muzinösen Drüsenstrukturen. Es konnte auch bereits eine erfolgreiche Retransplantation eines solchen Tumors mittels Fragmenten (Methode der Transplantation für die Bestrahlungsexperimente, siehe 2.3) durchgeführt werden.

Eine erneute FACS- Untersuchung von *in vivo* gewachsenen HI-Tumoren nach CD24⁺/CD45⁻ - Sortierung zeigte einen weiterhin hohen Gehalt an CD24⁺ - Zellen (80%, vergleichbar zum Zeitpunkt der Zellinjektion) und einen von 0 auf 12% angestiegenen CD45⁺- Gehalt. Diese CD45⁺ - Zellen stellen wahrscheinlich ein immunogenes Infiltrat und eingewanderte Fibroblasten dar [182], so dass in der *in vivo* Situation immer mit einem gewissen Anteil an CD45⁺- Zellen gerechnet werden muss.

Die Injektion von CD24⁻/CD45⁻ - sortierten Zellen führte bei H und HI-Tumoren zu keiner Tumorinduktion, allerdings war bei der AT1- Zelllinie (die aus CD24⁻/CD45⁻ - sortierten Zellen etabliert wurde) bei hohen Zellzahlen (450.000) Tumorwachstum detektierbar. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die TICs in H und HI-Tumoren in der CD24⁺ - Subpopulation, die des AT1-Tumors aber in der CD24⁻ - Subpopulation zu suchen sind. Zusätzlich ist dies ein Beweis dafür, dass auch Einzelzellsuspensionen des AT1 Tumore bilden können, so dass ein methodischer Fehler, der zum nicht- Anwachsen der AT1- Zellen führt, ausgeschlossen werden kann.

Für die Bestätigung dieser Ergebnisse sind zukünftig LDAs mit unsortierten Gesamttumoren geplant, um die intrinsische Tumorinduktionsrate der drei Tumorsublinien zu bestimmen. Zusätzlich ist die vorherige MACS- Anreicherung und anschließende CD24⁺/CD45⁻ -

Sortierung des AT1-Tumors geplant, um höhere Zellzahlen für die Injektion zu erreichen. Zukünftig sollen diese Vorarbeiten dafür genutzt werden, HI-Tumore *in vivo* zu bestrahlen, um anschließend den Einfluss der zwei Strahlqualitäten auf TICs über LDA zu quantifizieren.

4.6 Der Einfluss von Bestrahlung auf die CD24- Expression in HI-Tumoren

TICs spielen eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Radioresistenzen [69,96], weil z.B. eine Aktivierung der DNA- Checkpoints oder eine erhöhte Vaskularisierung durch die vermehrte VEGF-Expression stattfindet [69].

Da wir CD24⁺/CD45⁻ - Zellen des HI-Tumors als putative TICs identifiziert haben, wurde in einem ersten Schritt der Einfluss der Photonen- und ¹²C- RT innerhalb der Longitudinalstudie histologisch untersucht.

In der mikroskopischen Analyse haben unbehandelte HI-Tumore etwa 10% CD24⁺ - Zellen, dies liegt deutlich unter den FACS- Messungen. Dies liegt zum Einen an den unterschiedlichen Präparationsmethoden für FACS und Mikroskopie und zum Anderen an der Auswertung der Mikroskopiebilder. Für die Analyse wurde die Anzahl positiver Zellen pro Gesamtbildfläche berechnet. Besonders im HI-Tumor, mit seinen vielen drüsigen Strukturen, ergeben sich pro Bildfläche immer wieder große zellfreie Bereiche, so dass hier leicht eine Unterschätzung der Zahl an CD24⁺ - Zellen möglich ist. Da ein Vergleich zwischen Photonen- und ¹²C- RT aber nur innerhalb dieser Methode stattfindet, kann dieser systematische Fehler vernachlässigt werden. Die mikroskopische Analyse konnte die Lokalisation des Oberflächenmarkers hauptsächlich auf der Zelloberfläche und nicht im Nukleus bestätigen.

Interessanterweise war der zeitliche Verlauf der CD24- Expression nach Photonen- und ¹²C- RT deutlich unterschiedlich. 8 h nach Photonen- RT war die Anzahl an CD24⁺ - Zellen auf 3% reduziert, dagegen in ¹²C- RT behandelten Tumoren auf über 35% stark erhöht. Anschließend erhöhten sich die Mengen für Photonen- bzw. reduzierten sich für ¹²C- RT, so dass sich zwischen 18 h und 7 Tage ein einheitliches Muster für beide Bestrahlungen ergab (20-25% positive Zellen). Insgesamt nimmt die CD24- Expression nach dem initialen Anstieg nach Bestrahlung ab. Ab 14 Tagen war eine deutlich schnellere Abnahme für ¹²C- im Vergleich zu Photonen- RT zu beobachten. Für Photonen- RT stabilisierte sich die CD24- Menge auf Kontrollniveau, für ¹²C- RT deutlich unterhalb.

Diese Beobachtung führt zur Hypothese einer unterschiedlichen Beeinflussung von TICs durch Photonen- und ¹²C- RT. Zumindest konnte gezeigt werden, dass die CD24⁺ - Expression zeitlich und auch in der absoluten Anzahl an positiven Zellen nach beiden Strahlmodalitäten stark variierte. Ob dies auch einen Einfluss auf die Tumor- induzierenden Eigenschaften hat, soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Damit ist die

Analyse der CD24- Expression ein erster Anhaltspunkt für einen differenziellen Effekt auf TICs nach Photonen- und Kohlenstoffionenbestrahlung.

Masunaga *et al.* [183,184] zeigten bereits *in vivo*, dass ^{12}C - RT effektiver ruhende Zellen abtötet als konventionelle Photonen- RT. Da Stammzellen auch zu den ruhenden Zellen gerechnet werden, scheint dies ein weiterer Hinweis auf einen differenziellen Effekt zwischen Photonen- und ^{12}C - RT auf Stammzellen zu sein.

In vitro Studien wiesen bereits nach, dass Photonen- RT in der Lage ist CD44⁺ CSCs in Du145 und LNCaP zu inaktivieren, diese Zellen hatten aber ein besseres Langzeitüberleben und höhere Wiederanwachsraten als die Gesamttumorpopulation [185]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Photonen- RT Stammzell- Eigenschaften wie z.B. Sphärenbildungskapazität oder Sox2- und Oct3/4- Expression in nicht- Stammzellpopulationen erhöhen [186,187]. Diese Ergebnisse wären womöglich eine Erklärung für das beobachtete starke Ansteigen der CD24- Expression direkt nach RT. Ob diese *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragbar sind, muss jedoch erst in zukünftigen Studien nachweisen werden.

5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Erweiterung der präklinischen Datenbasis zur Strahlentoleranz von Tumoren mit bekanntem Differenzierungsstatus in der Kohlenstoffionentherapie. Diese Datenbasis wird in der Zukunft durch weitere Fraktionierungsschemata (z.B. 6 Fx) sowie durch Untersuchungen an Normalgeweben ergänzt. Die in dieser Arbeit erarbeiteten Daten sollen tiefgreifender analysiert werden und direkt in Form von RBW und α/β - Werten in die Bestrahlungsplanung von klinischen Studien einfließen.

Die mechanistischen Untersuchungen zur spezifischen Wirkung von Kohlenstoffionen müssen weiter vertieft werden. Deshalb sollen die funktionellen und nicht- invasiven MRT- und Ultraschalluntersuchungen mit isoeffektiven und gleichen physikalischen Dosen für alle drei Sublinien des Prostatumors (AT1, H und HI) nach Photonen- und ^{12}C - RT, unterstützt durch histologische Untersuchungen, vergleichend durchgeführt werden. Die quantitative Analyse der MRT- Daten soll dabei durch eine Auswertung mit einem verbesserten pharmakokinetischen Modell eine stärkere Aussagekraft erhalten.

Durch die Erweiterung der Genexpressionsanalysen auf die Sublinien AT1, H und HI können generelle Mechanismen der Regulation der Genexpression nach ^{12}C - RT entziffert und für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen eingesetzt werden.

Zukünftige Arbeiten sollen auf die direkte Untersuchung der Strahlenreaktion von Tumor-induzierenden Zellen (TICs) fokussiert sein, da eine verbesserte Inaktivierung von TICs durch ^{12}C - RT im Vergleich zu Photonenbestrahlung angenommen wird. Dafür ist eine weiterführende Charakterisierung der TICs in den verschiedenen Sublinien erforderlich. Beispielsweise sollen *in vivo* Tumore der HI- Sublinie mit unterschiedlichen Photonen- und ^{12}C - Dosen bestrahlt werden und anschließend zu einem definierten Zeitpunkt nach RT (z.B. nach 14 Tagen), die bereits identifizierten $\text{CD}24^+/\text{CD}45^-$ - TICs mit der FACS sortiert und ihre Tumor- induzierende Eigenschaft nach RT mittels LDA nachgewiesen werden. Mit einer solchen Dosis- abhängigen Quantifizierung der TICs könnten DWKs auf der Basis von Tumorstammzellen erstellt werden, so dass die möglichen Unterschiede in der Strahlempfindlichkeit von TICs gegenüber ^{12}C - und Photonen-RT sichtbar gemacht werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, Last accessed on 09/09/2013.
 2. <http://www.rki.de>.
 3. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Pathologie 4. Auflage; ISBN: 978-3-437-42382-6. Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
 4. Schrecengost R, Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Seminars in Oncology* 2013;40(3):244-258.
 5. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* 2000;14(19):2410-2434.
 6. Kasper S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Reviews* 2008;4(3):193-201.
 7. Zaorsky NG, Trabulsi EJ, Lin J, Den RB. Multimodality therapy for patients with high-risk prostate cancer: current status and future directions. *Seminars in Oncology* 2013;40(3):308-321.
 8. Mohler JL. The 2010 NCCN clinical practice guidelines in oncology on prostate cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 2010;8(2):145.
 9. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology* 2012;60(1):87-117.
 10. Jiang GL. Particle therapy for cancers: a new weapon in radiation therapy. *Frontiers of Medicine* 2012;6(2):165-172.
 11. Peschke P, Karger CP, Scholz M, Debus J, Huber PE. Relative biological effectiveness of carbon ions for local tumor control of a radioresistant prostate carcinoma in the rat. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2011;79(1):239-246.
 12. Mishra MV, Showalter TN. Pushing the limits of radiation therapy for prostate cancer: where do we go next? *Seminars in Oncology* 2013;40(3):297-307.
 13. Suit H, DeLaney T, Goldberg S, Paganetti H, Clasie B, Gerweck L, Niemierko A, Hall E, Flanz J, Hallman J, Trofimov A. Proton vs carbon ion beams in the definitive radiation treatment of cancer patients. *Radiotherapy and Oncology* 2010;95(1):3-22.
 14. Scholz M, Kellerer AM, Kraft-Weyrather W, Kraft G. Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy. The model and its approximation. *Radiation and Environmental Biophysics* 1997;36(1):59-66.
 15. Kanai T, Furusawa Y, Fukutsu K, Itsukaichi H, Eguchi-Kasai K, Ohara H. Irradiation of mixed beam and design of spread-out Bragg peak for heavy-ion radiotherapy. *Radiation Research* 1997;147(1):78-85.
-

16. Castro JR, Tobias CA, Saunders WM, Chen GT, Collier JM, Lyman JT, Woodruff KH, Phillips TL, Grewal-Bahl R, Char D, et al. Heavy particle experience in the treatment of human cancer. *Progress in Clinical and Biological Research* 1983;132D:279-290.
 17. Muramatsu M, Kitagawa A. A review of ion sources for medical accelerators (invited). *The Review of Scientific Instruments* 2012;83(2):02B909.
 18. Kamada T. Clinical evidence of particle beam therapy (carbon). *International Journal of Clinical Oncology* 2012;17(2):85-88.
 19. Combs SE, Ellerbrock M, Haberer T, Habermehl D, Hoess A, Jakel O, Jensen A, Klemm S, Munter M, Naumann J, Nikoghosyan A, Oertel S, Parodi K, Rieken S, Debus J. Heidelberg Ion Therapy Center (HIT): Initial clinical experience in the first 80 patients. *Acta Oncol* 2010;49(7):1132-1140.
 20. Combs SE, Nikoghosyan A, Jaekel O, Karger CP, Haberer T, Munter MW, Huber PE, Debus J, Schulz-Ertner D. Carbon ion radiotherapy for pediatric patients and young adults treated for tumors of the skull base. *Cancer* 2009;115(6):1348-1355.
 21. Debus J, Haberer T, Schulz-Ertner D, Jakel O, Wenz F, Enghardt W, Schlegel W, Kraft G, Wannemacher M. [Carbon ion irradiation of skull base tumors at GSI. First clinical results and future perspectives]. *Strahlentherapie und Onkologie* 2000;176(5): 211-216.
 22. Hishikawa Y, Oda Y, Mayahara H, Kawaguchi A, Kagawa K, Murakami M, Abe M. Status of the clinical work at Hyogo. *Radiotherapy and Oncology* 2004;73 Suppl 2: S38-40.
 23. Orecchia R, Fossati P, Rossi S. The National Center for Oncological Hadron Therapy: status of the project and future clinical use of the facility. *Tumori* 2009;95(2):169-176.
 24. Combs SE, Kalbe A, Nikoghosyan A, Ackermann B, Jakel O, Haberer T, Debus J. Carbon ion radiotherapy performed as re-irradiation using active beam delivery in patients with tumors of the brain, skull base and sacral region. *Radiotherapy and Oncology* 2011;98(1):63-67.
 25. Tsujii H, Mizoe JE, Kamada T, Baba M, Kato S, Kato H, Tsuji H, Yamada S, Yasuda S, Ohno T, Yanagi T, Hasegawa A, Sugawara T, Ezawa H, Kandatsu S, Yoshikawa K, Kishimoto R, Miyamoto T. Overview of clinical experiences on carbon ion radiotherapy at NIRS. *Radiotherapy and Oncology* 2004;73 Suppl 2:S41-49.
 26. Tsujii H, Mizoe J, Kamada T, Baba M, Tsuji H, Kato H, Kato S, Yamada S, Yasuda S, Ohno T, Yanagi T, Imai R, Kagei K, Kato H, Hara R, Hasegawa A, Nakajima M, Sugane N, Tamaki N, Takagi R, Kandatsu S, Yoshikawa K, Kishimoto R, Miyamoto T. Clinical results of carbon ion radiotherapy at NIRS. *Journal of Radiation Research* 2007;48: Suppl, A1-A13.
 27. Schulz-Ertner D, Tsujii H. Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25(8):953-964.
 28. Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Hof H, Didinger B, Combs SE, Jakel O, Karger CP, Edler L, Debus J. Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2007;67(1):171-177.
-

29. Schulz-Ertner D, Karger CP, Feuerhake A, Nikoghosyan A, Combs SE, Jakel O, Edler L, Scholz M, Debus J. Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2007;68(2):449-457.
 30. Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Didinger B, Munter M, Jakel O, Karger CP, Debus J. Therapy strategies for locally advanced adenoid cystic carcinomas using modern radiation therapy techniques. *Cancer* 2005;104(2):338-344.
 31. Combs SE, Burkholder I, Edler L, Rieken S, Habermehl D, Jakel O, Haberer T, Haselmann R, Unterberg A, Wick W, Debus J. Randomised phase I/II study to evaluate carbon ion radiotherapy versus fractionated stereotactic radiotherapy in patients with recurrent or progressive gliomas: the CINDERELLA trial. *BMC Cancer* 2010;10:533.
 32. Combs SE, Edler L, Burkholder I, Rieken S, Habermehl D, Jakel O, Haberer T, Unterberg A, Wick W, Debus J, Haselmann R. Treatment of patients with atypical meningiomas Simpson grade 4 and 5 with a carbon ion boost in combination with postoperative photon radiotherapy: the MARCIE trial. *BMC Cancer* 2010;10:615.
 33. Combs SE, Habermehl D, Ganten T, Schmidt J, Edler L, Burkholder I, Jakel O, Haberer T, Debus J. Phase I study evaluating the treatment of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) with carbon ion radiotherapy: the PROMETHEUS-01 trial. *BMC Cancer* 2011;11:67.
 34. Combs SE, Hartmann C, Nikoghosyan A, Jakel O, Karger CP, Haberer T, von Deimling A, Munter MW, Huber PE, Debus J, Schulz-Ertner D. Carbon ion radiation therapy for high-risk meningiomas. *Radiotherapy and Oncology* 2010;95(1):54-59.
 35. Combs SE, Kessel K, Habermehl D, Haberer T, Jakel O, Debus J. Proton and carbon ion radiotherapy for primary brain tumors and tumors of the skull base. *Acta Oncol* 2013.
 36. Combs SE, Kieser M, Rieken S, Habermehl D, Jakel O, Haberer T, Nikoghosyan A, Haselmann R, Unterberg A, Wick W, Debus J. Randomized phase II study evaluating a carbon ion boost applied after combined radiochemotherapy with temozolomide versus a proton boost after radiochemotherapy with temozolomide in patients with primary glioblastoma: the CLEOPATRA trial. *BMC Cancer* 2010;10:478.
 37. Combs SE, Habermehl D, Kieser M, Dreher C, Werner J, Haselmann R, Jakel O, Jager D, Buchler MW, Debus J. Phase I study evaluating the treatment of patients with locally advanced pancreatic cancer with carbon ion radiotherapy: the PHOENIX-01 trial. *BMC Cancer* 2013;13(1):419.
 38. Ishikawa H, Tsuji H, Kamada T, Akakura K, Suzuki H, Shimazaki J, Tsujii H. Carbon-ion radiation therapy for prostate cancer. *International Journal of Urology* 2012; 19(4):296-305.
 39. Elsasser T, Kramer M, Scholz M. Accuracy of the local effect model for the prediction of biologic effects of carbon ion beams in vitro and in vivo. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2008;71(3):866-872.
-

40. Elsasser T, Weyrather WK, Friedrich T, Durante M, Iancu G, Kramer M, Kragl G, Brons S, Winter M, Weber KJ, Scholz M. Quantification of the relative biological effectiveness for ion beam radiotherapy: direct experimental comparison of proton and carbon ion beams and a novel approach for treatment planning. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2010;78(4):1177-1183.
 41. Schlamp I, Karger CP, Jakel O, Scholz M, Diding B, Nikoghosyan A, Hoess A, Kramer M, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D. Temporal lobe reactions after radiotherapy with carbon ions: incidence and estimation of the relative biological effectiveness by the local effect model. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2011;80(3):815-823.
 42. Steinstrater O, Grun R, Scholz U, Friedrich T, Durante M, Scholz M. Mapping of RBE-weighted doses between HIMAC- and LEM-Based treatment planning systems for carbon ion therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2012;84(3):854-860.
 43. Grun R, Friedrich T, Elsasser T, Kramer M, Zink K, Karger CP, Durante M, Engenhardt-Cabillic R, Scholz M. Impact of enhancements in the local effect model (LEM) on the predicted RBE-weighted target dose distribution in carbon ion therapy. *Physics in Medicine and Biology* 2012;57(22):7261-7274.
 44. Scholz M, Matsufuji N, Kanai T. Test of the local effect model using clinical data: tumour control probability for lung tumours after treatment with carbon ion beams. *Radiation Protection Dosimetry* 2006;122(1-4):478-479.
 45. Karger CP, Peschke P, Sanchez-Brandelik R, Scholz M, Debus J. Radiation tolerance of the rat spinal cord after 6 and 18 fractions of photons and carbon ions: experimental results and clinical implications. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2006;66(5):1488-1497.
 46. Debus J, Scholz M, Haberer T, Peschke P, Jakel O, Karger CP, Wannemacher M. Radiation tolerance of the rat spinal cord after single and split doses of photons and carbon ions. *Radiation Research* 2003;160(5):536-542.
 47. Karger CP, Debus J, Peschke P, Munter MW, Heiland S, Hartmann GH. Dose-response curves for late functional changes in the normal rat brain after single carbon-ion doses evaluated by magnetic resonance imaging: influence of follow-up time and calculation of relative biological effectiveness. *Radiation Research* 2002;158(5):545-555.
 48. Tenforde TS, Tenforde SD, Crabtree KE, Parks DL, Schilling WA, Parr SS, Flynn MJ, Howard J, Lyman JT, Curtis SB. RBE values for radiation-induced growth delay in rat rhabdomyosarcoma tumors exposed to plateau and peak carbon, neon and argon ions. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1981;7(2):217-222.
 49. Takahashi A, Yano T, Matsumoto H, Wang X, Ohnishi K, Tamamoto T, Tsuji K, Yukawa O, Ohnishi T. Effects of accelerated carbon-ions on growth inhibition of transplantable human esophageal cancer in nude mice. *Cancer Letters* 1998;122(1-2):181-186.
-

50. Koike S, Ando K, Oohira C, Fukawa T, Lee R, Takai N, Monobe M, Furusawa Y, Aoki M, Yamada S, Shimizu W, Nojima K, Majima H. Relative biological effectiveness of 290 MeV/u carbon ions for the growth delay of a radioresistant murine fibrosarcoma. *Journal of Radiation Research* 2002;43(3):247-255.
 51. Isaacs JT, Heston WD, Weissman RM, Coffey DS. Animal models of the hormone-sensitive and -insensitive prostatic adenocarcinomas, Dunning R-3327-H, R-3327-HI, and R-3327-AT. *Cancer Research* 1978;38(11 Pt 2):4353-4359.
 52. Karger CP, Peschke P, Scholz M, Huber PE, Debus J. Relative biological effectiveness of carbon ions in a rat prostate carcinoma in vivo: comparison of 1, 2, and 6 fractions. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2013;86(3):450-455.
 53. Joiner M, van der Kogel A. *Basic Clinical Radiobiology*; 4th Edition; ISBN: 978-0-340-929-667. 2009.
 54. Jakob B, Scholz M, Taucher-Scholz G. Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *Radiation Research* 2003;159(5):676-684.
 55. Jeggo PA, Geuting V, Lohrich M. The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiotherapy and Oncology* 2011;101(1):7-12.
 56. Staab A, Zukowski D, Walenta S, Scholz M, Mueller-Klieser W. Response of Chinese hamster v79 multicellular spheroids exposed to high-energy carbon ions. *Radiation Research* 2004;161(2):219-227.
 57. Weyrather WK, Ritter S, Scholz M, Kraft G. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *International Journal of Radiation Biology* 1999;75(11):1357-1364.
 58. Fournier C, Wiese C, Taucher-Scholz G. Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. *Radiation Research* 2004;161(6):675-684.
 59. Tsuboi K, Tsuchida Y, Nose T, Ando K. Cytotoxic effect of accelerated carbon beams on glioblastoma cell lines with p53 mutation: clonogenic survival and cell-cycle analysis. *International Journal of Radiation Biology* 1998;74(1):71-79.
 60. Schmid TE, Multhoff G. Non-targeted effects of photon and particle irradiation and the interaction with the immune system. *Frontiers in Oncology* 2012;2:80.
 61. Imadome K, Iwakawa M, Nojiri K, Tamaki T, Sakai M, Nakawatari M, Moritake T, Yanagisawa M, Nakamura E, Tsujii H, Imai T. Upregulation of stress-response genes with cell cycle arrest induced by carbon ion irradiation in multiple murine tumors models. *Cancer Biology & Therapy* 2008;7(2):208-217.
 62. Atkinson MJ. Radiation treatment effects on the proteome of the tumour microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology* 2013;990:49-60.
 63. Hellweg CE, Baumstark-Khan C, Schmitz C, Lau P, Meier MM, Testard I, Berger T, Reitz G. Carbon-ion-induced activation of the NF-kappaB pathway. *Radiation Research* 2011;175(4):424-431.
-

64. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300(5622):1155-1159.
 65. Horsman MR, Nielsen T, Ostergaard L, Overgaard J. Radiation administered as a large single dose or in a fractionated schedule: Role of the tumour vasculature as a target for influencing response. *Acta Oncol* 2006;45(7):876-880.
 66. Tennant TR, Kim H, Sokoloff M, Rinker-Schaeffer CW. The Dunning model. *The Prostate* 2000;43(4):295-302.
 67. Isaacs JT, Isaacs WB, Feitz WFJ, Scheres J. Establishment and Characterization of 7 Dunning Rat Prostatic-Cancer Cell-Lines and Their Use in Developing Methods for Predicting Metastatic Abilities of Prostatic Cancers. *The Prostate* 1986;9(3):261-281.
 68. Chen S, Principessa L, Isaacs JT. Human prostate cancer initiating cells isolated directly from localized cancer do not form prostaspheres in primary culture. *The Prostate* 2012;72(13):1478-1489.
 69. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Research* 2007;67(19):8980-8984.
 70. Peschke P, Hahn EW, Wenz F, Lohr F, Braunschweig F, Wolber G, Zuna I, Wannemacher M. Differential sensitivity of three sublines of the rat Dunning prostate tumor system R3327 to radiation and/or local tumor hyperthermia. *Radiation Research* 1998;150(4):423-430.
 71. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444(7120):756-760.
 72. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of Cell Biology* 2012;198(3):281-293.
 73. Haberer T, Becher W, Schardt D, Kraft G. Magnetic scanning system for heavyion therapy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 1993;330:296-305.
 74. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.
 75. Walker AM, Suit HD. Assessment of local tumor control using censored tumor response data. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1983;9(3):383-386.
 76. Statsoft Inc. STATISTICA for Windows 2011 (Software system for data analysis), Version 10.0. Available at: www.statsoft.com. Last accessed July 31, 2013.
 77. Finney DJ. *Statistical Method in Biological Assay* 3rd edition London: Charles Griffin; 1978.
 78. Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *The British Journal of Radiology* 1989;62(740):679-694.
 79. Brenner DJ, Hlatky LR, Hahnfeldt PJ, Huang Y, Sachs RK. The linear-quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships. *Radiation Research* 1998;150(1):83-91.
-

80. Thames HD, Jr., Withers HR, Peters LJ, Fletcher GH. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1982;8(2):219-226.
 81. Brix G, Semmler W, Port R, Schad LR, Layer G, Lorenz WJ. Pharmacokinetic parameters in CNS Gd-DTPA enhanced MR imaging. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1991;15(4):621-628.
 82. Bauerle T, Bartling S, Berger M, Schmitt-Graff A, Hilbig H, Kauczor HU, Delorme S, Kiessling F. Imaging anti-angiogenic treatment response with DCE-VCT, DCE-MRI and DWI in an animal model of breast cancer bone metastasis. *European Journal of Radiology* 2010;73(2):280-287.
 83. Good JS, Harrington KJ. The Hallmarks of Cancer and the Radiation Oncologist: Updating the 5Rs of Radiobiology. *Clin Oncol* 2013.
 84. Ehemann V, Hashemi B, Lange A, Otto HF. Flow cytometric DNA analysis and chromosomal aberrations in malignant glioblastomas. *Cancer Letters* 1999;138(1-2):101-106.
 85. Takahashi T, Fukawa T, Hirayama R, Yoshida Y, Musha A, Furusawa Y, Ando K, Nakano T. In vitro interaction of high-LET heavy-ion irradiation and chemotherapeutic agents in two cell lines with different radiosensitivities and different p53 status. *Anticancer Res* 2010;30(6):1961-1967.
 86. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Lohrich M, Jeggo PA. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO Journal* 2011;30(6):1079-1092.
 87. Hirayama R, Furusawa Y, Fukawa T, Ando K. Repair kinetics of DNA-DSB induced by X-rays or carbon ions under oxic and hypoxic conditions. *Journal of Radiation Research* 2005;46(3):325-332.
 88. Hada M, Georgakilas AG. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *Journal of Radiation Research* 2008;49(3):203-210.
 89. Tobias F, Durante M, Taucher-Scholz G, Jakob B. Spatiotemporal analysis of DNA repair using charged particle radiation. *Mutation Research* 2010;704(1-3):54-60.
 90. Matsumura S, Matsumura T, Ozeki S, Fukushima S, Yamazaki H, Inoue T, Furusawa Y, Eguchi-Kasai K. Comparative analysis of G2 arrest after irradiation with 75 keV carbon-ion beams and ¹³⁷Cs gamma-rays in a human lymphoblastoid cell line. *Cancer Detection and Prevention* 2003;27(3):222-228.
 91. Mustonen R, Bouvier G, Wolber G, Stohr M, Peschke P, Bartsch H. A comparison of gamma and neutron irradiation on Raji cells: effects on DNA damage, repair, cell cycle distribution and lethality. *Mutation Research* 1999;429(2):169-179.
 92. Wenzl T, Wilkens JJ. Modelling of the oxygen enhancement ratio for ion beam radiation therapy. *Physics in Medicine and Biology* 2011;56(11):3251-3268.
 93. Matsui Y, Asano T, Kenmochi T, Iwakawa M, Imai T, Ochiai T. Effects of carbon-ion beams on human pancreatic cancer cell lines that differ in genetic status. *American Journal of Clinical Oncology* 2004;27(1):24-28.
-

94. Suzuki M, Kase Y, Yamaguchi H, Kanai T, Ando K. Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2000;48(1):241-250.
 95. Imaoka T, Nishimura M, Kakinuma S, Hatano Y, Ohmachi Y, Yoshinaga S, Kawano A, Maekawa A, Shimada Y. High relative biologic effectiveness of carbon ion radiation on induction of rat mammary carcinoma and its lack of H-ras and Tp53 mutations. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2007;69(1):194-203.
 96. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature Reviews Cancer* 2008;8(7):545-554.
 97. Krause M, Yaromina A, Eichele W, Koch U, Baumann M. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 2011;17(23):7224-7229.
 98. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98(24):1777-1785.
 99. Cui X, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Akashi M, Kamada T, Okayasu R. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Research* 2011;71(10):3676-3687.
 100. Glowa C, Peschke P, Karger CP, Hahn EW, Huber PE, Debus J, Ehemann V. Flow cytometric characterization of tumor subpopulations in three sublines of the dunning R3327 rat prostate tumor model. *The Prostate* 2013. DOI10.1002/pros.22710
 101. Nikoghosyan AV, Schulz-Ertner D, Herfarth K, Diding B, Munter MW, Jensen AD, Jakel O, Hoess A, Haberer T, Debus J. Acute toxicity of combined photon IMRT and carbon ion boost for intermediate-risk prostate cancer - acute toxicity of 12C for PC. *Acta Oncol* 2011;50(6):784-790.
 102. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473(7347):298-307.
 103. Fuks Z, Kolesnick R. Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell* 2005;8(2):89-91.
 104. Garcia-Barros M, Thin TH, Maj J, Cordon-Cardo C, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Impact of stromal sensitivity on radiation response of tumors implanted in SCID hosts revisited. *Cancer Research* 2010;70(20):8179-8186.
 105. Kozin SV, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Neovascularization after irradiation: what is the source of newly formed vessels in recurring tumors? *Journal of the National Cancer Institute* 2012;104(12):899-905.
 106. El Kaffas A, Giles A, Czarnota GJ. Dose-dependent response of tumor vasculature to radiation therapy in combination with Sunitinib depicted by three-dimensional high-frequency power Doppler ultrasound. *Angiogenesis* 2013;16(2):443-454.
-

107. Multhoff G, Vaupel P. Radiation-induced changes in microcirculation and interstitial fluid pressure affecting the delivery of macromolecules and nanotherapeutics to tumors. *Frontiers in Oncology* 2012;2:165.
 108. Cheng JC, Yuan A, Chen JH, Lu YC, Cho KH, Wu JK, Wu CJ, Chang YC, Yang PC. Early detection of Lewis lung carcinoma tumor control by irradiation using diffusion-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *PLoS One* 2013;8(5):e62762.
 109. Brix G, Bahner ML, Hoffmann U, Horvath A, Schreiber W. Regional blood flow, capillary permeability, and compartmental volumes: measurement with dynamic CT-initial experience. *Radiology* 1999;210(1):269-276.
 110. Brix G, Kiessling F, Lucht R, Darai S, Wasser K, Delorme S, Griebel J. Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magnetic Resonance in Medicine* 2004;52(2):420-429.
 111. Zwick S, Brix G, Tofts PS, Strecker R, Kopp-Schneider A, Laue H, Semmler W, Kiessling F. Simulation-based comparison of two approaches frequently used for dynamic contrast-enhanced MRI. *European Radiology* 2010;20(2):432-442.
 112. Lin YC, Chan TH, Chi CY, Ng SH, Liu HL, Wei KC, Wai YY, Wang CC, Wang JJ. Blind estimation of the arterial input function in dynamic contrast-enhanced MRI using purity maximization. *Magnetic Resonance in Medicine* 2012;68(5):1439-1449.
 113. Lin YC, Wang JJ, Hong JH, Lin YP, Lee CC, Wai YY, Ng SH, Wu YM, Wang CC. Noninvasive monitoring of microvascular changes with partial irradiation using dynamic contrast-enhanced and blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2013;85(5):1367-1374.
 114. Isaacs JT. Development and characteristics of the available animal model systems for the study of prostatic cancer. *Progress in Clinical and Biological Research* 1987;239:513-576.
 115. Kleibeuker EA, Griffioen AW, Verheul HM, Slotman BJ, Thijssen VL. Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: a double-edged sword. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 2012;15(3):173-182.
 116. Casneuf VF, Delrue L, Van Damme N, Demetter P, Robert P, Corot C, Duyck P, Ceelen W, Boterberg T, Peeters M. Noninvasive monitoring of therapy-induced microvascular changes in a pancreatic cancer model using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging with P846, a new low-diffusible gadolinium-based contrast agent. *Radiation Research* 2011;175(1):10-20.
 117. Plasswilm L, Hanjalic A, Hoepfer J, Cordes N, Tannapfel A. Microvessel density and endothelial cell proliferation after amifostine (Ethyol) administration in vivo. *Anticancer Res* 1999;19(5B):4241-4245.
 118. Mobbs BG, Johnson IE. Changes in tumor characteristics during progression of the R3327 HI experimental prostatic carcinoma. *The Prostate* 1990;16(2):127-136.
-

119. Pfundt R, Smit F, Jansen C, Aalders T, Straatman H, van der Vliet W, Isaacs J, van Kessel AG, Schalken J. Identification of androgen-responsive genes that are alternatively regulated in androgen-dependent and androgen-independent rat prostate tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2005;43(3):273-283.
 120. Peehl DM. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-related Cancer* 2005;12(1):19-47.
 121. Bussemakers MJ, van Moorselaar RJ, Girolodi LA, Ichikawa T, Isaacs JT, Takeichi M, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased expression of E-cadherin in the progression of rat prostatic cancer. *Cancer Research* 1992;52(10):2916-2922.
 122. Bussemakers MJ, Verhaegh GW, van Bokhoven A, Debruyne FM, Schalken JA. Differential expression of vimentin in rat prostatic tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992;182(3):1254-1259.
 123. Rubenstein M, Shaw MW, McKiel CF, Ray PS, Guinan PD. Immunoregulatory markers in rats carrying Dunning R3327 H, G, or MAT-LyLu prostatic adenocarcinoma variants. *Cancer Research* 1987;47(1):178-182.
 124. Ragde H, Cavanagh WA, Tjoa BA. Dendritic cell based vaccines: progress in immunotherapy studies for prostate cancer. *The Journal of Urology* 2004;172(6 Pt 2):2532-2538.
 125. Xu Y, McDonald J, Perloff E, Buttice G, Schreiber BM, Smith BD. Collagen and major histocompatibility class II expression in mesenchymal cells from CIITA hypomorphic mice. *Molecular Immunology* 2007;44(7):1709-1721.
 126. Kwon BS, Tan KB, Ni J, Oh KO, Lee ZH, Kim KK, Kim YJ, Wang S, Gentz R, Yu GL, Harrop J, Lyn SD, Silverman C, Porter TG, Truneh A, Young PR. A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272(22):14272-14276.
 127. Dufner A, Mak TW. CARD tricks: controlling the interactions of CARD6 with RICK and microtubules. *Cell Cycle* 2006;5(8):797-800.
 128. Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH, Yokoyama WM. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1 family of natural killer cell receptors. *Nature Immunology* 2003;4(8):801-807.
 129. Dantzig AH, Hoskins JA, Tabas LB, Bright S, Shepard RL, Jenkins IL, Duckworth DC, Sportsman JR, Mackensen D, Rosteck PR, Jr., et al. Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. *Science* 1994;264(5157):430-433.
 130. Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Puccetti A. DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 2001;31(3):743-751.
 131. Ianzer D, Konno K, Xavier CH, Stocklin R, Santos RA, de Camargo AC, Pimenta DC. Hemorphin and hemorphin-like peptides isolated from dog pancreas and sheep brain are able to potentiate bradykinin activity in vivo. *Peptides* 2006;27(11):2957-2966.
-

132. Wingert RA, Galloway JL, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe JL, Weber GJ, Dooley K, Davidson AJ, Schmid B, Paw BH, Shaw GC, Kingsley P, Palis J, Schubert H, Chen O, Kaplan J, Zon LI. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 2005;436(7053):1035-1039.
 133. Rindler TN, Lasko VM, Nieman ML, Okada M, Lorenz JN, Lingrel JB. Knockout of the Na,K-ATPase alpha2-isoform in cardiac myocytes delays pressure overload-induced cardiac dysfunction. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2013;304(8):H1147-1158.
 134. Li J, Chen H, Mariani A, Chen D, Klatt E, Podratz K, Drapkin R, Broaddus R, Dowdy S, Jiang SW. HE4 (WFDC2) Promotes Tumor Growth in Endometrial Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14(3):6026-6043.
 135. Badawi AF. The role of prostaglandin synthesis in prostate cancer. *BJU International* 2000;85(4):451-462.
 136. Luan Y, Ma C, Wang Y, Fang H, Xu W. The characteristics, functions and inhibitors of three aminopeptidases belonging to the m1 family. *Current Protein & Peptide Science* 2012;13(5):490-500.
 137. Motrescu ER, Rio MC. Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biological Chemistry* 2008;389(8):1037-1041.
 138. Shahi P, Seethammagari MR, Valdez JM, Xin L, Spencer DM. Wnt and Notch pathways have interrelated opposing roles on prostate progenitor cell proliferation and differentiation. *Stem Cells* 2011;29(4):678-688.
 139. Wang JF, Liu C, Zhang Q, Huang GH. Research progress in the radioprotective effect of the canonical Wnt pathway. *Cancer Biology & Medicine* 2013;10(2):61-71.
 140. Eto N, Miyagishi M, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. *The American Journal of Pathology* 2009;174(4):1553-1563.
 141. Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biology & Therapy* 2006;5(7):763-765.
 142. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* 2006;5(5):575-590.
 143. Zhu L, Bakovic M. Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase-Pcyt2 activity. *Biochemistry and Cell Biology*;90(2):188-199.
 144. Jordan NV, Prat A, Abell AN, Zawistowski JS, Sciaky N, Karginova OA, Zhou B, Golitz BT, Perou CM, Johnson GL. SWI/SNF Chromatin-Remodeling Factor Smarcd3/Baf60c Controls Epithelial-Mesenchymal Transition by Inducing Wnt5a Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 2013;33(15):3011-3025.
-

145. Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Sacca M, Biffoni M, Francescangeli F, Cordenonsi M, Piccolo S, Memeo L, Pagliuca A, Muto G, Zeuner A, De Maria R, Bonci D. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2013;32(14):1843-1853.
 146. Bizet AA, Tran-Khanh N, Saksena A, Liu K, Buschmann MD, Philip A. CD109-mediated degradation of TGF-beta receptors and inhibition of TGF-beta responses involve regulation of SMAD7 and Smurf2 localization and function. *Journal of Cellular Biochemistry* 2012;113(1):238-246.
 147. Lee DH, Rhee JG, Lee YJ. Reactive oxygen species up-regulate p53 and Puma; a possible mechanism for apoptosis during combined treatment with TRAIL and wogonin. *British Journal of Pharmacology* 2009;157(7):1189-1202.
 148. Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, Nakamura Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Molecular Cell* 2001;8(1):85-94.
 149. Dabir S, Kluge A, McColl K, Liu Y, Lam M, Halmos B, Wildey G, Dowlati A. PIAS3 activates the intrinsic apoptotic pathway in non-small cell lung cancer cells independent of p53 status. *International Journal of Cancer* 2013; DOI10.1002/ijc.28448.
 150. Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, Lieber MR. DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Molecular Cell* 1998;2(4):477-484.
 151. Madden SL, Galella EA, Riley D, Bertelsen AH, Beaudry GA. Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Research* 1996;56(23):5384-5390.
 152. Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2012;12(6):696-703.
 153. Darnel AD, Behmoaram E, Vollmer RT, Corcos J, Bijian K, Sircar K, Su J, Jiao J, Alaoui-Jamali MA, Bismar TA. Fascin regulates prostate cancer cell invasion and is associated with metastasis and biochemical failure in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2009;15(4):1376-1383.
 154. Gines S, Marino M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casado V, Lluís C, Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *The Biochemical Journal* 2002;361(Pt 2):203-209.
 155. Vanhara P, Hampl A, Kozubik A, Soucek K. Growth/differentiation factor-15: prostate cancer suppressor or promoter? *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2012;15(4):320-328.
 156. Ogata T, Teshima T, Inaoka M, Minami K, Tsuchiya T, Isono M, Furusawa Y, Matsuura N. Carbon ion irradiation suppresses metastatic potential of human non-small cell lung cancer A549 cells through the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway. *Journal of Radiation Research* 2011;52(3):374-379.
-

157. Kesanakurti D, Chetty C, Rajasekhar Maddirela D, Gujrati M, Rao JS. Essential role of cooperative NF-kappaB and Stat3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma. *Oncogene* 2012.
 158. Kamlah F, Hanze J, Arenz A, Seay U, Hasan D, Juricko J, Bischoff B, Gottschald OR, Fournier C, Taucher-Scholz G, Scholz M, Seeger W, Engenhardt-Cabillic R, Rose F. Comparison of the effects of carbon ion and photon irradiation on the angiogenic response in human lung adenocarcinoma cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2011;80(5):1541-1549.
 159. Maalouf M, Alphonse G, Colliaux A, Beuve M, Trajkovic-Bodennec S, Battiston-Montagne P, Testard I, Chapet O, Bajard M, Taucher-Scholz G, Fournier C, Rodriguez-Lafrasse C. Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2009;74(1):200-209.
 160. Matsumoto Y, Iwakawa M, Furusawa Y, Ishikawa K, Aoki M, Imadome K, Matsumoto I, Tsujii H, Ando K, Imai T. Gene expression analysis in human malignant melanoma cell lines exposed to carbon beams. *International Journal of Radiation Biology* 2008;84(4):299-314.
 161. Gong L, Jin X, Li Q, Liu J, An L. Heavy ion beams induce survivin expression in human hepatoma SMMC-7721 cells more effectively than X-rays. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007;39(8):575-582.
 162. Yashiro T, Koyama-Saegusa K, Imai T, Fujisawa T, Miyamoto T. Inhibition of potential lethal damage repair and related gene expression after carbon-ion beam irradiation to human lung cancer grown in nude mice. *Journal of Radiation Research* 2007;48(5):377-383.
 163. Kelly K, Yin JJ. Prostate cancer and metastasis initiating stem cells. *Cell Research* 2008;18(5):528-537.
 164. Wei C, Guomin W, Yujun L, Ruizhe Q. Cancer stem-like cells in human prostate carcinoma cells DU145: the seeds of the cell line? *Cancer Biology & Therapy* 2007;6(5):763-768.
 165. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *British Journal of Cancer* 2008;98(4):756-765.
 166. Li H, Chen X, Calhoun-Davis T, Claypool K, Tang DG. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Research* 2008;68(6):1820-1825.
 167. Hensley PJ, Kyprianou N. Modeling prostate cancer in mice: limitations and opportunities. *Journal of Andrology* 2012;33(2):133-144.
 168. Mitchell S, Abel P, Ware M, Stamp G, Lalani E. Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU International* 2000;85(7):932-944.
-

169. Wang ZA, Shen MM. Revisiting the concept of cancer stem cells in prostate cancer. *Oncogene* 2011;30(11):1261-1271.
 170. Clafflin AJ, Pollack A, Malinin T, Block NL, Irvin GL. Flow cytometric analysis of R3327 rat prostate adenocarcinoma grown in vivo and in vitro. *Journal of the National Cancer Institute* 1982;69(1):79-87.
 171. Harms W, Weber KJ, Ehemann V, Zuna I, Debus J, Peschke P. Differential effects of CLDR and PDR brachytherapy on cell cycle progression in a syngeneic rat prostate tumour model. *International Journal of Radiation Biology* 2006;82(3):191-196.
 172. Isaacs JT, Wake N, Coffey DS, Sandberg AA. Genetic instability coupled to clonal selection as a mechanism for tumor progression in the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. *Cancer Research* 1982;42(6):2353-2371.
 173. Wake N, Isaacs J, Sandberg AA. Chromosomal changes associated with progression of the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. *Cancer Research* 1982;42(10):4131-4142.
 174. Zhao D, Ran S, Constantinescu A, Hahn EW, Mason RP. Tumor oxygen dynamics: correlation of in vivo MRI with histological findings. *Neoplasia* 2003;5(4):308-318.
 175. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer* 2008;8(3):180-192.
 176. Alqawi O, Wang HP, Espiritu M, Singh G. Chronic hypoxia promotes an aggressive phenotype in rat prostate cancer cells. *Free radical research* 2007;41(7):788-797.
 177. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of Cell Science* 2004;117(Pt 16):3539-3545.
 178. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research* 2005;65(23):10946-10951.
 179. Patrawala L, Calhoun-Davis T, Schneider-Broussard R, Tang DG. Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Research* 2007;67(14):6796-6805.
 180. Rybak AP, He L, Kapoor A, Cutz JC, Tang D. Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1813(5):683-694.
 181. Mukherjee S, Richardson AM, Rodriguez-Canales J, Ylaya K, Erickson HS, Player A, Kawasaki ES, Pinto PA, Choyke PL, Merino MJ, Albert PS, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR. Identification of EpCAM as a molecular target of prostate cancer stroma. *The American Journal of Pathology* 2009;175(6):2277-2287.
 182. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PloS One* 2009;4(10):e7475.
-

183. Masunaga S, Ando K, Uzawa A, Hirayama R, Furusawa Y, Koike S, Ono K. Responses of total and quiescent cell populations in solid tumors to carbon ion beam irradiation (290 MeV/u) in vivo. *Radiation Medicine* 2008;26(5):270-277.
 184. Masunaga S, Ando K, Uzawa A, Hirayama R, Furusawa Y, Koike S, Ono K. The radiosensitivity of total and quiescent cell populations in solid tumors to 290 MeV/u carbon ion beam irradiation in vivo. *Acta Oncol* 2008;47(6):1087-1093.
 185. Cho YM, Kim YS, Kang MJ, Farrar WL, Hurt EM. Long-term recovery of irradiated prostate cancer increases cancer stem cells. *The Prostate* 2012;72(16):1746-1756.
 186. Ghisolfi L, Keates AC, Hu X, Lee DK, Li CJ. Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLoS One* 2012;7(8):e43628.
 187. Wang L, Huang X, Zheng X, Wang X, Li S, Zhang L, Yang Z, Xia Z. Enrichment of prostate cancer stem-like cells from human prostate cancer cell lines by culture in serum-free medium and chemoradiotherapy. *International Journal of Biological Sciences* 2013;9(5):472-479.
 188. Mack JT, Brown CB, Tew KD. ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2008;12(4):491-504.
 189. Locke JA, Wasan KM, Nelson CC, Guns ES, Leon CG. Androgen-mediated cholesterol metabolism in LNCaP and PC-3 cell lines is regulated through two different isoforms of acyl-coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase (ACAT). *The Prostate* 2008;68(1):20-33.
 190. Saftig P, Reiss K. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *European Journal of Cell Biology* 2011;90(6-7):527-535.
 191. Da YJ, Yuan WD, Zhu LF, Chen ZL. Synthesis, anti-hypertensive effect of a novel angiotensin II AT1 receptor antagonist and its anti-tumor activity in prostate cancer. *Arzneimittel-Forschung* 2012;62(12):637-643.
 192. Stanchi F, Corso V, Scannapieco P, Ievolella C, Negrisolo E, Tiso N, Lanfranchi G, Valle G. TUBA8: A new tissue-specific isoform of alpha-tubulin that is highly conserved in human and mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;270(3):1111-1118.
 193. Bai SW, Herrera-Abreu MT, Rohn JL, Racine V, Tajadura V, Suryavanshi N, Bechtel S, Wiemann S, Baum B, Ridley AJ. Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biology* 2011;9:54.
 194. Ten Klooster JP, Evers EE, Janssen L, Machesky LM, Michiels F, Hordijk P, Collard JG. Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *The Biochemical Journal* 2006;397(1):39-45.
 195. Fillon M. Biomarkers and prostate cancer progression. *Journal of the National Cancer Institute* 2011;103(21):1570-1571.
-

196. Lin DW, FitzGerald LM, Fu R, Kwon EM, Zheng SL, Kolb S, Wiklund F, Stattin P, Isaacs WB, Xu J, Ostrander EA, Feng Z, Gronberg H, Stanford JL. Genetic variants in the LEPR, CRY1, RNASEL, IL4, and ARVCF genes are prognostic markers of prostate cancer-specific mortality. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2011;20(9):1928-1936.
 197. Barclay WW, Axanova LS, Chen W, Romero L, Maund SL, Soker S, Lees CJ, Cramer SD. Characterization of adult prostatic progenitor/stem cells exhibiting self-renewal and multilineage differentiation. *Stem Cells* 2008;26(3):600-610.
 198. Martinez-Zaguilan R, Raghunand N, Lynch RM, Bellamy W, Martinez GM, Rojas B, Smith D, Dalton WS, Gillies RJ. pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochemical Pharmacology* 1999;57(9):1037-1046.
 199. Niermann KJ, Moretti L, Giacalone NJ, Sun Y, Schleicher SM, Kopsombut P, Mitchell LR, Kim KW, Lu B. Enhanced radiosensitivity of androgen-resistant prostate cancer: AZD1152-mediated Aurora kinase B inhibition. *Radiation Research* 2011;175(4):444-451.
 200. Radhakrishnan P, Chachadi V, Lin MF, Singh R, Kannagi R, Cheng PW. TNFalpha enhances the motility and invasiveness of prostatic cancer cells by stimulating the expression of selective glycosyl- and sulfotransferase genes involved in the synthesis of selectin ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011;409(3):436-441.
 201. Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Current Oncology Reports* 2012;14(2):120-128.
 202. Hu XD, Meng QH, Xu JY, Jiao Y, Ge CM, Jacob A, Wang P, Rosen EM, Fan S. BTG2 is an LXXLL-dependent co-repressor for androgen receptor transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011;404(4):903-909.
 203. Kneitz B, Kuhn D, Schweinfurth P, Strobel P, Gerharz EW, Riedmiller H. [Aberrant expression of "spindle-checkpoint genes" in tumors of the prostate]. *Der Urologe Ausg A* 2007;46(9):1120.
 204. Reis ST, Timoszczuk LS, Pontes-Junior J, Viana N, Silva IA, Dip N, Srougi M, Leite KR. The role of micro RNAs let7c, 100 and 218 expression and their target RAS, C-MYC, BUB1, RB, SMARCA5, LAMB3 and Ki-67 in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68(5):652-657.
 205. Kudo T, Sato T, Hagiwara K, Kozuma Y, Yamaguchi T, Ikehara Y, Hamada M, Matsumoto K, Ema M, Murata S, Ohkohchi N, Narimatsu H, Takahashi S. C1galt1-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. *Blood* 2013;122(9):1649-1657.
 206. Verone AR, Duncan K, Godoy A, Yadav N, Bakin A, Koochekpour S, Jin JP, Heemers HV. Androgen-responsive Serum Response Factor target genes regulate prostate cancer cell migration. *Carcinogenesis* 2013;34(8):1737-1746.
-

207. Tang J, Hu G, Hanai J, Yadlapalli G, Lin Y, Zhang B, Galloway J, Bahary N, Sinha S, Thisse B, Thisse C, Jin JP, Zon LI, Sukhatme VP. A critical role for calponin 2 in vascular development. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(10):6664-6672.
 208. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature Immunology* 2009;10(3):241-247.
 209. Shimizu A, Nishida J, Ueoka Y, Kato K, Hachiya T, Kuriaki Y, Wake N. CyclinG contributes to G2/M arrest of cells in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;242(3):529-533.
 210. Hasegawa M, Hagiwara S, Sato T, Jijiwa M, Murakumo Y, Maeda M, Moritani S, Ichihara S, Takahashi M. CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary, and lacrimal glands and prostate basal cells. *Pathology International* 2007;57(5):245-250.
 211. Wu WJ, Hu KS, Wang DS, Zeng ZL, Zhang DS, Chen DL, Bai L, Xu RH. CDC20 overexpression predicts a poor prognosis for patients with colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* 2013;11:142.
 212. Uchida F, Uzawa K, Kasamatsu A, Takatori H, Sakamoto Y, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Tanzawa H. Overexpression of CDCA2 in human squamous cell carcinoma: correlation with prevention of G1 phase arrest and apoptosis. *PloS One* 2013;8(2):e56381.
 213. Hsu FN, Chen MC, Lin KC, Peng YT, Li PC, Lin E, Chiang MC, Hsieh JT, Lin H. Cyclin-dependent kinase 5 modulates STAT3 and androgen receptor activation through phosphorylation of Ser727 on STAT3 in prostate cancer cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2013.
 214. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Development* 1997;11(7):847-862.
 215. Liao H, Winkfein RJ, Mack G, Rattner JB, Yen TJ. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *The Journal of Cell Biology* 1995;130(3):507-518.
 216. Xiao D, Yang D, Guo L, Lu W, Charpentier M, Yan B. Regulation of carboxylesterase-2 expression by p53 family proteins and enhanced anti-cancer activities among 5-fluorouracil, irinotecan and doxazolidine prodrug. *British Journal of Pharmacology* 2013;168(8):1989-1999.
 217. Chen R, Feng C, Xu Y. Cyclin-dependent kinase-associated protein Cks2 is associated with bladder cancer progression. *The Journal of International Medical Research* 2011;39(2):533-540.
 218. Shi Y, Suh YH, Milstein AD, Isozaki K, Schmid SM, Roche KW, Nicoll RA. Functional comparison of the effects of TARPs and cornichons on AMPA receptor trafficking and gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(37):16315-16319.
-

219. Banyard J, Bao L, Hofer MD, Zurakowski D, Spivey KA, Feldman AS, Hutchinson LM, Kuefer R, Rubin MA, Zetter BR. Collagen XXIII expression is associated with prostate cancer recurrence and distant metastases. *Clinical Cancer Research* :2007;13(9): 2634-2642.
 220. Peter F, Plutner H, Zhu H, Kreis TE, Balch WE. Beta-COP is essential for transport of protein from the endoplasmic reticulum to the Golgi in vitro. *The Journal of Cell Biology* 1993;122(6):1155-1167.
 221. Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, Lee HJ, Lee HH, Hung MC. COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;399(4):498-504.
 222. Masha RT, Houreld NN, Abrahamse H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. *Photomedicine and Laser Surgery* 2013;31(2):47-53.
 223. Kast HR, Nguyen CM, Anisfeld AM, Ericsson J, Edwards PA. CTP:phosphocholine cytidyltransferase, a new sterol- and SREBP-responsive gene. *Journal of Lipid Research* 2001;42(8):1266-1272.
 224. Hatse S, De Clercq E, Balzarini J. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochemical Pharmacology* 1999;58(4):539-555.
 225. Orland MD, Anwar K, Cromley D, Chu CH, Chen L, Billheimer JT, Hussain MM, Cheng D. Acyl coenzyme A dependent retinol esterification by acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1737(1):76-82.
 226. Anderson DD, Quintero CM, Stover PJ. Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(37):15163-15168.
 227. Shah G, Brugada R, Gonzalez O, Czernuszewicz G, Gibbs RA, Bachinski L, Roberts R. The cloning, genomic organization and tissue expression profile of the human DLG5 gene: Correction. *BMC Genomics* 2002;3:14.
 228. Haenggi T, Fritschy JM. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006;63(14):1614-1631.
 229. Samant SA, Ogunkua O, Hui L, Fossella J, Pilder SH. The T complex distorter 2 candidate gene, Dnahc8, encodes at least two testis-specific axonemal dynein heavy chains that differ extensively at their amino and carboxyl termini. *Developmental Biology* 2002;250(1):24-43.
 230. Pradhan M, Esteve PO, Chin HG, Samaranayake M, Kim GD, Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry* 2008;47(38):10000-10009.
 231. Nguyen AT, Taranova O, He J, Zhang Y. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. *Blood* 2011;117(25):6912-6922.
-

232. Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, Di Stefano L, Helin K. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Research* 2005;33(17):5458-5470.
 233. Fields AP, Justilien V. The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Ect2 is an oncogene in human cancer. *Advances in Enzyme Regulation* 2010;50(1):190-200.
 234. Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *The Journal of Cell Biology* 2002;158(2):227-233.
 235. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & Development* 1997;11(1):72-82.
 236. Wilkin DJ, Kutsunai SY, Edwards PA. Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by phorbol ester. *The Journal of Biological Chemistry* 1990;265(8):4607-4614.
 237. Genot E, Daubon T, Sorrentino V, Buccione R. FGD1 as a central regulator of extracellular matrix remodelling--lessons from faciogenital dysplasia. *Journal of Cell Science* 2012;125(Pt 14):3265-3270.
 238. Cai Y, Balli D, Ustiyan V, Fulford L, Hiller A, Misetich V, Zhang Y, Paluch AM, Waltz SE, Kasper S, Kalin TV. Foxm1 expression in prostate epithelial cells is essential for prostate carcinogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2013;288(31):22527-22541.
 239. Katoh M. WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Current Drug Targets* 2008;9(7):565-570.
 240. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-related Cancer* 2006;13(4):1033-1067.
 241. Beck B, Villaume C, Debry G. Clinical aspects of GIP secretion. *Acta Diabetologica Latina* 1982;19(1):1-11.
 242. Watanabe K, Bianco C, Strizzi L, Hamada S, Mancino M, Bailly V, Mo W, Wen D, Miatkowski K, Gonzales M, Sanicola M, Seno M, Salomon DS. Growth factor induction of Cripto-1 shedding by glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D and enhancement of endothelial cell migration. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282(43):31643-31655.
 243. Pissimissis N, Papageorgiou E, Lembessis P, Armakolas A, Koutsilieris M. The glutamatergic system expression in human PC-3 and LNCaP prostate cancer cells. *Anticancer Res* 2009;29(1):371-377.
 244. Jacob Blackmon B, Dailey TA, Lianchun X, Dailey HA. Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002;407(2):196-201.
-

245. Hartman J, Lam EW, Gustafsson JA, Strom A. Hes-6, an inhibitor of Hes-1, is regulated by 17beta-estradiol and promotes breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Research : BCR* 2009;11(6):R79.
 246. Shin YJ, Kim MS, Lee J, Kang M, Jeong JH. High-mobility group box 2 (HMGB2) modulates radioresponse and is downregulated by p53 in colorectal cancer cell. *Cancer Biology & Therapy* 2013;14(3):213-221.
 247. Daugaard M, Jaattela M, Rohde M. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* 2005;4(7):877-880.
 248. Buffa L, Fuchs E, Pietropaolo M, Barr F, Solimena M. ICA69 is a novel Rab2 effector regulating ER-Golgi trafficking in insulinoma cells. *European Journal of Cell Biology* 2008;87(4):197-209.
 249. Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP. Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2006;58(2):124-145.
 250. Thomas EC, Gunter JH, Webster JA, Schieber NL, Oorschot V, Parton RG, Whitehead JP. Different characteristics and nucleotide binding properties of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) isoforms. *PLoS One* 2012;7(12):e51096.
 251. Golomb L, Bublik DR, Wilder S, Nevo R, Kiss V, Grabusic K, Volarevic S, Oren M. Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis. *Molecular Cell* 2012;45(2):222-232.
 252. Lu JG, Sun YN, Wang C, Jin de J, Liu M. Role of the alpha v-integrin subunit in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas: a clinical and in vitro investigation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266(1):89-96.
 253. Gray AT, Zhao BB, Kindler CH, Winegar BD, Mazurek MJ, Xu J, Chavez RA, Forsayeth JR, Yost CS. Volatile anesthetics activate the human tandem pore domain baseline K⁺ channel KCNK5. *Anesthesiology* 2000;92(6):1722-1730.
 254. Yan GR, Zou FY, Dang BL, Zhang Y, Yu G, Liu X, He QY. Genistein-induced mitotic arrest of gastric cancer cells by downregulating KIF20A, a proteomics study. *Proteomics* 2012;12(14):2391-2399.
 255. Gao J, Sai N, Wang C, Sheng X, Shao Q, Zhou C, Shi Y, Sun S, Qu X, Zhu C. Overexpression of chromokinesin KIF4 inhibits proliferation of human gastric carcinoma cells both in vitro and in vivo. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2011;32(1):53-61.
 256. Niwa S, Nakajima K, Miki H, Minato Y, Wang D, Hirokawa N. KIF19A is a microtubule-depolymerizing kinesin for ciliary length control. *Developmental Cell* 2012;23(6):1167-1175.
 257. Kim N, Song K. KIFC1 is essential for bipolar spindle formation and genomic stability in the primary human fibroblast IMR-90 cell. *Cell Structure and Function* 2013;38(1): 21-30.
 258. Margadant C, Kreft M, Zambruno G, Sonnenberg A. Kindlin-1 regulates integrin dynamics and adhesion turnover. *PLoS One* 2013;8(6):e65341.
-

259. Kuonen F, Laurent J, Secondini C, Lorusso G, Stehle JC, Rausch T, Faes-Van't Hull E, Bieler G, Alghisi GC, Schwendener R, Andrejevic-Blant S, Mirimanoff RO, Ruegg C. Inhibition of the Kit ligand/c-Kit axis attenuates metastasis in a mouse model mimicking local breast cancer relapse after radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 2012;18(16):4365-4374.
 260. Glinsky GV. Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway. *Cell Cycle* 2006;5(11):1208-1216.
 261. Christiansen A, Dyrskjot L. The functional role of the novel biomarker karyopherin alpha 2 (KPNA2) in cancer. *Cancer Letters* 2013;331(1):18-23.
 262. Leite KR, Mitteldorf CA, Srougi M, Dall'oglio MF, Antunes AA, Pontes J, Jr., Camara-Lopes LH. Cdx2, cytokeratin 20, thyroid transcription factor 1, and prostate-specific antigen expression in unusual subtypes of prostate cancer. *Annals of Diagnostic Pathology* 2008;12(4):260-266.
 263. Fichtenbaum EJ, Marsh WL, Jr., Zynger DL. CK5, CK5/6, and double-stains CK7/CK5 and p53/CK5 discriminate in situ vs invasive urothelial cancer in the prostate. *American Journal of Clinical Pathology* 2012;138(2):190-197.
 264. Brown LJ, Alawoki M, Crawford ME, Reida T, Sears A, Torma T, Albig AR. Lipocalin-7 is a matricellular regulator of angiogenesis. *PloS One* 2010;5(11):e13905.
 265. Manetti F. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Medicinal Research Reviews* 2012;32(5):968-998.
 266. von Thun A, Birtwistle M, Kalna G, Grindlay J, Strachan D, Kolch W, von Kriegsheim A, Norman JC. ERK2 drives tumour cell migration in three-dimensional microenvironments by suppressing expression of Rab17 and liprin-beta2. *Journal of Cell Science* 2012;125(Pt 6):1465-1477.
 267. Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997;277(5326):693-696.
 268. Nelson RB, Siman R, Iqbal MA, Potter H. Identification of a chymotrypsin-like mast cell protease in rat brain capable of generating the N-terminus of the Alzheimer amyloid beta-protein. *Journal of Neurochemistry* 1993;61(2):567-577.
 269. de Souza DA, Jr., Toso VD, Campos MR, Lara VS, Oliver C, Jamur MC. Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor progression. *PloS One* 2012;7(7):e40790.
 270. Lee SM, Kim JH, Cho EJ, Youn HD. A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress. *Cell Death and Differentiation* 2009;16(5):738-748.
-

271. Kuner R, Falth M, Pressinotti NC, Brase JC, Puig SB, Metzger J, Gade S, Schafer G, Bartsch G, Steiner E, Klocker H, Sultmann H. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. *J Mol Med* 2013;91(2): 237-248.
 272. Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics* 2004;1(6):460-464.
 273. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of Cell Biology* 1993;123(3):513-522.
 274. Abaza A, Soleilhac JM, Westendorf J, Piel M, Crevel I, Roux A, Pirolet F. M phase phosphoprotein 1 is a human plus-end-directed kinesin-related protein required for cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278(30):27844-27852.
 275. Margolis RL, Rauch CT, Pirolet F, Job D. Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *The EMBO Journal* 1990;9(12):4095-4102.
 276. Mustafa N, Martin TA, Jiang WG. Metastasis tumour suppressor-1 and the aggressiveness of prostate cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011;2(1):157-162.
 277. Regler R, Sickinger S, Schweizer M. Differential regulation of the two mRNA species of the rodent negative acute phase protein alpha 1-inhibitor 3. *FEBS Letters* 1991;282(2):368-372.
 278. Barisone GA, Ngo T, Tran M, Cortes D, Shahi MH, Nguyen TV, Perez-Lanza D, Matayasuwan W, Diaz E. Role of MXD3 in proliferation of DAOY human medulloblastoma cells. *PloS One* 2012;7(7):e38508.
 279. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, Nishimura D, Clark AF, Nystuen A, Nichols BE, Mackey DA, Ritch R, Kalenak JW, Craven ER, Sheffield VC. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997;275(5300):668-670.
 280. Butcher NJ, Minchin RF. Arylamine N-acetyltransferase 1: a novel drug target in cancer development. *Pharmacological Reviews* 2012;64(1):147-165.
 281. Zhang W, St-Gelais F, Grabner CP, Trinidad JC, Sumioka A, Morimoto-Tomita M, Kim KS, Straub C, Burlingame AL, Howe JR, Tomita S. A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors. *Neuron* 2009;61(3):385-396.
 282. Gameiro PA, Laviolette LA, Kelleher JK, Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Cofactor balance by nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) coordinates reductive carboxylation and glucose catabolism in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. *The Journal of Biological Chemistry* 2013;288(18):12967-12977.
 283. Zhu Y, Jones FE. The ErbB signaling network is coordinately expressed and activated in the mouse prostate. *The Prostate* 2004;60(1):68-75.
-

284. Yu P, Huang B, Shen M, Lau C, Chan E, Michel J, Xiong Y, Payan DG, Luo Y. p15(PAF), a novel PCNA associated factor with increased expression in tumor tissues. *Oncogene* 2001;20(4):484-489.
 285. Yokoyama M, Nishi Y, Yoshii J, Okubo K, Matsubara K. Identification and cloning of neuroblastoma-specific and nerve tissue-specific genes through compiled expression profiles. *DNA Research* 1996;3(5):311-320.
 286. Youker RT, Shinde U, Day R, Thomas G. At the crossroads of homeostasis and disease: roles of the PACS proteins in membrane traffic and apoptosis. *The Biochemical Journal* 2009;421(1):1-15.
 287. Bao BA, Lai CP, Naus CC, Morgan JR. Pannexin1 drives multicellular aggregate compaction via a signaling cascade that remodels the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 2012;287(11):8407-8416.
 288. Wang C, Yu G, Liu J, Wang J, Zhang Y, Zhang X, Zhou Z, Huang Z. Downregulation of PCDH9 predicts prognosis for patients with glioma. *Journal of Clinical Neuroscience* 2012;19(4):541-545.
 289. Burkovics P, Hajdu I, Szukacsov V, Unk I, Haracska L. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* 2009;37(13):4247-4255.
 290. Loughran G, Healy NC, Kiely PA, Huigsloot M, Kedersha NL, O'Connor R. Mystique is a new insulin-like growth factor-I-regulated PDZ-LIM domain protein that promotes cell attachment and migration and suppresses Anchorage-independent growth. *Molecular Biology of the Cell* 2005;16(4):1811-1822.
 291. Dusek RL, Bascom JL, Vogel H, Baron S, Borowsky AD, Bissell MJ, Attardi LD. Deficiency of the p53/p63 target Perp alters mammary gland homeostasis and promotes cancer. *Breast Cancer Research : BCR* 2012;14(2):R65.
 292. Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, Fukami K. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase Ialpha are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. *Cancer Science* 2010;101(7):1632-1638.
 293. Cockcroft S, Garner K. Potential role for phosphatidylinositol transfer protein (PITP) family in lipid transfer during phospholipase C signalling. *Advances in Biological Regulation* 2013.
 294. Demetriou MC, Pennington ME, Nagle RB, Cress AE. Extracellular alpha 6 integrin cleavage by urokinase-type plasminogen activator in human prostate cancer. *Experimental Cell Research* 2004;294(2):550-558.
 295. Deeraksa A, Pan J, Sha Y, Liu XD, Eissa NT, Lin SH, Yu-Lee LY. Plk1 is upregulated in androgen-insensitive prostate cancer cells and its inhibition leads to necroptosis. *Oncogene* 2013;32(24):2973-2983.
 296. Matthijs G, Schollen E, Pirard M, Budarf ML, Van Schaffingen E, Cassiman JJ. PMM (PMM1), the human homologue of SEC53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics* 1997;40(1):41-47.
-

297. Stadlbauer F, Brueckner A, Rehfuss C, Eckerskorn C, Lottspeich F, Forster V, Tseng BY, Nasheuer HP. DNA replication in vitro by recombinant DNA-polymerase-alpha-primase. *European journal of biochemistry / FEBS* 1994;222(3):781-793.
 298. Della Peruta M, Martinelli G, Moratti E, Pintani D, Vezzalini M, Mafficini A, Grafone T, Iacobucci I, Soverini S, Murineddu M, Vinante F, Tecchio C, Piras G, Gabbas A, Monne M, Sorio C. Protein tyrosine phosphatase receptor type {gamma} is a functional tumor suppressor gene specifically downregulated in chronic myeloid leukemia. *Cancer Research* 2010;70(21):8896-8906.
 299. Millar DS, Bevan D, Chitolie A, Reynaud J, Chisholm M, Kakkar VV, Cooper DN. Three novel mutations in the protein C (PROC) gene causing venous thrombosis. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international Journal in Haemostasis and Thrombosis* 1995;6(2):138-140.
 300. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of Cell Science* 2010;123(Pt 7):1007-1013.
 301. Wyatt L, Wadham C, Crocker LA, Lardelli M, Khew-Goodall Y. The protein tyrosine phosphatase Pez regulates TGFbeta, epithelial-mesenchymal transition, and organ development. *The Journal of Cell Biology* 2007;178(7):1223-1235.
 302. Bernal JA, Luna R, Espina A, Lazaro I, Ramos-Morales F, Romero F, Arias C, Silva A, Tortolero M, Pintor-Toro JA. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nature Genetics* 2002;32(2):306-311.
 303. Kawashima T, Hirose K, Satoh T, Kaneko A, Ikeda Y, Kaziro Y, Nosaka T, Kitamura T. MgcRacGAP is involved in the control of growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood* 2000;96(6):2116-2124.
 304. Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, McVey CE, Vornrhein C, Round A, Svergun DI, Donner P, Matias PM, Carrondo MA. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *Journal of Structural Biology* 2011;176(3):279-291.
 305. Suk K, Kim SY, Kim H. Essential role of caspase-11 in activation-induced cell death of rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 2002;80(2):230-238.
 306. Zunino R, Li Q, Rose SD, Romero-Benitez MM, Lejen T, Brandan NC, Trifaro JM. Expression of scinderin in megakaryoblastic leukemia cells induces differentiation, maturation, and apoptosis with release of plateletlike particles and inhibits proliferation and tumorigenesis. *Blood* 2001;98(7):2210-2219.
 307. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5XIQ5>.
 308. Owczarek S, Kiryushko D, Larsen MH, Kastrup JS, Gajhede M, Sandi C, Berezin V, Bock E, Soroka V. Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *FASEB Journal* 2010;24(4):1139-1150.
 309. Li M, Makkinje A, Damuni Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(19):11059-11062.
-

310. di Salvo ML, Contestabile R, Paiardini A, Maras B. Glycine consumption and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase in cancer cells: the heme connection. *Medical Hypotheses* 2013;80(5):633-636.
 311. Cicek MS, Koestler DC, Fridley BL, Kalli KR, Armasu SM, Larson MC, Wang C, Winham SJ, Vierkant RA, Rider DN, Block MS, Klotzle B, Konecny G, Winterhoff BJ, Hamidi H, Shridhar V, Fan JB, Visscher DW, Olson JE, Hartmann LC, Bibikova M, Chien J, Cunningham JM, Goode EL. Epigenome-wide ovarian cancer analysis identifies a methylation profile differentiating clear-cell histology with epigenetic silencing of the HERG K⁺ channel. *Human Molecular Genetics* 2013;22(15):3038-3047.
 312. Jacobs DI, Mao Y, Fu A, Kelly WK, Zhu Y. Dysregulated methylation at imprinted genes in prostate tumor tissue detected by methylation microarray. *BMC Urology* 2013;13(1):37.
 313. Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Pal D, Mitra AK. Biotin uptake by T47D breast cancer cells: functional and molecular evidence of sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT). *International Journal of Pharmaceutics* 2013;441(1-2):535-543.
 314. Yamashita A, Ito M, Takamatsu N, Shiba T. Characterization of Solt, a novel SoxLZ/Sox6 binding protein expressed in adult mouse testis. *FEBS Letters* 2000;481(2):147-151.
 315. Mack GJ, Compton DA. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(25):14434-14439.
 316. McClelland ML, Kallio MJ, Barrett-Wilt GA, Kestner CA, Shabanowitz J, Hunt DF, Gorbsky GJ, Stukenberg PT. The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Current Biology : CB* 2004;14(2):131-137.
 317. Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends in Pharmacological Sciences* 2012;33(3):122-128.
 318. Andersson S, Russell DW. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(10):3640-3644.
 319. Liang C, Xiong K, Szulwach KE, Zhang Y, Wang Z, Peng J, Fu M, Jin P, Suzuki HI, Liu Q. Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition. *The Journal of Biological Chemistry* 2013;288(1):723-736.
 320. Williams K, Ghosh R, Giridhar PV, Gu G, Case T, Belcher SM, Kasper S. Inhibition of stathmin1 accelerates the metastatic process. *Cancer Research* 2012;72(20):5407-5417.
 321. Buono M, Cosma MP. Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67(5):769-780.
-

322. Pinto FM, Pintado CO, Pennefather JN, Patak E, Candenas L. Ovarian steroids regulate tachykinin and tachykinin receptor gene expression in the mouse uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology* : RB&E 2009;7:77.
 323. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical Journal* 2009;418(3):475-489.
 324. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development* 2008;22(14):1962-1971.
 325. Zheng Q, Gao J, Li H, Guo W, Mao Q, Gao E, Zhu YQ. Trefoil factor 3 peptide regulates migration via a Twist-dependent pathway in gastric cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;438(1):6-12.
 326. Kaklamani VG, Pasche B. Role of TGF-beta in cancer and the potential for therapy and prevention. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2004;4(4):649-661.
 327. Lim J, Hotchin NA. Signalling mechanisms of the leukocyte integrin alphaMbeta2: current and future perspectives. *Biology of the Cell* 2012;104(11):631-640.
 328. Schneider P, Olson D, Tardivel A, Browning B, Lugovskoy A, Gong D, Dobles M, Hertig S, Hofmann K, Van Vlijmen H, Hsu YM, Burkly LC, Tschopp J, Zheng TS. Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278(7):5444-5454.
 329. Bruckheimer EM, Kyprianou N. Apoptosis in prostate carcinogenesis. A growth regulator and a therapeutic target. *Cell and Tissue Research* 2000;301(1):153-162.
 330. de Resende MF, Vieira S, Chinen LT, Chiappelli F, da Fonseca FP, Guimaraes GC, Soares FA, Neves I, Pagotty S, Pellionisz PA, Barkhordarian A, Brant X, Rocha RM. Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. *Journal of Translational Medicine* 2013;11:36.
 331. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282(19):14328-14336.
 332. Dodson CA, Yeoh S, Haq T, Bayliss R. A kinetic test characterizes kinase intramolecular and intermolecular autophosphorylation mechanisms. *Science Signaling* 2013;6(282):ra54.
 333. Simoneau B, Houle F, Huot J. Regulation of endothelial permeability and transendothelial migration of cancer cells by tropomyosin-1 phosphorylation. *Vascular Cell* 2012;4(1):18.
 334. Dahlman KB, Parker JS, Shamu T, Hieronymus H, Chapinski C, Carver B, Chang K, Hannon GJ, Sawyers CL. Modulators of prostate cancer cell proliferation and viability identified by short-hairpin RNA library screening. *PLoS One* 2012;7(4):e34414.
 335. Chen Z, Zhang C, Wu D, Chen H, Rorick A, Zhang X, Wang Q. Phospho-MED1-enhanced UBE2C locus looping drives castration-resistant prostate cancer growth. *The EMBO Journal* 2011;30(12):2405-2419.
-

336. Zheng M, Gu X, Zheng D, Yang Z, Li F, Zhao J, Xie Y, Ji C, Mao Y. UBE1DC1, an ubiquitin-activating enzyme, activates two different ubiquitin-like proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008;104(6):2324-2334.
 337. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Research* 2005;65(6):2162-2169.
 338. Hellborg F, Qian W, Mendez-Vidal C, Asker C, Kost-Alimova M, Wilhelm M, Imreh S, Wiman KG. Human wig-1, a p53 target gene that encodes a growth inhibitory zinc finger protein. *Oncogene* 2001;20(39):5466-5474.
 339. Hayes JD, McLeod R, Ellis EM, Pulford DJ, Ireland LS, McLellan LI, Judah DJ, Manson MM, Neal GE. Regulation of glutathione S-transferases and aldehyde reductase by chemoprotectors: studies of mechanisms responsible for inducible resistance to aflatoxin B1. *IARC Scientific Publications* 1996(139):175-187.
-

Anhang

Tab. 16: Übersicht über die Gene aus der Genexpressionsanalyse und deren Funktion. Aufgelistet sind Gene, die im HI-Tumor überexprimiert (**rot**) oder herunterreguliert (**grün**) werden sowie einer differenziellen Regulation nach ¹²C- gegenüber Photonen- RT unterliegen (**fett**). ? Funktion nicht eindeutig geklärt, ↑ Erhöhung, ↓ Erniedrigung

Gen	Genfunktion
Abca 2	Regulator der Cholesterol- und Phospholipidsynthese [188]
Acat 2	Cholesterolmetabolismus [189]
Ada	Adenosin Deaminase [154]
Adam 10	Zelladhäsion [190]
Agtr1a	Angiotensin II Rezeptor [191]
Alas 2	Hämbiosynthese [132]
Alpha-tubulin 8	Mikrotubulibestandteil [192]
Arc	Zellmigration ↑, Aktinfilamentpolymerisation [193,194]
Arvcf	Protein- Protein Interaktion [195,196]
Ataxin 1	Reprimiert Notch Signalweg [197]
Atp1a2	Natrium- Kalium- Pumpe, ATPase [133]
Atp6v1d	V-Typ Protonen- ATPase [198]
Aurkb	Mitoseregulator, wenn inhibiert, dann Radiosensitivität in PCa [199]
B4galt1	Oligosaccharidsynthese, erhöht Invasivität [200]
Bbc 3	PUMA, Apoptoseregulator [147]
Birc 5	Survivin, Apoptoseinhibitor, Proliferation ↑, Invasion ↑ [201]
Btg 2	Korepressor für Androgenrezeptortranskription, ↓ EMT ↑ [145,202]
Bub 1	Mitose ↑, Spindelcheckpoint [203,204]
C1galt1 c1	Chaperon für T-Antigen, Immunsystemkomponente [205]
C2ta	Reguliert MHC II Transkription [125]
Calponin-2	Aktivität ↑ in Aktin-reichen Geweben [206,207]
Card 11	T-Zellaktivierung über TCR, NFκB- Aktivierung [127]
Casp 1	Immunsystem, Interleukinausschüttung [208]
Casp 3	Immunsystem, aktiviert Caspase 6, 7, 9 [141]
Ccng 1	G ₂ /M- Arrest vor DNA- Reparatur [209]

Cd 109	Reguliert TGFβ1R ↓, Marker für Prostatabasalzellen [146,210]
Cdc 20	Anaphase Promoting Complex, Bub1- Interaktion, Prognose ↓ [211]
Cdca 2	Zellzyklus ↑, Apoptose ↓ [212]
Cdh 17	Cadherin 17, Zelladhäsion [129]
Cdk 5	Zellzyklusarrest, Differenzierung, Apoptose, STAT- Aktivierung [213]
Cdkn1a	P21, p53- Interaktion, Zellzyklusarrest, DNA- Reparatur [214]
Cenpf	Centromerprotein F, Zellzyklusprogression [215]
Ces 2	Detoxifizierung, über p53 reguliert [216]
Cgref 1	Von p53 induziert, Zell- Zell- Interaktion [151]
Cks 2	Cyclin-abhängige Kinase, Krebsprogression ↑ [217]
Cnih 2	Zell- Zell- Interaktion [218]
Col23a1	Kollagen, Zell- Zell- Interaktion, Metastassen ↑, Rezidive ↑ [219]
Copb1	Golgitransport [220]
Copg	Golgitransport [221]
Cox6b2	Cytochrom c Oxidase, Elektronentransportkette [222]
Ctps	Purinstoffwechsel, Phosphatidylcholin-Biosynthese [223,224]
Dgat 2	Fettsäuresynthese [225]
Dhfr	Dihydrofolatreduktase, Purinbiosynthese [226]
Disc large protein P-dlg	Zell- Zellkontakt [227]
Dmd	Dystrophin, Zellkontakt über F-Aktin [228]
Dnah8	Dyneinfilament [229]
Dnase 1/3	Blockiert Aktinpolymerisation, Apoptose ↑ [130]
Dnmt 1	Methyliert hemimethylierte DNA [230]
DOT1L	H3- Methyltransferase, DNA- Reparatur [231]
E2f8	Transkriptionsfaktor, in Angiogenese involviert [232]
Ect 2	Austauschfaktor für Rho- GTPasen, Zellzyklus ↑ [233]
Enpep	Aminopeptidase A, Angiogenese, Metastasierung [136]
Enpp2	Autotaxin, erhöht Tumorzellmotilität [234]
Epas 1	HIF2α, Transkriptionsfaktor VEGF ↑ [235]
Ephx1	Epoxidhydrolase, Cholesterolsynthese, Differenzierung [152]

Fdps	Farnesylpyrophosphatsynthase, Metabolismus [236]
Fgd 1	Rho- GTPase Faktor, extrazelluläre Matrix Reorganisation [237]
Foxm 1	Transkriptionsfaktor, Zellzyklus ↑, PCa- Progression [238]
Fscn 2	Aktinbindung, Invasion ↑, Metastasierung ↑ [153]
Fzd 9	Wnt- Signalweg Rezeptor, Zelladhäsion [239]
Gabrp	GABA-Rezeptor, Marker für gestreuten Brustkrebs [240]
Gdf 15	Zytokin der TGFβ- Familie [155]
Gip	Stimuliert Insulinsekretion [241]
Gpld 1	Hydrolisiert GPI-Anker, Zellmigration [242]
Gria 3	Glutamatrezeptor, Blockierung inhibiert PCa- Wachstum [243]
Hbb	Hämoglobin β- Untereinheit; O₂- Versorgung [131]
Hebp 1	Häm- bindendes Protein [244]
Hes 6	Transkriptionsfaktor, Zelldifferenzierung, Proliferation ↑ [245]
Hmgb 2	Knockdown macht Zellen radiosensitiver [246]
Hspa 2	Chaperon, Tumorüberleben ↑, Proliferation ↑ [247]
Ica 1	ER- Golgi- Transport [248]
Icam 1	Zelladhäsion, Migration ↑ [157]
Igf1r	Insulin- like growth factor 1 Rezeptor , PI3K- Signalweg [249]
Impdh 1	Guaninbiosynthese, Tumorwachstum? [250]
Ipo7	Importin (Nukleärer Import), negativ reguliert von p53 [251]
Itgav	Integrin, Rezeptor für Fibronectin, MMP-2..., Angiogenese ↑ [252]
Kcnk 4	Kaliumkanal [253]
Kif 22	Spindelformierung, Mitose [254]
Kif 4	Kernspindelapparat, Tumorbildung bei Knockdown [255]
Kif 19a	Spindelformierung, Mitose [256]
Kifc 1	Motorprotein Kernspindelapparat [257]
Kindlin 1	Zelladhäsion, aktiviert Integrine [258]
Kitl	Proliferation, Stammzellerhaltung, Metastasierung ↑ [259]
Kntc 2	Kernspindelapparat, Zellzyklus [260]
Kpna 2	Nukleärer Protein Import, als Biomarker im Gespräch [261]

Krt 20	Intermediärfilament, Struktur von Epithel, rar in PCa [262]
Krt 7	Intermediärfilament [263]
Lcn 7	Zelladhäsion, Angiogenese [264]
Lig 4	DNA- Ligase , NHEJ [150]
Limk 2	Kinase in Zellzyklus, Migration, regulieren Rho-GTPase [265]
Liprin beta 2	Zelladhäsion, runter reguliert von Adrogenen [266]
Map3k6	Signaltransduktion, aktiviert JNK, VEGF ↑, Angiogenese ↑ [140]
Mapk8ip	Signaltransduktion, inhibiert JNK [267]
Mcpt 1	Mastzellprotease, Degradierung extrazellulärer Matirx [268]
Mcpt 2	Mastzellprotease, Angiogenese, Mastzellreifung [269]
Mcpt 8	Mastzellprotease, Angiogenese, Mastzellreifung [269]
Mdh 1	Zitratzyklus, Glukoneogenese [270]
Melk	Zellzyklusregulation, Apoptose, maligne PCa ↑ [271]
Mgst 3	Gluthation- S- Transferase, Funktion nicht näher bekannt [272]
MHC class II	Immunantwort [124]
Mki 67	Zellproliferation [273]
Mmp 11	Tumorprogression, Invasion [137]
Mphosph 1	Motorprotein, Kernspindelapparat [274]
Mtap 6	Mikrotubulistabilisierung, Spindelapparat [275]
Mtss 1	Metastasierung, Aktin Reorganisation [276]
Mug 1	Komplementfaktor, Immunsystem [277]
Mxd 3	Antagonist zu Myc, genaue Funktion unklar [278]
Myoc	Leucin-Zipper, Ursache für Glaucom [279]
Nat 1	Detoxifikation, Hochregulation führt zu ↑ Krebsüberleben [280]
Neto 2	Extravasation, Metastasierung, VEGF- Signalweg [281]
Nkrp1f	Aktiviert NK- Zellen, regt Proliferation von T- Zellen an [128]
Nnt	ROS Detoxifikation, Glukosemetabolismus, Zitratsäurezyklus [282]
Nrg 1	Differenzierung von Epithel und Neuronen [283]
Ns5atp9	PCNA- assoziierter Faktor, Proliferation, DNA- Reparatur [284]
Olfm 1	Mit Gria3 assoziiert, Glutamatrezeptor [285]

Pacs 1	Trans- Golgi- Netzwerk, Homöostase, Apoptose [286]
Panx 1	Gap Junctions, Aktin Reorganisation [287]
Pcdh 9	Zelladhäsion, Protocadherin 9 [288]
Pcna	DNA- Replikation ↑, DNA- Reparatur (DDR) [289]
Pcyt 2	Phospholipid- Biosynthese [143]
Pdlim 2	Zelladhäsion, Migration [290]
PERP	P53- Effektorgen [291]
Pi5k	U.a. in Degradation von extrazellulärer Matrix involviert [292]
Pias 3	Ubiquitinligase, inhibiert STAT3 Signalweg, Apoptose ↑ [149]
Pitpnm 3	Phosphatidylcholin- Transporter, Metastasierung? [293]
Plat	Spaltet Plasminogen in Plasmin, Invasion ↑ [294]
Plk 1	APC-Komplex, Zellzyklus ↑, phosphoryliert Kif 20, Bub 1, FOXM1; hochreguliert in Hormon-unabhängigen PCa [295]
Pmm 1	Mannose- Biosynthese, Krebs-Assoziation unbekannt [296]
Prim 1	DNA Primase, DNA- Replikation [297]
Prkcz	PI3K- Signalweg, aktiviert AKT, Zellmotilität ↑ [298]
Proc	Serinprotease in Blutkoagulation, nicht Krebs-assoziert [299]
Ptgs 1	Prostaglandin- Synthase, Proliferation, PCa- Progression [135]
Ptk 2	Migration, Adhäsion, Proliferation, Apoptose, PI3K/AKT ↑ [300]
Ptpn 14	Lymphangiogenese, Zelladhäsion, reguliert TGFβ [301]
Pttg 1	P53- Signalweg, Apoptose, DNA- Reparatur ↑ [302]
Racgap 1	Rho-GTPase, Zellwachstum, Differenzierung [303]
Ruvbl 1	Apoptose, DNA- Reparatur, DNA- Helikase [304]
SCAF 11	Alternatives Splicing, Zelltod [305]
Scin	Aktinfilament- Stabilisierung, Zytoskelett- Organisation [306]
Sdad1	Aktin Zytoskelett- Organisation Ribosomenbiosynthese [307]
Sdfr 1	Zelladhäsion [308]
Set beta isoform	Multitasking u.a. anti- apoptotisch [309]
Shmt 1	Serin- und Glycinbiosynthese, Proliferation? [310]
Slc16a11	Glukose- Transporter [311]
Slc22a18	Tumorsuppressor- Gen [312]

Slc5a6	Natrium-, Biotin- und Lipoat- Transport [313]
Smarcd 3	Aktiviert EMT über Wnt- Signalweg [144]
SOLT	Centrosomen, Mitose [314]
Spag 5	Mikrotubuli-Kinetochor-Assoziation [315]
Spbc 24	Stabilisierendes Kinetochorprotein [316]
Src	Multitasking, Adhäsion, STAT3- Signalweg, EGFR ↑ [317]
Srd5a1	Umwandlung von Testosteron in 5- α -Dihydrotestosteron [318]
Ssb	Stabilisiert prä-miRNA [319]
Stmn 1	Proliferation ↑, Metastasierung ↑, Migration ↑, EMT [320]
Sumf 1	Metabolismus [321]
Tacr 2	Aktiviert PI Ca ²⁺ second messenger System [322]
T-DSP 11	Dephosphoryliert v.a. ERK1/2 [323]
Tef-4	Proliferation ↓, Apoptose ↑ [324]
Tff 3	Fördert Migration epithelialer Zellen [325]
Tgfb1	TGF β 1- Rezeptor, Zellzyklusarrest [326]
Tiam 1	Zelladhäsion, Migration über Rho-GTP [327]
TNF receptor homolog 1	Inhibiert TRAIL- gekoppelte Apoptose [328]
Tnfrsf 14	CD270, Lymphozyten- Aktivierung [126]
Tnfrsf 6	CD95, Rezeptor für Fas-Ligand, Caspase 8 Aktivierung [329]
Top2a	PCa Proliferation ↑, Topoisomerase II, Doppelstrangbrüche [330]
Tpm 1	Bindet Aktin, Zytoskelett- Stabilisierung, Target von miR-21 [331]
Tpx 2	Spindelfaserbindung, Proliferation ↑, phosphoryliert Aurora-A [332]
Tropomyosin alpha	Aktinfilament Reorganisation, Zytoskelett- Stabilisierung [333]
Trp53inp1	Apoptose ↑, Proliferation ↓, bei ROS p53- Regulation [148]
Ttk	Proteinkinase, Mitose, verstärkt AURKB Aktivität [334]
Ube 2c	Anaphase Promoting Complex, Ubiquitinligase [335]
Ube1dc1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym, aktiviert UFM1 und SUMO2 [336]
Wfdc 2	HE4; Breitband- Proteaseinhibitor [134,337]
Wig 1	p53-Zielgen, wachstumsinhibitorisches Zinkfingerprotein [338]
Yc2	Detoxifikation [339]

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im DKFZ und der Universitätsklinik Heidelberg angefertigt. Allen, die an der Entstehung dieser Arbeit direkt oder indirekt beteiligt waren und deren Hilfe ich in Anspruch nahm, möchte ich hier an dieser Stelle recht herzlich danken.

Zu Allererst möchte ich mich herzlich bei Herr Prof. Dr. rer. nat. Andreas Trumpp und Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Debus für Ihre Tätigkeit als Erstgutachter bzw. Zweitgutachter bedanken.

Frau Prof. Dr. Karin Müller-Decker und Herrn Prof. Dr. Michael Boutros danke ich für die Bereitschaft, als Prüfer dieser Dissertation zu agieren.

Maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren Dr. Peter Peschke und Prof. Dr. Christian Karger, die die Betreuung dieser Arbeit übernommen haben. Sie waren zu äußerst fruchtbaren Diskussionen bereit und standen mir mit guten Ratschlägen und praktischer Hilfe bei allen auftretenden Problemen zur Verfügung.

Ein großer Dank gilt Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Huber für die Möglichkeit seine Laboreinrichtungen zu benutzen.

Karina Borowski danke ich für die unzähligen Stunden beim FACS-SORT sowie Thomas Höfner für die unschätzbare Unterstützung bei MACS, FACS und Zellkulturetablierung.

Diese Arbeit fand in enger Kooperation zwischen der Abteilung Medizinische Physik in der Radioonkologie und der Klinischen Kooperationseinheit Strahlentherapie statt, deshalb bin ich allen Mitgliedern beider Arbeitsgruppen zu großem Dank verpflichtet. Weiterhin bedanken möchte ich mit bei den Technikern und den Medizinphysikern von HIT und an den LINACs im DKFZ ohne die diese Experimente niemals durchgeführt werden könnten. Ein besonderer Dank gilt v.a. Stephan Brons, Andrea Schwahofer und Peter Häring.

Ein besonders großes Dankeschön an Maria für die unzähligen Gespräche, Diskussionen, Kaffeepausen... sowie an Marina für ihre Unterstützung in der Histologie. Sonja, Annabell, Susi und Freddy, vielen Dank v.a. für die Stunden beim Sport oder anderen Freizeitaktivitäten, die dringend nötig waren.

Maria, Marina, Angela, Ramon, Tom, Jörg, Ute, Alex, Andreas danke ich für die gemeinsamen Stunden im Labor und im Tierstall, ohne Euch alle wäre es viel langweiliger gewesen! Sonja, Torsten, Ignacio, Andres, Pamela, Carine und Martina danke ich für die netten Stunden in der Kopfklinik und auf dem Weihnachtsmarkt.

Das größte Dankeschön geht an meine Familie und Freunde, ohne deren Unterstützung ich nie so weit gekommen wäre. Vielen Dank für Eure Unterstützung in jeder Lage und Eure unendliche Geduld.

Herzlichen Dank! :-)

Erklärung gemäß § 8 (3b, c) der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „*In vivo* Untersuchungen zur Wirksamkeit von Bestrahlungen mit Kohlenstoffionen am syngenem Prostatakarzinom Modell R3327“ selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Sämtliche Stellen, die wörtlich oder sinngemäß anderen Werken entnommen sind, einschließlich der Abbildungen, sind mit Quellenangaben versehen. Des Weiteren bestätige ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den

Christin Glowa
