

**„Untersuchung des Einflusses von Strahlung auf
Normalgewebszellen des humanen Brustgewebes
in vitro und *in vivo*“**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von:

Dipl.-Biol. Dajana Juerß (geb. Buttler)

geboren am 06. Januar 1985 in Kühlungsborn

Rostock, den 10. Februar 2021

Angefertigt in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Abteilung Strahlenbiologisches Labor unter Leitung von Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt.

Gutachter:

Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Südring 75, 18059 Rostock

Prof. Dr. Reinhard Schröder, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abt. Genetik, Albert-Einstein-Straße 3, 18059 Rostock

Prof. Dr. Gabriele Multhoff, Technische Universität München, Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie, Experimental Radiation Oncology, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Datum der Einreichung: 10. Februar 2021

Datum der Verteidigung: 7. Juni 2021

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- (1) **Juerß D**¹, Zwar M¹, Giesen U, Nolte R, Kriesen S, Baiocco G, Puchalska M, van Goethem MJ, Manda K, Hildebrandt G. Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells. *RadiatOncol.* 2017 Sep 25;12(1):159. doi: 10.1186/s13014-017-0895-8.

¹ Geteilte Erstautorenschaft

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis	vi
II Abbildungsverzeichnis	ix
III Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	12
1.1 Grundlagen der Karzinogenese.....	12
1.1.1 Mögliche Ursachen der Karzinogenese	12
1.1.2 Theorien zur Tumorinitiation	14
1.2 Zelluläre Entwicklung der humanen Brust und Brustkrebsrisiko	16
1.2.1 Aufbau und zelluläre Hierarchie der humanen Brust	16
1.2.2 Risikofaktoren für Brustkrebs	18
1.2.3 Exkurs-Strahlenarten und deren Unterschiede im linearen Energietransfer	19
1.2.4 Sekundäre maligne Neoplasien - besondere Risiken für Brustkrebs nach einer Radiotherapie mit Protonen	20
1.3 Bisherige Untersuchungen zur strahlenbedingten Karzinogenese - speziell zur humanen Brust.....	23
1.3.1 <i>In vitro</i> -Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Karzinogenese nach der Radiotherapie mit Photonen und Neutronen	23
1.3.2 <i>In vitro</i> -Zellkulturmodell.....	24
1.3.3 <i>In vivo</i> -Xenotransplantationsmodelle	25
1.4 Zielstellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.2 Methoden	35
2.2.1. <i>In vitro</i> -Untersuchungen	35
2.2.1.1 Zelllinien.....	35
2.2.1.2 Kryokonservierung der Fibroblastenzellen	36
2.2.1.3 Bestrahlungssetup	37
2.2.1.4 Analyse der Zellvitalität mittels WST-1	40
2.2.1.5 Untersuchung zum klonogenen Überleben.....	40
2.2.1.6 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung	41
2.2.1.7 Sphärenassay	42

2.2.1.8	Durchflusszytometrie - Expression von Oberflächenmarkern	42
2.2.1.9	Genexpressionsanalyse von <i>P53</i> , <i>P27</i> und <i>RB1</i>	43
2.2.1.10	Proteomanalyse	44
2.2.1.11	miRNA-Analyse	44
2.2.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen	45
2.2.2.1	Mausstamm und Haltung	45
2.2.2.2	Allgemeiner Operationsablauf der Transplantationen	45
2.2.2.3	Subrenal capsule assay model.....	46
2.2.2.4	Mammary fat pad model.....	47
2.2.2.5	Histologische Färbung der Paraffinschnitte	48
2.2.3	Statistik.....	50
3	Ergebnisse	51
3.1.	Einfluss von Photonenstrahlen auf Normalgewebszellen der Brust - <i>in vitro</i>	51
3.1.1	Ermittlung der Überlebensfraktion sowie der relativen biologischen Wirksamkeit	51
3.1.2	Untersuchung der Vitalität nach Bestrahlung	55
3.1.3	Analyse der Fähigkeit zur Sphärenformation	56
3.1.4	Expressionsuntersuchung von MUC-1 und EpCAM.....	57
3.1.5	Analyse der residualen DNA-Doppelstrangbrüche	58
3.1.6	Genexpressionsanalyse strahlungsrelevanter Gene	59
3.1.7	Expressionsanalyse der miRNA nach Bestrahlung	61
3.1.8	Proteomanalyse nach Bestrahlung	63
3.2.	<i>In vivo</i>-Untersuchungen zum Einfluss der unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten auf eine mögliche Karzinogenese der Normalgewebszellen der Brust.....	67
3.2.1	Testung der maximalen Lebensdauer der Versuchstiere	67
3.2.2	Etablierung der zwei Xenograftmodelle.....	68
3.2.2.1	Subrenal capsule assay	68
3.2.2.2	Mammary fat pad model.....	70
3.2.3	Vergleich und Auswahl des geeigneten Xenograftmodells.....	72
3.2.4	Hormonelle Stimulation zur Induktion einer Scheinschwangerschaft	75
3.2.5	Evaluation der <i>in vivo</i> -Ergebnisse.....	77
4	Diskussion	82
4.1	Einfluss der diversen Strahlungsqualitäten auf das Zellüberleben von Normalgewebszellen der Brust	82

4.2 Einfluss der Photonenstrahlung auf zelluläre Parameter wie Viabilität, Expression spezifischer Oberflächenmarker und Fähigkeit zur Sphärenformation..	85
4.3 Untersuchung des residualen DNA-Schadens.....	88
4.4 Einfluss der Bestrahlung auf RNA- und miRNA-Ebene	89
4.5 Einfluss der Bestrahlung auf das Proteom.....	91
4.6 Evaluation der <i>in vivo</i>-Ergebnisse	92
4.6.1 Auswahl des Xenograftmodells	93
4.6.2 Evaluation möglicher karzinogener Effekte im <i>mammary fat pad model</i>	96
5 Zusammenfassung	98
6 Ausblick.....	100
IV Literaturverzeichnis	101
V Anhang.....	110
VI Selbständigkeitserklärung.....	xi
VII Danksagung.....	xii

I Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha smooth muscle actin
γ H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX
7-AAD	7-aminoactinomycin D
AEN	Gen kodierend für <i>Apoptosis Enhancing Nuclease</i>
BRCA1/2	Genbezeichnung für <i>Breast Cancer 1/2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin (<i>engl.: bovine serum albumin</i>)
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSC	Krebsstammzelle (<i>engl.: cancer stem cell</i>)
ct	cycle threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDB2	Gen kodierend für <i>Damage Specific DNA Binding Protein 2</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>)
DSB	Doppelstrangbruch
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>engl.: epidermal growth factor</i>)
ELISA	antikörperbasiertes Nachweiseverfahren (<i>engl.: enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (<i>engl.: epithelial cell adhesion molecule</i>)
EPDR1	Ependymim related 1
ER	Estrogenrezeptor
ESI	Elektrosprayionisation
FCS	fetales Kälberserum (<i>engl.: fetal calf serum</i>)
FHL2	Four and a half LIM domain s protein 2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GADD45A	Gen kodierend für <i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha</i>

<i>GAPDH</i>	Gen kodierend für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
HCL	Salzsäure
HDR	hohe Dosisrate (<i>engl.: high dose rate</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HMF	humane Fibroblasten der Brust (<i>engl.: human mammary fibroblasts</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.: high performance liquid chromatography</i>)
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
i.p.	intraperitoneal
IQGAP3	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 3
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC MS MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LDR	niedrige Dosisrate (<i>engl.: low dose rate</i>)
LET	Linearer Energietransfer
Lgr6	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6
lncRNA	lange nicht kodierende Ribonukleinsäuren (<i>engl.: long non-coding RNA</i>)
Mad2	mitotic arrest deficient 2
MEM	Minimum Essential Media
MeV	Megaelektronenvolt
miRNA	micro Ribonukleinsäure (<i>engl.: micro ribonucleic acid</i>)
MUC-1	Mucin-1
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Dinatriumphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
<i>NOD-SCID</i>	<i>Non-Obese Diabetic- Severe Combined Immune Deficiency</i>
<i>P27</i>	Gen kodierend für Tumorprotein 27
<i>P53</i>	Gen kodierend für Tumorprotein 53
PBS	Gepufferte Phosphatlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.: polymerase chain reaction</i>)
PDX	vom Patienten stammendes Xenotransplantat (<i>engl.: patient derived xenograft</i>)
PE	Phycoerythrin
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PMMA	Polymethylmethacrylat
PR	Progesteronrezeptor
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>engl.: real-time quantitative PCR</i>)
<i>RB1</i>	Gen kodierend für Retinoblastom-Protein
RBW	Relative biologische Wirksamkeit (<i>engl.: relative biological effectiveness; RBE</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.: ribonucleic acid</i>)
SD	Standardabweichung
SMN	sekundäre maligne Neoplasie
SPF	Spezifisch-pathogen-frei (<i>engl.: specific-pathogen-free</i>)
TDLE	Terminalductus-Lobulus-Einheit (<i>engl.: terminal duct lobular unit, TDLU</i>)
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>engl.: transforming growth factor beta</i>)
<i>TP53I3</i>	Gen kodierend für <i>Tumor Protein P53 Inducible Protein 3</i>
<i>TP53INP1</i>	Gen kodierend für <i>Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UV	Ultraviolettstrahlung
WST-1	wasserlösliches Tetrazoliumsalz (<i>engl.: water-soluble tetrazoliumsalt</i>)

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Theorien zur Entstehung von malignen Tumoren.....	15
Abbildung 2: Struktur der humanen Brustdrüse.	16
Abbildung 3: Ein Modell der potentiellen Hierarchie der epithelialen Zellen der Brustdrüse... ..	18
Abbildung 4: Verteilung der absorbierten Bestrahlungsdosis und der Risiken für sekundäre maligne Neoplasien (SMN).....	21
Abbildung 5: Lebenslanges Krebsrisikos nach Neutronenexposition	22
Abbildung 6: Die Bestrahlungsaufbauten für die Photonenstrahlung mit niedriger und hoher Dosisrate.....	37
Abbildung 7: Bestrahlungsaufbauten der diversen Neutronenbestrahlungen.	39
Abbildung 8: Darstellung der murinen Brustdrüsen	47
Abbildung 9: Klonogenes Überlebens der MCF10A-Zellen nach Photonen- und Neutronenbestrahlung.	52
Abbildung 10: Klonogenes Überleben der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung	54
Abbildung 11: Untersuchung der Vitalität der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung mit zwei verschiedenen Dosisraten.	55
Abbildung 12: Sphärenformation nach Photonenbestrahlung der MCF10A-Zellen	56
Abbildung 13: Expression der Oberflächenmarker MUC-1 und EpCAM in den MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung	57
Abbildung 14: Residuale DNA-Doppelstrangbrüche der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung.....	58
Abbildung 15: Expressionsunterschiede von <i>P53</i> , <i>P27</i> und <i>RB1</i> nach Photonenbestrahlung der MCF10A-Zellen.....	59
Abbildung 16: Darstellung der in der Expression signifikant veränderten miRNA der MCF10A-Zellen 48 h und sieben Tage nach Photonenbestrahlung	61
Abbildung 17: Quantitative Darstellung der signifikant regulierten Proteine.....	63
Abbildung 18: Darstellung einer Netzwerkanalyse der signifikant hoch- oder herunterregulierten Proteine der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung.....	65
Abbildung 19: Schrittweise Darstellung des <i>subrenal capsule assay</i> an NOD-SCID-Mäusen	69
Abbildung 20: Schrittweise Darstellung des <i>mammary fat pad-model</i> an NOD-SCID-Mäusen	71
Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf für die <i>in vivo</i> -Transplantationen unter Nutzung des <i>mammary fat pad model</i> an NOD-SCID-Mäusen	73

Abbildung 22: Histologische Darstellung des juvenilen Mausegewebes der NOD-SCID-Mäuse im Bereich der Brustdrüse.....	74
Abbildung 23: Detektion der humanen Epithelzellen in den Gewebeproben der NOD-SCID-Mäusen.....	75
Abbildung 24: Zeitliche Einordnung der Scheinschwangerschaftsinduktion.....	76
Abbildung 25: Exemplarische Darstellung eines Tumorbefundes sowie immunhistologische Aufarbeitung der Proben	77
Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der pathologischen Befunde aller analysierten Gewebeproben der NOD-SCID-Mäuse nach erfolgreicher <i>mammary fat pad model</i> -Xenotransplantation für die jeweilige Strahlenqualität.....	79
Abbildung 27: Darstellung der spontanen Transformationsrate der NOD-SCID-Mäuse nach erfolgreicher <i>mammary fat pad model</i> -Xenotransplantation.....	80

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeiner Laborbedarf	28
Tabelle 2: Geräte	28
Tabelle 3: Zellen, Medien und Zusätze für die Zellkultur	30
Tabelle 4: Materialien für die Viabilitätsbestimmung	31
Tabelle 5: Materialien für den Koloniebildungstest	31
Tabelle 6: Materialien für die γ H2AX-Detektion.....	31
Tabelle 7: Materialien für die durchflusszytometrische Detektion von Oberflächenantigenen	32
Tabelle 8: Materialien für die Genexpressionsanalyse	32
Tabelle 9: Materialien für die Proteom- sowie miRNA-Analyse	33
Tabelle 10: Software	33
Tabelle 11: Versuchstiere	33
Tabelle 12: Medikamente und Lösungen für die <i>in vivo</i> Experimente.....	33
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und Geräte für die <i>in vivo</i> Experimente	34
Tabelle 14: Darstellung der relativen biologischen Wirksamkeit der verschiedenen Strahlungsqualitäten.	53
Tabelle 15: Untersuchung zum Langzeitüberleben der NOD-scid-Mäuse	67
Tabelle 16: Austestung der verschiedenen Einsaatdichten	74
Tabelle 17: Zusammenfassung aller analysierten Gewebeproben der NOD-scid Mäuse nach erfolgreicher <i>mammary fat pad model</i> -Xenotransplantation mit und ohne pathologischen Befund (Tumor, Hyperplasien oder chronische Inflammation).....	78
Tabelle 18: Pathologische Auswertung der P27-Detektion in den aufgetretenen Mammakarzinomen der NOD-scid Mäuse nach erfolgreicher <i>mammary fat pad model</i> - Xenotransplantation	81

1 Einleitung

Diese Arbeit ist auf die Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Strahlenqualitäten, insbesondere der Photonenstrahlung in zwei verschiedenen Dosisraten, auf Normalgewebszellen der humanen Brust, fokussiert. Einleitend werden die Grundlagen der Tumorentstehung sowie zwei mögliche Theorien der Tumorentstehung erläutert. Darüber hinaus werden potentielle Risiken für die Tumorentstehung in der Brust sowie Untersuchungen zur strahlungsbedingten Karzinogenese behandelt.

1.1 Grundlagen der Karzinogenese

1.1.1 Mögliche Ursachen der Karzinogenese

Die Karzinogenese beschreibt einen mehrstufigen Prozess, indem normale Zellen zu malignen Zellen bzw. Tumoren transformieren. Ausgangspunkt und charakteristisch für Tumorzellen beim Tier und beim Menschen sind hierfür genetische Veränderungen, die auch als Mutationen bezeichnet werden, diese treten in zwei Genfraktionen (Onko- und Tumorsuppressorgenen) auf. Mutationen können zur Überfunktion von Onkogenen oder zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen. Durch das komplexe Zusammenspiel von Mutationen erwerben Tumorzellen Fähigkeiten, die in fast allen Krebsarten auffindbar sind. Beispielsweise weisen maligne Zellen Veränderungen in regulatorischen Kreisläufen wie Proliferation und Homöostase auf und können dadurch wachstumsregulierende Signale unterwandern [1].

Hanahan & Weinberg (2000) postulierten erstmalig, dass das Zusammenspiel von sechs grundlegenden Veränderungen in der Zellphysiologie die Grundlage für die Karzinogenese zahlreicher Krebsvarianten bildet. Hierzu gehören die autarke Produktion von Wachstumsfaktoren, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose), die unbegrenzte Teilungsfähigkeit (Proliferation), eine anhaltende Angiogenese und schließlich die Gewebeinvasion und Metastasierung. Jedes dieser veränderten Merkmale, welche in fast allen Tumoren auffindbar sind, entspricht einem Übertreten der in gesunden Zellen fest programmierten Schutzmechanismen. Die Schutzmechanismen der Zellen sind sehr komplex; daher tritt eine maligne Transformation bis hin zum Tumor relativ selten im Laufe eines Lebens auf. Jedoch können basierend auf der genomischen Instabilität, hervorgerufen durch onkogene

Mutationen, diese Schutzmechanismen nicht vollfunktionsfähig greifen und es kann zu einer Karzinogenese führen [1]. Die Initiation einer Tumorigenese bei humanen Zellen ist sehr komplex. Experimentell gelang diese tumorigene Umstellung ohne Einsatz von chemischen und physikalischen Kanzerogenen, mit Hilfe einer induzierten Koexpression einer katalytischen Untereinheit des Telomeraseenzym und zwei zusätzlichen Onkogenen [2].

2011 ergänzten Hanahan & Weinberg, dass der Tumor nicht als abgegrenzte Masse von proliferierenden Tumorzellen betrachtet werden kann, sondern als ein komplexes Gewebe, welches aktiv mit seiner Umgebung interagiert. Das umliegende tumorassoziierte Stroma beeinflusst die Entwicklung und Ausprägung der grundlegenden erworbenen Kennzeichen eines Tumors. Zudem wurden vier neue Veränderungen als Tumormerkmal postuliert, wie das Ausweichen der Immunantwort, die Deregulation des energetischen Metabolismus, die tumorfördernde Entzündung und die Genominstabilität & Mutation [3]. Somit übernehmen alle postulierten Tumormerkmale im Rahmen der Karzinogenese und in dessen einzelnen Stufen wie der Initiation, Promotion sowie Progression des Tumors wichtige Funktionen.

Boss et al. (2014) verknüpften interessanterweise die von Hanahan & Weinberg (2011) postulierten Kennzeichen mit der Entwicklung der Radiobiologie. So dienen z. B. die für die Strahlenbiologie typischen Überlebenskurven den Untersuchungen bezüglich des Merkmals der unbegrenzten Teilungsfähigkeit. Zudem können aus nicht reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen Chromosomenschäden entstehen. Diese Instabilität im Genom bzw. DNA-Mutationen können zu einer Karzinogenese aufgrund der fehlerhaften DNA-Reparatur führen [4]. Zusammengefasst kann die genomische Instabilität nach einer Bestrahlung *in vitro* beispielsweise anhand chromosomaler Veränderungen, Verschiebungen der Ploidie, Formation von Mikrokernen, Genmutationen und –amplifikationen erfasst werden [5].

Bestrahlung kann somit einen karzinogenen Effekt haben und dadurch an der Initiation des mehrstufigen Prozesses der Karzinogenese von Zellen mitbeteiligt sein. Doch inwieweit es diesen potentiellen Effekt gibt, ist noch nicht für alle Strahlenqualitäten und den Niedrigdosisbereich der Bestrahlung (Dosen < 0,5 Gy) ausreichend untersucht worden [6]. Beispielsweise gibt es für sekundäre Neutronen kaum Daten diesbezüglich. Auch die Verwendung verschiedener Dosisraten kann einen potentiellen karzinogenen Effekt beeinflussen.

Bekannt ist, dass karzinogene Effekte eine Tumorinitiation hervorrufen können. Doch wie dieser Prozess im Detail funktioniert und welches Zusammenspiel von Faktoren im weiteren Verlauf der Karzinogenese benötigt wird, ist immer noch weitestgehend unbekannt. Ebenso

ist noch nicht eindeutig geklärt, wie die verschiedenen Subklassen von Brusttumoren entstehen, hierzu werden verschiedene Modelle diskutiert.

1.1.2 Theorien zur Tumorinitiation

Im gesunden Gewebe liegt eine zelluläre Hierarchie vor: ausgehend von sich selten teilenden Stammzellen entstehen teilungsaktivere gemeinsame Progenitorzellen. Über weitere Zellteilungen werden diese Progenitorzellen in ihrem Differenzierungspotential weiter definiert, bis schließlich die ausdifferenzierten gewebespezifischen Zelltypen entstehen. Hinsichtlich dieser zellulären Hierarchie gibt es zwei mögliche Theorien zur Tumorinitiation. Zum einen, dass sich die onkogene Mutationen in den stark teilungsfähigen gemeinsamen Progenitorzellen akkumulieren und sich daraus verschiedene Subtypen des Tumors entwickeln können, zum anderen dass die onkogenen Mutationen in verschiedenen Zelltypen auftreten und daher verschiedene Subtypen einer Tumorart entstehen können (Abbildung 1 A-B). Weiterhin wichtig ist die Unterscheidung von tumorinitiierenden und tumorvermehrenden Zellen. Denn es zeigt sich, dass die tumorinitiierenden Zellen nicht für die spätere Tumorausbreitung verantwortlich sind. Im Laufe der Tumorprogression entwickelt sich ein heterogener Zellverband, welcher Krebsstammzellen beinhaltet. Diese haben eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit und sind dadurch in der Lage die Tumorausbreitung und -vermehrung voranzutreiben (Abbildung 1 C) [7].

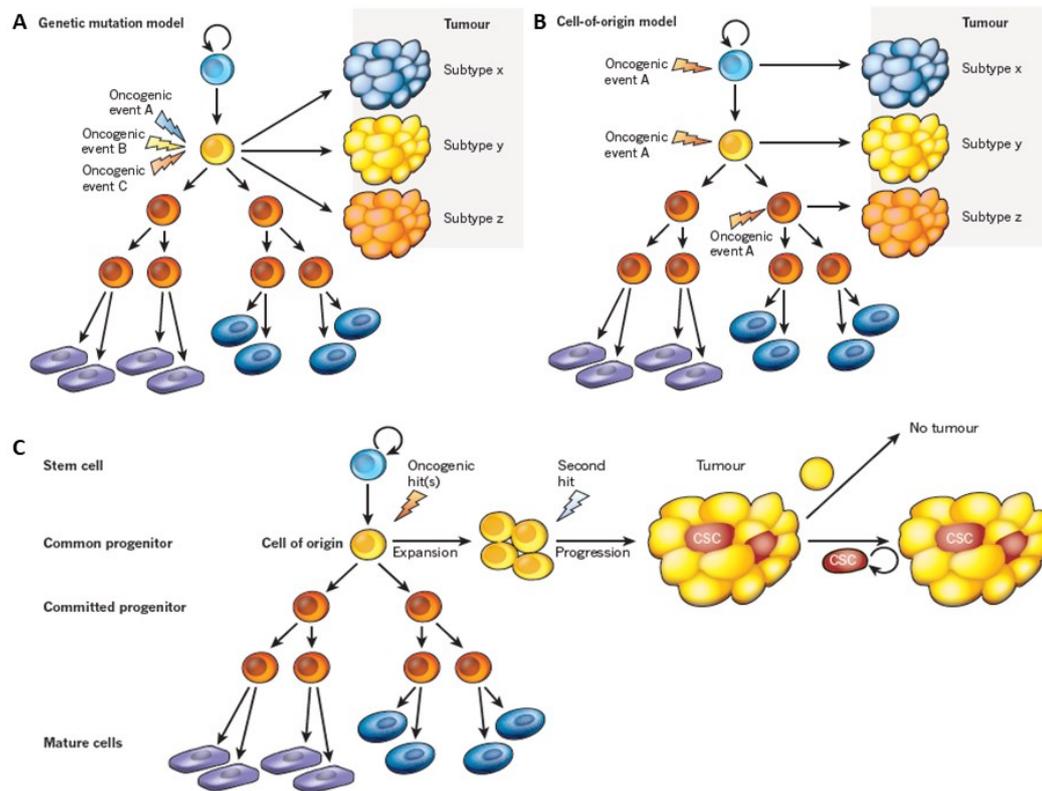


Abbildung 1: Theorien zur Entstehung von malignen Tumoren. Im gesunden Gewebe gibt es eine zelluläre Hierarchie von Stammzellen (blau), mehrere Stadien von Vorläuferzellen (gelb, orange) bis hin zu ausgereiften gewebespezifischen Zelltypen (violett, blau). Es gibt zwei mögliche Theorien zur Tumorentstehung: erstens dass sich die verschiedenen Subtypen des Tumors aus einer Zelle entwickeln (A) und zweitens dass die verschiedenen Subtypen nur aus bestimmten Zelltypen entstehen können (B). Die für die Tumorentstehung und erste Expansion verantwortlichen Zellen sind in der weiteren Tumorentwicklung allein nicht in der Lage einen Tumor auszubilden. Diese Aufgabe wird während der Tumorentwicklung von Krebsstammzellen übernommen. (CSC, *cancer stem cell*) (aus Visvader, 2011, [7])

Es ist von besonderer Bedeutung die Karzinogenese auch von der zellulären Perspektive her zu betrachten. Entstehen bestimmte Tumorsubtypen aufgrund unterschiedlicher onkogener Effekte oder dadurch dass verschiedene Zelltypen von dem onkogenen Ereignis betroffen sind? Es konnte gezeigt werden, dass das Onkogen *pik3ca* in unipotenten Zelltypen der Brust die Fähigkeit der multipotenten Differenzierung reaktiviert, dies stützt die These, dass aus einer Ursprungszelle mehrere Subtypen eines Tumors entstehen können [8]. Kontrovers hierzu, schlussfolgerte Olsson (2013) auf der Basis von epidemiologischen Daten, dass der Brustkrebsubtyp durch die Ursprungszelle, welche dem onkogenen Einfluss unterlag, determiniert ist [9]. Zu einem ähnlichen Schluss kamen auch Blaas et al. (2016), welche *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6* (Lgr6)-positive Zellen und deren Bedeutung für die Tumorentstehung in der Brust untersuchten. Lgr6-positive Zellen markieren

Stammzellen u. a. in den Geschmacksknospen und der Haut. Es konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von onkogenen Mutationen in Lgr6- positiven Zellen den Anteil an luminalen Zellen und das Auftreten von Tumoren erhöht. Die Depletion von Lgr6- positiven Zellen hingegen bewirkte eine Beeinträchtigung des Tumorwachstums. [10].

Welches Zellmodell zur Tumorentstehung relevant ist, ist bis heute noch nicht eindeutig, auch nicht speziell für Brustkrebs, nachgewiesen. Die humane Brust ist in diesem Kontext von besonderem Interesse, da sie im Laufe eines Lebens während Pubertät, Schwangerschaft und Stillzeit, wie kaum ein anderes Organ, enorme Veränderungen des Gewebes durchläuft.

1.2 Zelluläre Entwicklung der humanen Brust und Brustkrebsrisiko

1.2.1 Aufbau und zelluläre Hierarchie der humanen Brust

Die humane weibliche Brust durchläuft zahlreiche Entwicklungsstufen im Laufe eines Lebens, vor allem während der Pubertät, Schwangerschaft und Stillzeit. Sie wird auch als Mamma bezeichnet, bestehend aus der Brustdrüse (Glandula mammaria) und einem umgebenden Stroma (Abbildung 2 A). Das Stroma enthält bindegewebsartige Anteile sowie Fettgewebe. Die Brustdrüse setzt sich aus 10-20 einzelnen Drüsen, Lobus (Plural: Lobi) genannt, zusammen. Jeder Lobus verzweigt sich baumartig in zahlreiche kleine, in Gruppen angeordnete, Endstücke (Lobulus; Abbildung 2° C), endet jedoch immer mit nur einem Ausführungsgang (Abbildung 2° B) in der Brustwarze. Ein Lobulus umfasst alle Endstücke die an den gleichen Terminalductus, die letzten kleinen verzweigten Ausläufer des Gangsystems, angebunden sind. Dies stellt auch die kleinste funktionelle Einheit der Brustdrüse dar, der Lobulus zusammen mit dem Terminalductus wird als Terminalductus-Lobulus-Einheit (TDLE; engl.: *terminal duct lobular unit, TDLU*) bezeichnet.

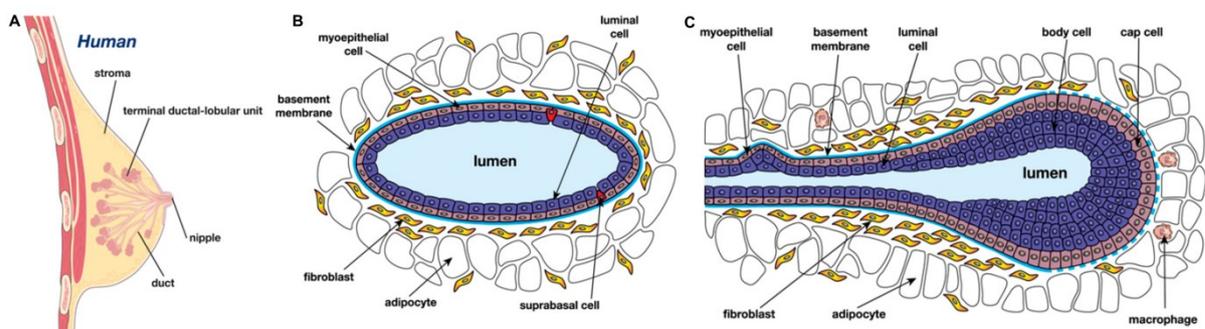


Abbildung 2: Struktur der humanen Brustdrüse. Schematische Darstellung der Brustdrüse, die einzelnen Drüsenläppchen bilden die 15-20 vorhandenen Drüsenlappen, welche über die in der Brustwarze mündenden Ausführungsgänge sekretieren können (A). Schematische Darstellung eines Ausführungsganges (B) sowie Lobulus (C) der Brustdrüse. (aus Visvader, 2009 [11])

Zwei Zelltypen innerhalb des Brustepithels sind hervorzuheben, die luminalen sowie die myoepithelialen Zellen. Die luminalen Epithelzellen liegen einschichtig unterhalb der myoepithelialen Zellen und bilden die Schleimhaut zur Auskleidung des Gangsystemes [11]; dabei weisen sie eine charakteristische Expression von MUC-1 und der Zytokeratine 18 und 19 auf [12].

Die myoepithelialen Zellen liegen direkt auf der Basallamina auf und separieren die luminalen Epithelzellen vom umliegenden Stroma. Dabei weisen sie kontraktile Eigenschaften auf, ähnlich denen der Zellen der glatten Muskulatur. Typischerweise exprimieren sie *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) und das Oberflächenantigen CD10, auch als akutes lymphoblastisches Leukämie-Antigen bekannt [13].

Mit beginnender Pubertät und der damit einhergehenden hormonellen Stimulation nimmt das umliegende Stroma zu, die Lobuli und ein gut verzweigtes Gangsystem bilden sich aus. Bei der nicht laktierenden Brust sind die einzelnen Lobuli rudimentär ausgebildet. Aufgrund der adulten Stammzellen, welche sich in den TDLE befinden, vergrößern sich die Lobuli enorm unter der hormonellen Stimulation, durch Progesteron und Prolaktin, während der Schwangerschaft und der Stillzeit. Für diese Dauer wirken Östrogene auf die Ausbildung des Gangsystems [14].

Durch dieses Vermögen große Veränderungen in der Gewebestruktur ausführen zu können, ist anzunehmen, dass innerhalb des humanen Brustepithels adulte Stammzellen vorhanden sind [15]. Allgemeingültig für Stammzellen ist, dass diese durch ihre Eigenschaft der stetigen Selbsterneuerung, identische Tochterzellen generieren. Diese Tochterzellen können sich weiter in Vorläuferzellen differenzieren, welche sich schließlich in gewebespezifische ausdifferenzierte Zelltypen entwickeln [16]. Ein mögliches Modell der hierarchischen Entwicklung der Epithelzellen der Brust ist, dass sich ausgehend von jeweils einer adulten multipotenten Stammzelle eine Tochterzelle zu einer Vorläuferzelle differenziert (Abbildung 3). Diese ist der Ausgangspunkt für alle drei differenzierten epithelialen Zelltypen (luminal, alveolär und myoepithelial). Die gemeinsame Vorläuferzelle differenziert sich weiter in spezifische Progenitorzellen, welche dann in ihrer weiteren Differenzierung festgelegt sind [15].

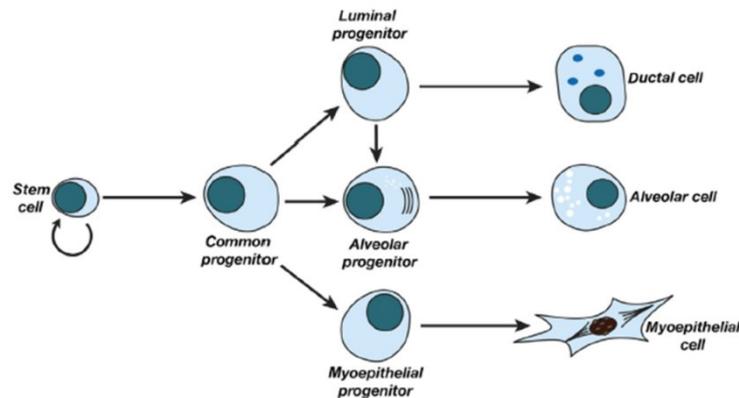


Abbildung 3: Ein Modell der potentiellen Hierarchie der epithelialen Zellen der Brustdrüse. Ausgehend von einer sich stets selbsterneuerbaren Stammzelle bilden sich die drei weiter ausdifferenzierte Vorläuferzelltypen (luminale, alveoläre und myoepitheliale Vorläuferzelle), welche in ihrem Differenzierungspotential festgelegt sind. (aus Fu et al., 2014 [15])

Die gegenwärtige Forschung hinsichtlich der Entwicklung der gesunden Brust und des Brustkrebs beschäftigt sich vor allem damit, spezifische Marker für die einzelnen Entwicklungsstufen von der Stammzelle über die diversen Progenitorstadien bis hin zu den ausdifferenzierten Zelltypen nachzuweisen. Schwierig hierbei ist, dass es nicht einen einzelnen typischen Marker gibt, sondern vielmehr ein bestimmtes Expressionsmuster bestehend aus diversen Markern für jeden Zelltyp [17–19].

Eventuell ist durch das hohe Potential zur Veränderung des humanen Brustgewebes, eben dieses besonders anfällig für Störungen durch extrinsische und intrinsische Faktoren, welche grundlegend für eine Tumorentstehung sein können. Diese Faktoren beeinflussen sehr stark das Risiko an Brustkrebs zu erkranken.

1.2.2 Risikofaktoren für Brustkrebs

Derzeit ist Brustkrebs einer der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland, in den Jahren 2013 und 2014 erkrankten etwa 70.000 Frauen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren an Brustkrebs¹. Aber auch weltweit zählt Brustkrebs zu einer der häufigsten auftretenden Krebserkrankungen: im Jahr 2012 wurden 1,67 Millionen Neuerkrankungen verzeichnet². Daher ist es von besonderer Bedeutung die Mechanismen der

¹ "Krebs in Deutschland für 2013/2014"; Zentrum für Krebsregisterdaten und Robert Koch Institut (https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html)

² <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>

Brustkrebsentstehung näher zu erforschen und zu verstehen, wodurch onkogene Mutationen ausgelöst werden können. Laut der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) sind Tabak- und Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung und ungenügend Bewegung allgemeine Risikofaktoren für eine Krebserkrankung. Grundsätzlich haben Karzinogene eine krebserzeugende oder krebsfördernde Wirkung und können in physikalische (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung), chemische (u. a. Tabakrauch, Asbest, Alkohol) und biologische (Infektionen mit z. B. Viren oder Bakterien) Karzinogene unterteilt werden.

Für Brustkrebs fassten Kaminska et al. (2015) spezifische Risikofaktoren zusammen und unterteilten diese in intrinsische und extrinsische Risikofaktoren. Zu den intrinsischen Faktoren zählen das Alter bei Diagnosestellung, mögliche Vorerkrankungen der Brustdrüse, Brustkrebskrankungen in der Familie (u. a. genetische Vorbelastung durch *BRCA1/2*), frühe Menarche, spätes Eintreten der ersten Schwangerschaft sowie in die Menopause. Diese Parameter sind unabhängig und können nicht einfach beeinflusst werden. Die extrinsischen Risikofaktoren hingegen kann jedes Individuum selbst beeinflussen. Hierzu zählen, neben den bereits weiter oben genannten Einflüssen, schlechte Ernährung, ungenügend physische Aktivität und damit einhergehend eine risikobehaftete Fettleibigkeit, sowie der Konsum von Alkohol und die Gabe einer Hormonersatztherapie in den Wechseljahren [20,21]. Die heutigen Lebensumstände, wie das spätere Einsetzen der ersten Schwangerschaft aber auch dass Frauen generell weniger Schwangerschaften während ihres Lebens austragen und zudem oft nur kurz oder gar nicht stillen, wirken sich negativ auf das Brustkrebsrisiko für Frauen aus [21]. Im besonderen Fokus dieser Arbeit stand die Strahlung als extrinsischer Risikofaktor und die Frage ob Photonen- bzw. Neutronenstrahlung eine karzinogene Wirkung auf Epithelzellen der Brust hat. Diese Fragestellung wurde durch epidemiologischen Studien aufgedeckt, da diese darauf hinweisen, dass es langfristig ein vermehrtes Auftreten von Brustkrebs als sekundäre Tumorerkrankung nach abgeschlossener Radiotherapie gibt.

1.2.3 Exkurs-Strahlenarten und deren Unterschiede im linearen Energietransfer

In der Radiotherapie wird ionisierende Strahlung eingesetzt. Diese ist gekennzeichnet durch eine örtliche Freisetzung großer Energiemengen und kann in elektromagnetische und partikuläre Strahlung unterteilt werden.

Zu den elektromagnetischen Strahlungsarten zählen Gamma- und Röntgenstrahlung. Röntgenstrahlung wird erzeugt indem beschleunigte Elektronen auf einem Zielvolumen (u. a. bestehend aus Wolfram oder Gold) abgestoppt werden und dabei geladene Röntgenphotonen entstehen. Im Gegensatz dazu repräsentieren Gammastrahlen die überschüssige Energie,

welche bei dem Zerfall eines radioaktiven Isotopes in einen stabilen Zustand entstehen [22]. Häufig werden als radioaktive Isotope Caesium-137 und Cobalt-60 in der Radiotherapie verwendet.

Zu der Partikelstrahlung werden Elektronen, Protonen, Neutronen, Schwerionen und α -Partikel gezählt. In der konventionellen Strahlentherapie werden Elektronen bereits mit Hilfe von speziellen Linearbeschleunigern eingesetzt. Die Produktion von Partikelstrahlung (Protonen, Neutronen, Schwerionen und α -Partikel) benötigt aufwendige und spezialisierte Großanlagen [22]. Daher gibt es derzeit nur sehr wenige Anlagen in Deutschland, welche die Partikelstrahlung mit Schwerionen und Protonen, im Rahmen der Strahlentherapie von Krebserkrankungen einsetzen. Neutronen, besitzen eine ähnlich große Masse wie Protonen, sind aber ungeladene Teilchen und können daher nicht beschleunigt werden. Neutronen entstehen u. a. durch die Fusion zweier Schwerionen oder wenn beispielsweise geladene Protonen stark beschleunigt werden und von einem Zielvolumen abprallen [22].

Die verschiedenen Strahlenarten unterscheiden sich bei gleicher Dosis in ihrer Wirkung. Dies beruht auf dem unterschiedlich linearen Energietransfer (LET, Angabe in keV/ μ m). Dieser beschreibt, dass aufgrund der unterschiedlichen Ionisationsdichte die durchschnittliche Energieabgabe pro Längeneinheit ($\Delta E / \Delta s$) zwischen den Strahlenarten stark variiert.

Beispielsweise wird der LET für 250-kV Röntgenstrahlen mit 2 keV/ μ m, 10-MeV Protonen mit 4,7 keV/ μ m und für 150-MeV Protonen mit 0,5 keV/ μ m beschrieben [22]. Hierbei ist eine Besonderheit zu erkennen: mit ansteigender Energie der geladenen Teilchen nimmt der LET ab, somit sind die stärker geladenen Teilchen weniger biologisch wirksam. Aufgrund des variierenden LET wird unterschiedlich viel Dosis absorbiert und daher unterscheiden sich auch die diversen Strahlenarten in ihrer relativen biologischen Wirksamkeit (RBW). Photonen weisen eine geringe Ionisationsdichte auf, in diesem Fall wirkt auch die applizierte Dosisrate (Gy/min) auf den LET bzw. die RBW ein. Dieser Effekt geht bei geladenen Teilchen, welche eine hohe Ionisationsdichte aufweisen, verloren.

1.2.4 Sekundäre maligne Neoplasien - besondere Risiken für Brustkrebs nach einer Radiotherapie mit Protonen

Anhand von epidemiologischen Analysen konnte im Rahmen der *Childhood Cancer Survivor Study* [23] gezeigt werden, dass das Risiko eines Auftretens einer späteren sekundären malignen Neoplasie (SMN) nach der Behandlung einer Krebserkrankung im Kindesalter ansteigt. Von großem Interesse ist die Tatsache, dass das Risiko an einer SMN, speziell

Brustkrebs, zu erkranken deutlich erhöht ist bei Patienten, die u. a. im Rahmen einer Therapie zum Hodgkin Lymphom in der Kindheit und im Jugendalter mit einer Radiotherapie behandelt wurden [23–27].

Durch die stetig wachsende Anzahl an Langzeitüberlebenden nach einer therapierten Krebserkrankung wird auch das Auftreten einer sekundären malignen Neoplasie (SMN) als Spätfolge einer Radiotherapie, sowohl mit Photonen als auch Protonen, diskutiert [28–32]. Newhauser & Durante (2011) fassten potentielle Risiken von Strahlenqualitäten und neuen Bestrahlungstechniken im Hinblick auf eine strahleninduzierte Karzinogenese zusammen. Sie resümierten vor allem für pädiatrische Patienten nach einer Protonentherapie, dass das Risiko an einer SMN zu erkranken und zu sterben zwar deutlich von der absorbierten Bestrahlungsdosis abhängt. Jedoch zeigen einzelne Organe, welche nicht zwingend direkt im Bestrahlungsfeld lagen, ein unterschiedliches Risiko für das Auftreten einer SMN (Abbildung 4). Zusätzlich spielen weitere Faktoren wie z. B. Geschlecht und Alter bei der Bestrahlung eine bedeutende Rolle [28].

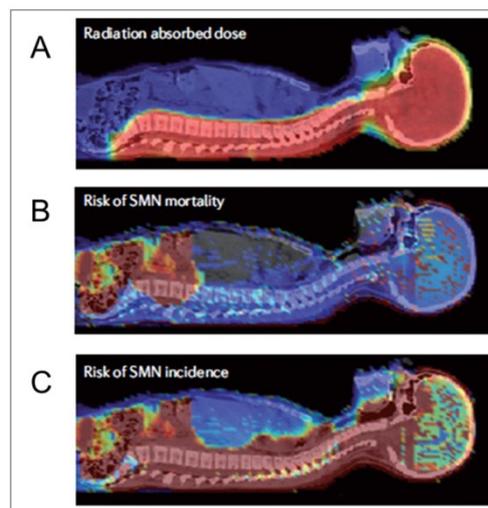


Abbildung 4: Verteilung der absorbierten Bestrahlungsdosis und der Risiken für sekundäre maligne Neoplasien (SMN). Die Grafik zeigt ein neunjähriges Mädchen, welche eine craniospinale Bestrahlung mit passiv gestreuten Protonen erhielt. Die Farbskala zeigt an wo und in welchem Maße Dosis absorbiert wurde (A). Weiterhin ist farblich illustriert, wie sich die Verteilung der Risiken an einer SMN zu sterben (B) und das Auftreten einer SMN nach der Erstbestrahlung darstellt (C). Hierbei markiert rot die Bereiche, mit der größten absorbierten Dosis und mit dem höchsten Risiko (aus Newhauser & Durante, 2012 [28]).

Vorteilhaft an der Protonentherapie ist die bessere Dosisapplikation im Zielvolumen verglichen zu der konventionellen Radiotherapie mit Photonen. Für die radiotherapeutische Behandlung ist es notwendig den Protonenstrahl zu verbreitern. Dies wird u. a. mit Hilfe von Streufohlen

ermöglicht; jedoch geht deren Einsatz mit einer unerwünschten Erzeugung sekundärer Neutronen einher. Deren Streuung geht über das Zielvolumen hinaus, wodurch auch gesunde distal gelagerte Organe von den Neutronen, welche eine potentielle hohe biologische Effektivität aufweisen, betroffen sind (Abbildung 5) [33].

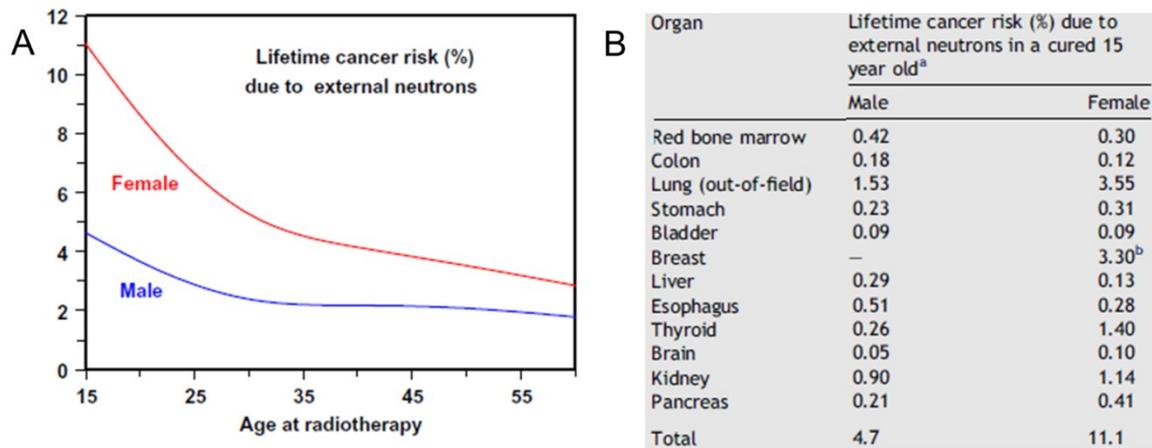


Abbildung 5: Lebenslanges Krebsrisikos nach Neutronenexposition. Darstellung des lebenslangen Krebsrisikos nach Neutronenexposition in Abhängigkeit vom Alter zum Zeitpunkt der Bestrahlung und vom Geschlecht des Patienten (A). Das Risiko für das Auftreten einer sekundären malignen Neoplasie (SMN) variiert stark zwischen den einzelnen Organen und Geschlechtern (B). aus Brenner & Hall, 2008 [33])

Speziell für die Bestrahlung mit gestreuten sekundären Neutronen im Jugendalter und bei jungen Erwachsenen ist das lebenslange Risiko an einer SMN zu erkranken deutlich erhöht. Besonders stark betroffen sind weibliche Patienten, hier weisen Brust, Schilddrüse und Lunge ein sehr deutlich erhöhtes Risiko einer SMN auf [33]. Abgesehen von den epidemiologischen Studien ist bis heute noch relativ wenig über das Induktionspotential einer SMN durch sekundär gestreute Neutronen bekannt.

Die Mechanismen, warum eine Bestrahlung langfristig möglicherweise eine sekundäre maligne Neoplasie verursachen kann, sind bis zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend ungeklärt. Eine Vielzahl von Aussagen über die Wirkung von Strahlung basiert auf epidemiologische Daten; diese geben aber keinen Aufschluss über die zellbiologischen Prozesse. Dafür gibt es bislang noch zu wenige experimentelle Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, welche sich allgemein mit der Karzinogenese und im speziellen mit der Initiation von Brusttumoren nach einer Radiotherapie mit Photonen, Protonen und Neutronen beschäftigen.

1.3 Bisherige Untersuchungen zur strahlenbedingten Karzinogenese - speziell zur humanen Brust

1.3.1 *In vitro*-Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Karzinogenese nach der Radiotherapie mit Photonen und Neutronen

Die Frage ob und unter welchen Umständen eine Bestrahlung mit Photonen oder Neutronen möglicherweise eine Karzinogenese auslöst bzw. eine prädisponierende Wirkung für eine Krebserkrankung hat, ist nach wie vor nicht ausreichend geklärt.

Aus epidemiologischen Studien von Eidemüller et al. (2009, 2011, 2015) zu schwedischen Hämangiom-Kohorten ist bereits bekannt, dass es ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Brustkrebs nach einer Radiotherapie mit Photonen gibt, hervorgerufen durch strahlungsbedingte genomische Instabilität. Die Radiotherapie der Betroffenen begann in einem sehr jungen Alter von unter zwei Jahren und die absorbierte Gesamtdosis betrug ca. 7-8 Gy, diese wurde in mehreren niedrigen Einzelfractionen appliziert [34–36]. Die Analyse einer ähnlichen französischen Kohortenstudie deutet ebenfalls auf ein erhöhtes Risiko hin an einer Krebserkrankung zu sterben als Folge einer Hämangiom-Radiotherapie (u. a. Photonen-, Beta- und Gammastrahlen) im Kindesalter [37].

Bislang gibt es nur wenige experimentelle Untersuchungen zum karzinogenen Potential von Strahlung im Niedrigdosisbereich. Dies ist vor allem im Bereich des Strahlenschutzes wichtig. Basierend auf den aktuellsten Daten stellt sich die Frage, ob für Personen die beruflich bedingt einer Strahlenexposition ausgesetzt sind, die Grenzwerte angepasst werden müssten. Bestimmte Berufsgruppen, wie Mitarbeiter der Atomindustrie aus Frankreich, England und USA; sind während ihrer Tätigkeit Strahlung ausgesetzt und zeigen ein erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen [38]. Daher wurde basierend auf diesen zwei und anderen Kohortenstudien 2011 - 2015 das Projekt EpiRadBio (FP7-Projekt Nummer 269553), finanziert durch die Europäische Union, durchgeführt. Innerhalb dieses Projektes sollten experimentelle *in vitro*-Daten zu der interzellulären Kommunikation, Apoptose, Proliferation, Differenzierung und genomischer Instabilität von Zellen, auch von Stammzellen der humanen Brust, gewonnen und anschließend zusammen mit den epidemiologischen Daten für Karzinogenesemodelle verwendet werden, welche der Bewertung größerer Kohorten dienen sollen. Aus diesem Projekt ist beispielsweise die Studie von Frenzel et al. (2017) hervorgegangen, in welcher Proben der Patienten der französischen Hämangiom-Kohorte in einer Biobank erfasst und u. a. nach der durchschnittlichen Länge der Telomere Jahrzehnte nach der Bestrahlung untersucht wurden. Es gibt Anzeichen dafür, dass die niedrigdosierte Strahlentherapie auch

Jahre nach der Behandlung einen Effekt auf die durchschnittliche Länge der Telomere in den Zellen hat [39].

Bis auf einige Studien [28,33] ist bislang nur sehr wenig über das potentielle Risiko von Bestrahlung mit Neutronen, insbesondere mit sekundär erzeugten Neutronen, im Niedrigdosenbereich bekannt. Daher wurde ein weiteres multidisziplinäres Projekt, ANDANTE (FP7- Projektnummer 295970) durch die Europäische Union gefördert, welches Untersuchungen zum relativen Risiko von Neutronen im Vergleich zu Photonen *in vitro* und *in vivo* umfasste [40]. Im Rahmen dieses Projektes wurden die in dieser Arbeit vorliegenden Daten erhoben.

Die genauen Ereignisse der frühen Karzinogenese, mit besonderem Hinblick auf die humane Brust, sind noch nicht ausreichend *in vitro* und *in vivo* bekannt. Bis jetzt wurden bereits einige *in vitro*-Aspekte wie verändertes Verhältnis luminaler und myoepithelialer Zellen, zwischen gesunden und präinvasiven Gewebeproben [41], Wechselwirkungen zwischen neoplastischem Gewebe und dem umliegenden Stroma [42], DNA-Methylierungen [43], sowie die karzinogene Wirkung vermittelt durch Bystander-Effekte nach Bestrahlung des Mikromilieus auf Tumortyp und genetische Expressionsprofil [44] und Veränderungen für den Zellzyklus wichtiger regulatorischer Proteine wie P27 und RB1 [45,46] untersucht.

Die Datenlage experimenteller Studien hinsichtlich der frühen Karzinogenese aufgrund von Strahleneinwirkung insbesondere bei Brustkrebs ist gering. Es gibt wenig Kenntnisse darüber, welche Modelle sich für *in vitro*- bzw. für *in vivo*-Untersuchungen besonders eignen, um allgemeingültige Aussagen treffen zu können. Der größte Anspruch an alle Modelle ist es, der Imitation der humanen Situation am nächsten zu kommen.

1.3.2 *In vitro*-Zellkulturmodell

Für Untersuchungen im Bereich der Brust hinsichtlich der Entwicklung der Karzinogenese werden humane nicht tumorigene Epithelzellen, welche während einer Mastektomie gewonnen werden, häufig verwendet [18,47]. Die Primärzellen weisen typische Eigenschaften des Gewebes auf, welche während einer langen Kultivierungsdauer nach der Immortalisierung verloren gehen können. Jedoch gibt es kontinuierliche Zelllinien, wie zum Beispiel die MCF10A-Zellen, die während einer Mastektomie aus gesunden Primärzellen entnommen wurden [48] und ebenfalls sehr häufig in Studien genutzt werden [49–51]. Auch das Vorhandensein einer kleinen Subpopulation von Progenitorzellen und daher eine sehr gute Imitation der natürlich vorkommenden Brustepithelzellen innerhalb der MCF10A-Zelllinie wurde von Tang et al. beschrieben [52].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es viele Studien zur Brustentwicklung und –differenzierung gibt. Eine besondere Bedeutung wird hier vor allem den Stammzellen und der Hierarchie der Ausdifferenzierung der Epithelzellen und der damit verbundenen Expression spezifischer Marker beigemessen. Denn dies ist weiterführend für die Erforschung der Entstehung der verschiedenen Typen des Brusttumors von großer Bedeutung.

Die Imitation der humanen Situation ist *in vitro* aber nur schwer umsetzbar, daher ist es von großer Wichtigkeit die strahlenbedingte Karzinogenese *in vivo* zu untersuchen, um Einflüsse des Mikromilieus mitaufzufangen. Daher sollte die potentielle karzinogene Wirkung von Photonen und Neutronen ebenfalls im Tierversuch ermittelt werden.

1.3.3 *In vivo*-Xenotransplantationsmodelle

Derzeit werden eine Vielzahl von Xenograftmodellen, beispielsweise die hetero- oder orthotope Transplantation, für die Erforschung von Krebserkrankungen genutzt [53]. Vorzugsweise werden Nagetiere, vor allem Mäuse, für die *in vivo*-Modelle verwendet. Bei einer orthotopen Transplantation stimmen die zu transplantierenden Zellen funktionell mit dem Transplantationsort überein. Im Gegensatz dazu gibt es bei der heterotopen Transplantation keine physiologische Übereinstimmung zwischen den transplantierten Zellen und dem Transplantationsort.

Für die in dieser Arbeit geplanten *in vivo*-Experimente wurden die orthotope Transplantation in das Fettgewebe der murinen Brust, [54] und die heterotope Transplantation unter die murine Nierenkapsel [55] technisch miteinander verglichen, um dann anschließend ein Modell auszuwählen. Aktuell wird die Transplantation in das murine Fettgewebe in zahlreichen Studien hinsichtlich des Brusttumors verwendet [8,10,56,57]. Die Transplantation unter die murine Nierenkapsel findet derzeit Anwendung im Rahmen der Forschung zum Prostata- [58] und Pankreaskarzinom. Hierbei wird die Vorhersagekraft, ob eine adjuvante Therapie bei einem Pankreaskarzinompatienten erfolgreich sein würde, mit Hilfe des Transplantationsverfahrens untersucht [59].

Koontz et al. (2017) beschreiben welche Vor- und Nachteile die Verwendung von Xenograftmodellen mit sich trägt, mit besonderem Hinblick auf die Radiobiologie. Beispielsweise wird die Verwendung von Mäusen als Versuchstier aber auch von transplantierten Zelllinien kritisch betrachtet, im Hinblick auf die Frage, wie gut die Experimente die humane *in vivo*-Situationen imitieren können. Im Gegensatz dazu wird die Maus als Versuchstiermodell als besonders kostengünstig und effizient im Vergleich zu anderen Tiermodellen beschrieben und daher immer eine der wichtigsten Optionen bei der Auswahl

von Tiermodellen sein. Des Weiteren werden immer häufiger Zelllinien durch humanes Patientenmaterial, als Grundlage für die Transplantate, ersetzt, um die Imitation der humanen Situation zu verbessern [60]. Jedoch wird dieses Patientenmaterial häufig aus Mammareduktionsplastiken gewonnen, daher muss bei diesen Studien auch beachtet werden, dass es spenderabhängige Effekte (z. B. Alter, Body Mass Index) geben kann und diese auch die Ergebnisse beeinflussen können. Dieser Effekt wird kaum untersucht, die Vorteile des Patientenmaterials als besseres Imitat gegenüber den Zelllinien, aufgrund von fehlender klonaler Selektion und bestehender Heterogenität, werden in der gegenwärtigen Betrachtung eher fokussiert [61]. Diese Vor- und Nachteile für die *in vivo*-Experimente beziehen sich aber nicht nur auf die Tierversuchsmodelle im Bereich der Strahlenbiologie, sie gelten auch für andere Bereiche der Forschung in der *in vivo*-Untersuchungen relevant sind.

1.4 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf die Fragestellung, ob ionisierende Strahlung im niedrigen und moderaten Dosisbereich ein kanzerogenes Potential auf humane Normalgewebszellen der Brust *in vitro* und *in vivo* besitzt. Zudem sollte auch der Effekt von unterschiedlichen Dosisraten der Photonenstrahlung näher analysiert werden. Die Untersuchungen wurden im Rahmen des EU-Projektes ANDANTE (*7th Framework Programme for Community Research*, EU Contract Number 295970) angefertigt.

Die *in vitro*-Untersuchungen analysierten zuerst wichtige Aspekte wie das klonogene Überleben und die Vitalität der Zellen nach Bestrahlungsbehandlung. Weiterhin wurde die Expression der Oberflächenproteine MUC1- und EpCAM auf Veränderungen untersucht. Im Anschluss daran sollten die Effekte der Bestrahlung auf der genomischen Ebene betrachtet werden. Hierfür wurde zunächst die Expression strahlenbiologisch relevanter Gene (*P53*, *P27* und *RB1*) analysiert. Anschließend erfolgte zudem eine Analyse der miRNAs nach Bestrahlung. Als letzter Aspekt der *in vitro*-Untersuchungen wurde eine Proteomanalyse nach Bestrahlung durchgeführt. Ziel der miRNA- und Proteomanalyse war es, potentielle Marker für eine frühe Karzinogenese zu identifizieren.

Da die Möglichkeiten der *in vitro*-Untersuchungen für die Ermittlung einer Karzinogenese begrenzt sind, sollten im weiteren Verlauf mögliche Effekte der Photonenbestrahlung *in vivo* analysiert werden. Dabei erweiterte sich das Spektrum der Bestrahlungsarten um diverse Neutronenqualitäten, da auch hier die Fragestellung eines möglichen kanzerogenen Potentials besteht. Einen besonderen Stellenwert nahm die Analyse der sekundär gestreuten Neutronen ein, da bislang keine *in vivo*-Daten hinsichtlich eines kanzerogenen Potentials im Bereich der Brust erhoben wurden. Es wurde untersucht, ob sich Tumoren nach der Bestrahlung entwickeln, mit besonderem Augenmerk darauf, ob die entstandenen Mammakarzinome ein verändertes P27-Niveau aufwiesen.

Aufgrund der gewonnenen Daten der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen sollte somit ein Beitrag zum aktuellen Kenntnisstand über die Auswirkungen von Photonenstrahlung auf humane Normalgewebszellen der Brust geleistet werden. Zudem ist diese Studie eine der ersten *in vivo*-Studien hinsichtlich der Wirkung von diversen Neutronenqualitäten, insbesondere der sekundär gestreuten Neutronen, auf humane Normalgewebszellen der Brust.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Nachfolgend werden alle, für die *in vitro*- und *in vivo*-Experimente, verwendeten Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte tabellarisch aufgeführt (Tabelle 1-13).

Tabelle 1: Allgemeiner Laborbedarf

Verbrauchsmittel	Hersteller
Kulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	TPP Techno Plastic Products AG , Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Low attachment plates (6-Wellplatten)	Corning® Costar®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten (5000 µl, 1000 µl, 100 µl, 10 µl, 2,5 µl, 1 µl Maximalvolumen) und passende Spitzen	Eppendorf AG, Hamburg
4-Kammer-Objekträger	Baack Lab, Schwerin
Deckgläser 22x50 cm	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Probenröhrchen für die Durchflusszytometrie	BeckmanCoulter, Krefeld
37 %-ige Formaldehydlösung	Merck Millipore, Darmstadt
Isoton-Lösung II	BeckmanCoulter, Krefeld
70 %-iger Ethanol (vergällt/unvergällt)	Zentralapotheke Universität Rostock

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Hersteller
Sicherheitswerkbank Hera Safe KSP	ThermoFisher Scientific GmbH, Dreieich
Brutschrank I	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank II	Varolab GmbH, Giessen

Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon GmbH, Düsseldorf
Zellzählgerät Z2 Coulter	BeckmanCoulter, Krefeld
Zentrifugen (Rotina 420R, Rotofix32a)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
UVT-B-AR, DNA/RNA UV-Reinigungsbox	Biosan, Riga, Lettland
Waage BL600	Sartorius AG, Göttingen
Feinstwaage BP61S	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer VarioMag® monotherm	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn
pH-Meter CG 841	Schott AG, Hofheim
Schüttler Gyro-rocker SSL3	Cole-Parmer, Staffordshire, United Kingdom
ELISA-Plattenreader Anthoszenyth 340r	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
7300 real time PCR System	Applied Biosystems®, Darmstadt
Trockenschrank	Schott AG, Hofheim
Tischautoklav 2540EL	Systemec GmbH, Wettenberg
BioPhotometerplus	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Kühlschränke	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
Tiefkühltruhe Ultra Flow	SANYO Component Europe GmbH, München
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Tischzentrifuge Perfect Spin Mini	VWR Life Science Competence Center, Erlangen
Vortexer	Scientific industries, Bohemia, NY USA
Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Mikroskopkamera DX40C	Kappaoptronics GmbH Gleichen
Durchflusszytometer Cytometrics 500	Beckman&Coulter, Krefeld

Tabelle 3: Zellen, Medien und Zusätze für die Zellkultur

Zellen, Medien und Zusätze	Hersteller
0,25 % Trypsin/EDTA	Biochrom GmbH, Berlin
0,05 % Trypsin/EDTA	Biochrom GmbH, Berlin
phosphatgepufferte NaCl-Lösung. (PBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
MCF10A-Zellen	Prof. Kevin Prise, Queen's University Belfast, Centre for Cancer Research and Cell Biology
Human mammary fibroblasts (HMF)	ScienCell, Provitro AG
C3H/10T1/2-Fibroblasten	ATCC, Wesel
<i>Medium für MCF10A-Zellen</i>	
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Epidermal growth factor (EGF)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Choleratoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (DMEM-F12)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
<i>Medium für HMF-Zellen</i>	
fetales Kälberserum	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA USA
Fibroblastenwachstumssupplement	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA USA
Penicillin/Streptomycin	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA USA
Fibroblastenmedium	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA USA
<i>Medium für C3H/10T1/2-Fibroblasten</i>	
hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum	Merck Millipore, Darmstadt
MEM-Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Tabelle 4: Materialien für die Viabilitätsbestimmung

Lösungen	Hersteller
Cell Proliferation Reagent WST-1	CELLPRO-RO Roche, Mannheim

Tabelle 5: Materialien für den Koloniebildungstest

Materialien	Hersteller
70 %-iger Ethanol	Zentralapotheke Universität Rostock
Kristallviolett	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Tabelle 6: Materialien für die γ H2AX-Detektion

Antikörper und Lösungen	Hersteller
anti- γ H2AX-Antikörper anti-mouse IgGab22551 (1:500)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG1 (1:400)	Molecular Probes®/Life Technologies, Darmstadt
Vectashield® Eindeckmedium mit anti-4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA USA
Triton X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ziegenserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
IMMOIL-F30CC	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Avantor™ Performance Materials, Deventer, Niederlande
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Millipore, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O)	Merck Millipore, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovine serum albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Tabelle 7: Materialien für die durchflusszytometrische Detektion von Oberflächenantigenen

Antikörper und Lösungen	Hersteller
anti-EpCAM	BD Biosciences, Heidelberg
anti-MUC-1	BD Biosciences, Heidelberg
7-AAD-Lösung	BioLegend, San Diego, CA, USA
Isotyp-Kontrolle mouse-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle mouse-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Färbepuffer (Stain Buffer)	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 8: Materialien für die Genexpressionsanalyse

Materialien	Hersteller
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren
Salzsäure 10 mol/l	Zentralapotheke der Universität Rostock
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Taq Man Assays: <i>P53</i> (Hs_01034249_m1), <i>RB1</i> (Hs_010788066_m1), <i>P27</i> (Hs_01597588_m1), <i>GAPDH</i> (Hs_02758981)	Applied Biosystems®, Darmstadt
TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG	Applied Biosystems®, Darmstadt
RNAse-freies Wasser	
RT ² Profiler™ PCR Array Human Cancer PathwayFinder™	Qiagen GmbH, Hilden
RT ² First Strand Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RT2 PCR Array Loading Reservoir	Qiagen GmbH, Hilden
Label Guard Mikroliter Messzelle 0,7-5 µl Probenvolumen	Implen GmbH, München
TaqMan® Array Human Endogenous Control	Applied Biosystems®, Darmstadt

Tabelle 9: Materialien für die Proteom- sowie miRNA-Analyse

Materialien	Hersteller
Sureprint G3 Human miRNA r21 Microarray	Agilent, Waldbronn
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller/Herkunft
Kappa Image Software	Kappaoptronics GmbH Gleichen
Cytoscape	[62]
Clue GO	[63,64]

Tabelle 11: Versuchstiere

Mausstamm	Lieferant
NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /NcrCrI	Charles River Laboratories, Sulzfeld

Tabelle 12: Medikamente und Lösungen für die *in vivo*-Experimente

Narkose-und Schmerzmittel etc.	Hersteller
Rompun™(Xylazin 2 %)	Bayer Healthcare, Berlin
Ketamin 10 %	bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta
Rimadyl® (Carprofen)	Pfizer AnimalHealth
Novaminsulfontropfen	Ratiopharm, Ulm
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bepanthen® Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und Geräte für die *in vivo*-Experimente

Verbrauchsmaterialien und Geräte	Hersteller
Matrigel, Wachstumsfaktor reduziert	BD Biosciences, Heidelberg
bovine Kollagen-Lösung (C4243)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Foliodrape® (Abdecktuch 20x30 cm)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Präparierbesteck (stumpfe Präparierschere, Irisschere, Pinzetten, Nadelhalter)	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikroinstrumente (Mikroschere, Mikro-Pinzetten)	Aesculap AG, Tuttlingen
Wattestäbchen steril, Holz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Omnifix-F Tuberkulin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Omnican-F-Spritzen 0.1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Präpariernadeln	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einwegrasierer	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
Betaisodona-Lösung	Mundipharma GmbH, Limburg
Heizmatte (16 Watt, 20x30cm)	Conrad Electronic, Hirschau
Pasteurglaspipetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Combi Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mini Spike mit Filter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Formaldehydlösung 4 % gepuffert	Grimm MED Logistik GmbH, Torgelow
Flexüle Neoflon	BD Biosciences, Heidelberg
Praxis-Kauter Set Typ 1	Bovie Medical, Clearwater, Florida, USA
Nahtmaterial Vicryl 5-0	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Natriumhydroxid/Natronlauge (NaOH) 10,0 mol/l	MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main
Hamiltonspritzen	Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
PBS - Pulver	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rotilabo® Spritzenfilter, CME, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo® Einbettkassetten für Biopsien	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylin	Applichem GmbH, Darmstadt
Absoluter Alkohol	Applichem GmbH, Darmstadt

Glycerin	Applichem GmbH, Darmstadt
Aluminium-Kaliumsulfat	Applichem GmbH, Darmstadt
Eisessig	Applichem GmbH, Darmstadt
Natriumjodat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
anti- <i>Human Nuclei</i> - Antikörper	Merck Millipore, Darmstadt
anti- <i>Östrogen Rezeptor</i> (Klon 1D5) - Antikörper	Zytomed Systems GmbH, Berlin
anti- <i>Progesteron Rezeptor</i> (Klon SP42) - Antikörper	Zytomed Systems GmbH, Berlin
anti- <i>Ki67</i> - Antikörper	Zytomed Systems GmbH, Berlin
anti- <i>Her2neu</i> (Klon 4B5) -Antikörper	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
3,3'-Diaminobenzidin(DAB) Substrate Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Citrate Buffer pH6.0	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Tris EDTA Buffer pH 9.0	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Peroxidase Block (gebrauchsfertig)	Zytomed Systems GmbH, Berlin
RbmAb anti- <i>p27 KIP1</i> - Antikörper	abcam, Cambridge, United Kingdom
Bond Polymer Refine Detection	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Bond Primary antibody Diluent	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Epitope Retrieval Solution 2	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch

2.2 Methoden

Nachfolgend werden die verwendeten *in vitro*- und *in vivo*-Experimente methodisch dargestellt.

2.2.1. *In vitro*-Untersuchungen

2.2.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Epithelzellen der humanen Brust, der nicht tumorigenen MCF10A-Zelllinie, verwendet. Es ist beschrieben, dass diese Zellen während einer Mastektomie einer 36-jährigen Frau, ohne Vorkommen bösartiger Brusttumore in der Familienanamnese, gewonnen wurden [48]. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit Hilfe von 0,05 % Trypsin/EDTA subkultiviert. Versuchsbedingt wurden die Zellen unter adhäsiven

Bedingungen (adhärente Zellkultur) oder in einer nicht adhäsiven Umgebung (als Suspensionskultur in *low-attachment* Platten) kultiviert. Für die *in vivo*-Experimente wurden zwei Fibroblastenzelllinien verwendet. Die C3H/10T1/2-Fibroblasten wurden wie vom Hersteller angegeben nur zwischen der fünften und 15. Passage verwendet. Die Subkultivierung der C3H/10T1/2-Fibroblasten erfolgte mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung. Die zweite Fibroblastenzelllinie, die humanen Fibroblasten aus der Brust (engl.: *human mammary fibroblasts*; HMF), wurden nur bis zur fünften Passage verwendet und mit Hilfe von 0.05 % Trypsin/EDTA subkultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in Begasungsbrutschränken unter Verwendung nachfolgender Medienzusammensetzung kultiviert:

MCF10A-Kulturmedium: 0,1 % Insulin
0,05 % Hydrocortison
0,01 % Choleratoxin
0,02 % EGF
5 % Pferdeserum
1 % Penicillin/Streptomycin
→ in Dulbecco's modified Eagle medium/F12

C3H/10T1/2-Kulturmedium: 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)
5 % Penicillin/Streptomycin
→ in MEM-Medium

HMF-Kulturmedium: 2 % fetales Kälberserum
1 % Fibroblastenwachstumssupplement
1 % Penicillin/Streptomycin
→ in Fibroblastenmedium

2.2.1.2 Kryokonservierung der Fibroblastenzellen

Um genügend Zellmaterial für die Experimente einsetzen zu können, wurde ein kryokonservierter Vorrat der humanen und murinen Fibroblasten, abhängig von der Transplantationsmethode, angelegt. Die zusätzlich transplantierten Fibroblasten übernehmen die Funktion ein Mikromilieu zu generieren, welches die Proliferationsfähigkeit der humanen Normalgewebszellen im Versuchstier unterstützen soll. Die Kryokonservierung war besonders für die HMF-Zellen von großer Bedeutung, da diese Zellen primäre Fibroblasten sind und

daher nur eine begrenzte Anzahl von Mitosen durchführen können. Hierfür wurden die Zellen nach Erhalt in großer Anzahl kultiviert, um anschließend genügend Ansätze der noch jungen Zellen einfrieren zu können. Für beide Fibroblastenzelllinien wurden Ansätze mit 5×10^5 Zellen in Einfriermedium (Kultivierungsmedium mit 10 % DMSO) kryokonserviert. Aufgetaute Ansätze aus dem kryokonservierten Vorrat wurden mit den entsprechenden Medien in Kulturgefäße ausgesät. Einen Tag später erfolgte ein Mediumwechsel, um das noch vorhandene toxische DMSO zu entfernen; danach erfolgte die Kultivierung der Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.3 Bestrahlungssetup

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Strahlungsarten genutzt. Die Bestrahlung der *in vitro*-Experimente erfolgte ausschließlich mit Photonenstrahlung. Für die *in vivo*-Untersuchungen wurden neben der Photonenstrahlung zusätzlich noch diverse Arten an Neutronenstrahlung eingesetzt. Um eine homogene Bestrahlung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen als Suspension in einem rotierenden Container aus bestrahlt (Abbildung 6).

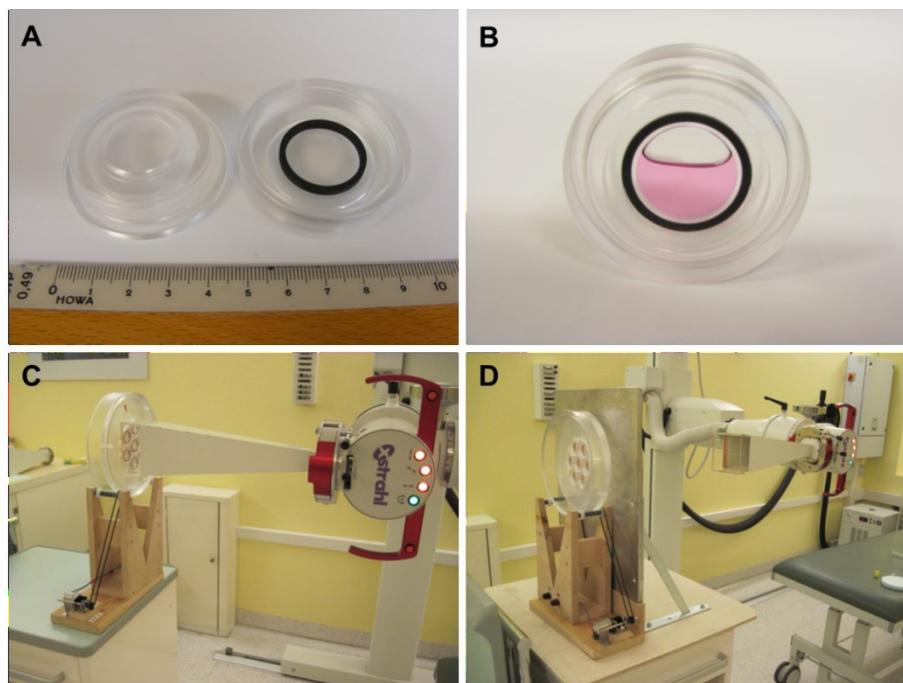


Abbildung 6: Die Bestrahlungsaufbauten für die Photonenstrahlung mit niedriger und hoher Dosisrate. (A) Zwei zusammenschraubbare Containerhälften mit Dichtungsring (schwarz). (B) Befüllter Container mit erkennbarer Luftblase. (C) Im Setup für die Bestrahlung mit hoher Dosisrate (HDR) werden sieben Container über einen Motor in Rotation gehalten und zeitgleich bestrahlt. (D) Das Setup für die Bestrahlung mit niedriger Dosisrate (LDR) wird durch ein Schild aus MCP96 (Öffnung von $10 \times 10 \text{ cm}^2$) sowie durch einen 40 cm großen Abstand zwischen Zellen und Tubus erweitert.

Maximal sieben Container, bestehend aus Polymethylmethacrylat (PMMA) konnten zeitgleich in einer aus PMMA hergestellten Halterung auf einem Holzgestell positioniert und bestrahlt werden. Jeder Container besaß einen Hohlraum, welcher 1 ml Zellsuspension fassen konnte. Der Abstand zwischen Zellen und Bestrahlungstubus betrug 1-2 mm. Die Container wurden während der Bestrahlung durch einen Motor in Rotation gehalten.

Für die Photonenstrahlung wurde das Röntgentherapiegerät *X-Strahl 200* (Xstrahl Ltd., Surrey, United Kingdom; 220 kV, gefiltert mit 1 mm Al, 0,25 mm Cu und 0,5 mm Sn) der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Rostock genutzt. Die Dosimetrie basiert auf der DIN 6809-5 für klinische Dosimetrie³, speziell für die Anwendung von Photonenstrahlung mit Röhrensparnungen von 100 bis 400 kV in der Strahlentherapie. Für die Bestrahlung mit der höheren Dosisrate (*high dose rate; HDR*) wurde eine Dosisrate von 0,37 Gy/min benutzt. Der Aufbau für die Bestrahlung mit der niedrigeren Dosisrate (*low dose rate; LDR*) wurde durch ein 12-14 mm starkes Schild aus MCP96 (spezielle Legierung bestehend aus 40 % Blei, 40 % Bismut und 20 % Zinn) mit einer 10x10 cm² Fensteröffnung ergänzt, der Abstand zwischen Tubus und Zellen auf 40 cm eingestellt und ein verminderter Röhrenstrom verwendet. Der Abstand zwischen der PMMA-Halterung und dem MCP96-Schild betrug 21-22 mm. Die verwendete Dosisrate, bedingt durch den verminderten Röhrenstrom und veränderten Aufbau, betrug 0,02 Gy/min. Es wurden Dosen von 0,1 Gy, 0,25 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, und 6 Gy appliziert. Unbestrahlte Kontrollen wurden bei allen Strahlungsarten stets mitgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die verschiedenen Zellsuspensionen in sterile 15 ml Falconröhrchen überführt und für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Die Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen sowie mit Neutronen welche ein breites Energiespektrum aufweisen, erfolgte an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig (Abbildung 7 A-B). Innerhalb eines Kollimators wurden Deuteronen mit einer Energie von 13 MeV auf ein Beryllium-Target geschossen und dabei Neutronen mit einer Energieverteilung von 0,1 bis 10 MeV freigesetzt [65]. Die mittlere Neutronenenergie betrug $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV, basierend auf den gemessenen Kerma⁴-Werten („free in air“ und bei einem Winkel von 0 Grad), welche angeben wie sich die kinetische Energie von Teilchen in einer bestimmten Materie verhält [66]. Es wurden Neutronendosen von 0,1 Gy, 0,25 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy und 2 Gy appliziert. Für die Neutronen mit breitem Energiespektrum wurden ebenfalls zwei verschiedene Dosisraten ausgewählt, die höhere Dosisrate betrug 0,1 Gy/min und die

³DIN 6809-5:1996-02 Klinische Dosimetrie - Teil 5: Anwendung von Röntgenstrahlen mit Röhrensparnungen von 100 bis 400 kV in der Strahlentherapie; DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

⁴Kerma (Kinetic Energy released per unitmass) ist definiert als die Summe initialer kinetischer Energien aller geladener Partikel freigesetzt durch vorhandene ungeladene Partikel in einer bestimmten Masse, geteilt durch diese Masse. Die Einheit von Kerma wird als Gray (Gy) bezeichnet [144].

niedrigere Dosisrate 0,003 Gy/min gewählt. Monoenergetische Neutronen mit einer Energie von 1,2 MeV (applizierte Dosisrate von 0,003 Gy/min) wurden mit Hilfe der $T(p,n)^3He^-$ Kernreaktion erzeugt, die Entstehung der monoenergetischen Neutronen mit einer Energie von 0,56 MeV (applizierte Dosisrate 0,0045 Gy/min) verlief mit Hilfe der ${}^7Li(p,n){}^7Be^-$ Kernreaktion [67,68].

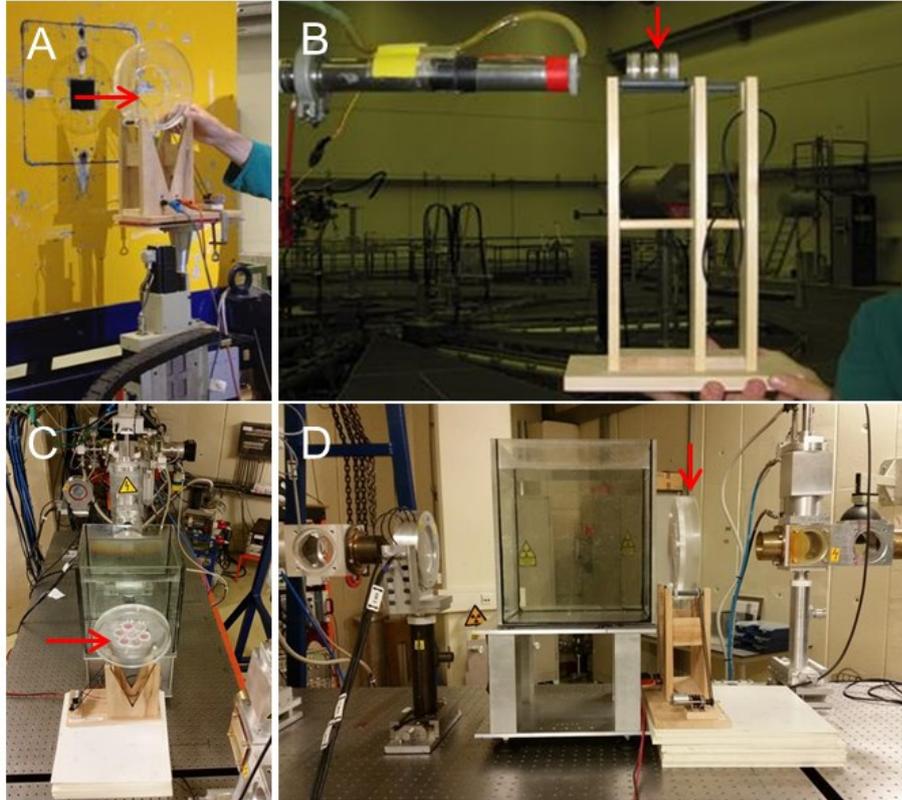


Abbildung 7: Bestrahlungsaufbauten der diversen Neutronenbestrahlungen. (A) Neutronenbestrahlung mit einem breiten Energiespektrum. (B) Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen. (C, D) Ein nicht kollimierter schmaler Strahl aus 190 MeV Protonen (Breite von 4 mm) wurde auf ein Wasserphantom (30 cm x 30 cm x 30 cm) gerichtet. Die Zellen wurden im Bereich des gemischten Feldes aus Gammastrahlen und sekundären Neutronen positioniert. Die jeweilige Position der Zellen im PMMA-Container ist farblich markiert (roter Pfeil). (zur Verfügung gestellt von Fr. Monique Zwar)

Um aber ein Neutronenspektrum zu generieren, welches der Situation einer klinischen Protonentherapie entspricht, wurde eine zusätzliche Bestrahlung am Center for Advanced Radiation Technology (KVI-CART, Groningen, Niederlande) durchgeführt. Ein nicht kollimierter schmaler Strahl aus 190 MeV Protonen (Breite von 4 mm) wurde auf ein Wasserphantom (30 cm x 30 cm x 30 cm, gefüllt mit Wasser), welches den Körper eines Patienten imitieren sollte, gerichtet (Abbildung 7C-D). Die Vorder- und Rückseite des Phantoms bestand aus 8 mm PMMA. Die Proben wurden direkt (Winkel von 0°) im

einfallenden Protonenstrahl in einem Abstand von 50 mm hinter dem Wasserphantom positioniert. Mit Hilfe des Wasserphantoms wurden die Protonen gestoppt und durch die Interaktionen mit dem Medium Wasser ein gemischtes Feld aus Gammastrahlen und sekundären Neutronen an der Position der Proben erzeugt. Die applizierten Dosen von 0,152 Gy, 0,38 Gy, 0,76 Gy und 1,52 Gy wurden mit unterschiedlichen Protonenergien generiert. Dadurch konnte eine maximale Bestrahlungsdauer von 5,5 h gewährleistet werden, welche vergleichbar mit der LDR-Bestrahlung der Neutronen mit breitem Energiespektrum am PTB war. Die Dosimetrie sowie Simulationen der verschiedenen Bestrahlungsqualitäten sind in Juerß et al. näher beschrieben [69].

2.2.1.4 Analyse der Zellvitalität mittels WST-1

Die Vitalität der Zellen wurde nach der Bestrahlung bestimmt, um mögliche Unterschiede zwischen der adhärennten und der Suspensionszellkultur sowie zwischen der kurzweiligen Hochdosisratenbestrahlung und der länger andauernden Niedrigdosisratenbestrahlung zu untersuchen. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Tetrazoliumsalzes WST-1, welches durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) zu Formazan reduziert wird. Die Vitalität wurde direkt nach der Bestrahlung bestimmt, es wurden 10 µl WST-1-Lösung pro 100 µl Medium verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgte die Messung am ELISA Plattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

2.2.1.5 Untersuchung zum klonogenen Überleben

Wie das klonogene Überleben der Zellen durch die Bestrahlung beeinflusst wird, sollte mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht werden. Hierfür wurden die MCF10A-Zellen sowohl als adhärennte als auch als Suspensionskultur bestrahlt. Anschließend wurden jeweils 1×10^3 Zellen/T₂₅-Zellkulturflasche eingesät. Die Zellen wurden für den weiteren Verlauf im Brutschrank inkubiert. Nach sieben Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach acht Tagen wurden die entstandenen Kolonien mit 70 %-igem Ethanol fixiert und anschließend mit einer 1 %-igen Kristallviolett-Lösung (5 g Kristallviolett in 500 ml Aqua dest.) gefärbt. Im Anschluss daran wurden alle Kolonien, die aus mehr als 50 Zellen bestanden, mikroskopisch ausgezählt.

2 %-ige Fixierungslösung: 70,95 ml 1xPBS
4,05 ml 37 %-ige Formaldehydlösung

Permeabilisierungslösung: 75 ml 1xPBS
0,075 g Glycin
187,5 µl Triton X-100

Blockierungslösung: 75 ml 1xPBS
1,5 ml Ziegen Serum
0,75 g BSA
75 µl Tween 20

2.2.1.7 Sphärenassay

Für die Untersuchung der Fähigkeit zur Sphärenformation wurden nach der Bestrahlung 1×10^4 Zellen pro Well in eine 6-Wellplatte mit nichtadhäsiven Eigenschaften eingesät. Jede Bestrahlungsdosis wurde mit Hilfe von Triplikaten untersucht. Durch die nicht adhäsiven Bedingungen sollten potentielle stammzellähnliche Subpopulationen selektiert werden. An vier Versuchstagen (1., 3., 5., und 7. d nach der Einsaat) wurden die Anzahl der Sphären mikroskopisch ausgezählt.

2.2.1.8 Durchflusszytometrie - Expression von Oberflächenmarkern

Ein potentieller Einfluss durch die Bestrahlung auf die Expression der Oberflächenmarker EpCAM und MUC-1 wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurden die MCF10A-Zellen direkt nach der Bestrahlung in T₇₅-Flaschen ausgesät. 72 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 0,05 % Trypsin von der Gefäßoberfläche abgelöst. Anschließend erfolgt ein Spülen mit 5 ml Färbepuffer (300 g, 4 °C, 5 min). Für die anschließende Antikörperinkubation wurde eine Zellsuspension von 10^6 Zellen/100 µl verwendet. Antikörper sowie die dazugehörigen Isotypkontrollen wurden in entsprechender Konzentration hinzugefügt und für mindestens 20 min auf Eiswasser im Dunkeln inkubiert. Um nichtgebundene Antikörper herauszuwaschen, erfolgte nach der Inkubation ein Spülschritt mit 1 ml Färbepuffer (300 x g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren verworfen und das verbliebene Zellpellet in 500 µl frischem Färbepuffer gelöst. Direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden 5 µl 7-AAD dazugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte umgehend mit dem Durchflusszytometer

2.2.1.10 Proteomanalyse

Die Proteomanalyse der Proben erfolgte ausschließlich durch die Mitarbeiter des Interfakultären Instituts für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Funktionelle Genomforschung an der Universitätsmedizin Greifswald. Zuerst wurden die Proteine durch mehrmaliges (n=5) Einfrieren und Auftauen in 300 µl 8 M Urea/2 M Thiourea extrahiert. Die Fragmentierung der Nucleinsäuren wurde durch drei aufeinanderfolgende Ultraschallbehandlungen (neun Zyklen mit 80 % Energie), für 5 sek auf Eis mit Hilfe eines Sonoplus (Bandelin, Berlin), erreicht. Die Homogenate wurden für eine Stunde bei 16.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss an die Proteinbestimmung mittels Bradford wurden 3 µg Protein reduziert, alkyliert und mit Trypsin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Peptidlösung wurde auf C18-Säulen entsalzt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Methode. Dieses Analyseverfahren ist eine Kombination aus HPLC (Acquity UPLC system; Waters GmbH, Eschborn) und Elektrospray-Ionisation (ESI) mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS; LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

2.2.1.11 miRNA-Analyse

Die Analyse der miRNA-Expression der Proben erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Abteilung Funktionelle Genomforschung an der Universitätsmedizin Greifswald. Für die miRNA Analyse wurde das Sureprint G3 Human miRNA r21 Microarray der Firma Agilent laut Herstellerangaben verwendet.

2.2.2 *In vivo*-Untersuchungen

Die durchgeführten *in vitro*-Experimente dieser Arbeit wurden von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Dienststelle Rostock, Thierfelderstraße 18, 18059 Rostock), genehmigt (Aktenzeichen 7221.3-014.15-1 11).

2.2.2.1 Mausstamm und Haltung

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden immundefiziente Mäuse des Stammes *NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrCrI* (NOD-SCID) der Firma Charles River verwendet. Charakteristisch für diesen Stamm sind zwei Mutationen, die *Non-Obese Diabetic* (NOD)- und die *Severe Combined Immune Deficiency* (SCID)-Mutation. Homozygote Tiere dieses Stammes weisen eine defiziente B- und T-Zellentwicklung auf, sowie beeinträchtigte natürliche Killerzellen. Dies ermöglicht die Transplantation von humanen Zellen, jedoch ergeben sich dadurch auch besondere Anforderungen zur Haltung der Tiere. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF)-nahen Bedingungen in einzelbelüfteten Käfigen, mit einer maximalen Belegung von vier Tieren pro Käfig, gehalten. Futtermittel, Wasser sowie Einstreu wurden autoklaviert. Wasser und Futtermittel wurden *ad libitum* angeboten.

2.2.2.2 Allgemeiner Operationsablauf der Transplantationen

Die Operation erfolgte auf einer elektrischen Wärmematte, bedeckt mit einem sterilen Abdecktuch, um die Tiere vor der Auskühlung zu schützen. Die Mäuse wurden mit einer Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 25 mg/kg KG Xylazinintraperitoneal (i.p.) narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde u. a. mittels Zwischenzehenreflex und Druckausübung auf den Schwanz getestet. Bei dem Erreichen der gewünschten Narkosetiefe wurde zur Vorbereitung der Bereich des Operationsfeldes am Körper rasiert und mit Betaisodona-Lösung desinfiziert. Abschließend wurden die Augen mit Augensalbe bedeckt, um diese vor der Austrocknung zu schützen.

Nach der Operation bzw. nach jeder Narkosegabe wurden den Tieren ein Flüssigkeitsdepot von 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung. subkutan injiziert. Bis zum Wiedererwachen wurden sie mit einer herkömmlichen UV-Lampe bestrahlt und anschließend mit einer einmaligen subkutanen Gabe von 100 µl/10 g KG einer 1 mg/ml Carprofenlösung zur Analgesie behandelt. An den drei darauffolgenden Tagen wurde das Trinkwasser täglich gewechselt und mit dem

Schmerzmittel Novaminsulfon (3 Tropfen/100 ml) versetzt. Ebenso wurden die Tiere gewogen, auf Auffälligkeiten untersucht und die Nähte kontrolliert. Da die Mäuse teilweise das Nahtmaterial anfraßen, mussten bei Bedarf betroffene Tiere nochmals narkotisiert und die Naht erneut geschlossen werden. Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Gewebe der murinen Brustdrüse wurde beidseitig entnommen und in 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert.

Die zwei Transplantationsmodelle, *subrenal capsule assay model* (2.2.2.3) und *mammary fat pad model* (2.2.2.4) kamen zum Einsatz.

2.2.2.3 Subrenal capsule assay model

Das Modell einer Xenotransplantation unterhalb der Nierenkapsel wurde von Eirew. et al. [55] beschrieben. Das Transplantat, bestehend aus Matrigel und Kollagen, enthielt die zu transplantierenden Zellen sowie die murinen C3H10T1/2-Fibroblasten. Zur Hemmung der Proliferation wurden 50 % der Fibroblasten zuvor mit 15 Gy bestrahlt.

Für die Herstellung der Kollagen-Gele, welche pH-neutral sein sollten, wurde das saure Kollagen mit 5x DMEM und Natriumhydroxid (NaOH) neutralisiert und anschließend mit den Fibroblasten und Epithelzellen versetzt. Als Gel wurden 25 µl des Zell-Kollagen-Gemisches in die Wells einer 24-Wellplatte pipettiert, für 10 min bei 37 °C inkubiert und danach mit 1 ml EpiCult B-Medium beschichtet. Zum Abschluss wurden die Gele mit einer Pipettenspitze vom Boden gelöst und weitere 60 min bei 37 °C inkubiert.

Neutralisation des Kollagens: 78 µl Kollagen wurden mit 20 µl 5x DMEM und 2 µl NaOH (1 M) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert

Für die Transplantation wurden 5-10 Wochen alte, weibliche Mäuse mit einer Dosis von 75 mg/kg KG Ketamin und 25 mg/kg KG Xylazin intraperitoneal (i.p.) narkotisiert. Zu Beginn wurde ein 1 cm großer Schnitt in die oberste Hautschicht auf der rechten Seite der Maus unterhalb der Rippenbögen gesetzt. Diese Schicht wurde vorsichtig von der darunterliegenden Muskelschicht freipräpariert. Anschließend erfolgte ein kleinerer Schnitt in die Muskelschicht im Bereich oberhalb der Niere. Nach Lokalisation der Niere konnte diese mit Hilfe leichten Drucks ausgelagert werden. Die ausgelagerte Niere wurde ständig feucht gehalten, da eine zu trockene Nierenkapsel leicht einreißen kann. Das Transplantat wurde sowohl mit einem flexiblen Venenkatheter oder mit einer abgeflammt Pasteurpipette unterhalb der

Nierenkapsel platziert. Nach erfolgreicher Transplantation wurde die Niere in die Körperhöhle zurückgelagert und die einzelnen Hautschichten mit fortlaufenden Nähten geschlossen.

2.2.2.4 Mammary fat pad model

Das Modell einer orthotopen Transplantation innerhalb des murinen Brustdrüsengewebe (Abbildung 8) wurde durch Kuperwasser et al. (2004) und im Detail durch Proia & Kuperwasser (2006) [54,70] beschrieben.

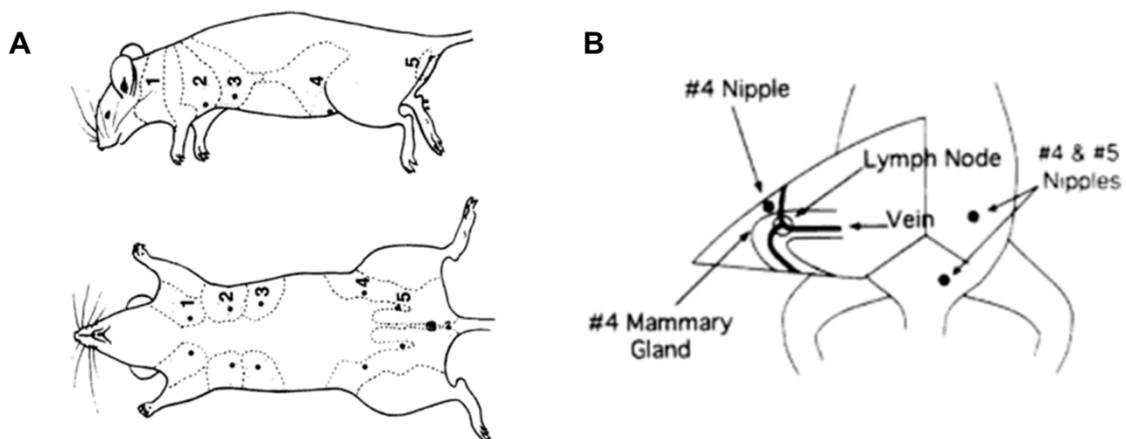


Abbildung 8: Darstellung der murinen Brustdrüsen. Abbildung der fünf Brustdrüsenpaare einer Maus (A) und detaillierte Skizzierung der vierten Brustdrüse mit Lymphknoten und Blutgefäßen (B). Nach Margot M. Ip, Bonnie B. Asch, 2000 [71]

Dieses Transplantationsmodell ist ursprünglich aus drei Einzeloperationen aufgebaut. Für die vorliegende Arbeit wurden die ersten zwei Teilschritte zusammengefasst, daraus resultiert eine geringere Belastung für die Versuchstiere. Der erste Schritt kombiniert das „*Clearing*“ und „*Humanizing*“. Hierbei wurde ein Y-förmiger Schnitt um die vierte Brustwarze einer drei Wochen alten weiblichen Maus gesetzt. Die Hautschicht wurde von der darunterliegenden Abdominalwand freipräpariert. Unterhalb der Brustwarze wurden das murine Gewebe sowie die Blutgefäße, welche zur dritten und fünften Brustwarze führen, kauterisiert (Abbildung 8) und mit Hilfe einer Irisschere entfernt („*Clearing*“). Spezifisch für diesen *Clearing*-Schritt sind die Entfernung des murinen Gewebes inklusive des Lymphknotens unterhalb der vierten Brustdrüse sowie die Abtrennung der verbindenden Blutgefäße zur dritten und fünften Brustdrüse. Anschließend wurden in das verbliebene Fettpolster 5×10^5 Fibroblasten mit einer Hamiltonspritze injiziert („*Humanizing*“), diese wurden eine Woche vorher ausgefroren und wie

in 1.2.1 beschrieben kultiviert. Ein Transplantat hatte ein Volumen von 35 µl, dabei waren die Zellen im entsprechenden Fibroblastenmedium resuspendiert und wurden bis zur Injektion auf Eis gekühlt. Die Hälfte der Fibroblasten wurde zuvor mit 4 Gy bestrahlt, dies diente der Proliferationshemmung. Die Wunde wurde anschließend mit Einzelknopfnähten verschlossen. Zwei Wochen später erfolgte die zweite Operation. Zur Herstellung des Transplantats musste die saure Kollagenlösung, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, mit PBS und NaOH neutralisiert und anschließend 1:1 mit Matrigel verdünnt werden. Für jedes Transplantat wurden 5×10^5 Fibroblasten, sowie die gewünschte Anzahl an vereinzelt Brustepithelzellen mit der entsprechenden Menge an Kollagen-Matrigel-Gemisch versetzt. Die Transplantate wurden bis zur Injektion auf Eis gelagert. Zu Beginn der zweiten Operation wurde erneut die vierte Brustdrüse mit Hilfe eines Y-förmigen Schnittes freipräpariert. In das nun humanisierte Fettpolster wurden die humanen Brustepithelzellen zusammen mit den Fibroblasten im Kollagen-Matrigel-Gemisch mit Hilfe einer Hamiltonspritze injiziert. Durch die Körperwärme der Tiere verfestigte sich das Transplantat sehr schnell. Ein mögliches Auslaufen des Transplantats musste jedoch beobachtet werden, um gegebenenfalls das verlorene Volumen nochmals zu injizieren. Für diesen Fall wurden stets Reservetransplantate mit angesetzt. Zum Abschluss wurde die Wunde erneut mit Einzelknopfnähten verschlossen.

2.2.2.5 Histologische Färbung der Paraffinschnitte

Die entnommenen und in Formaldehydlösung fixierten Gewebeproben wurden an die Praxis für Pathologie der Dres. Broschewitz, Kramm, Stubbe und Schmidt (Trelleborger Strasse 10C, Stadtteil Lütten Klein, 18107 Rostock) übergeben und durch die dortigen Mitarbeiter weiterbearbeitet, dies beinhaltete die Paraffineinbettung, Schneiden und Färben der Präparate sowie die pathologische Befundung der einzelnen Präparate. Bei Eintreffen der Gewebeproben wurden diese in Paraffin eingebettet und anschließend immunhistochemischen Färbungen unterzogen. Zuallererst wurde als Übersichtsfärbung die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, auch HE-Färbung genannt, verwendet. Charakteristisch hierbei ist die für das Hämatoxylin typische Blaufärbung der basophilen Strukturen (u. a. Zellkern, DNA) sowie die durch das Eosin rötlich gefärbten azidophilen Zellbestandteile (u. a. Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien und Kollagen). Die Schnitte wurden 20-30 min in Ehrlichs saurer Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Ein Spülschritt mit Leitungswasser folgte. Nach dem zwei bis dreimaligem Eintauchen in 1 %-iger Salzsäure in 70 % Alkohol, wurde erneut mit Leitungswasser gespült. Im Anschluss erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Färbung, ggf. wurden einzelne, der vorangegangenen, Schritte wiederholt. Daraufhin wurden die Schnitte 15 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Färbung mit 1 %-igem Eosin (gelöst in

Aqua.dest) inkubierte für 2-5 min. Daran schloss sich die Entwässerung der Präparate, beginnend in 95 %-igem Alkohol, sowie das Eindecken der Präparate, an.

Ehrlichs saures Hämatoxylin:	Lösung A:	14 g Hämatoxylin
		700 ml absoluter Alkohol
	Lösung B:	700 ml Glycerin
		700 ml destilliertes Wasser
		150 g Aluminium-Kaliumsulfat

- Lösung A und B mischen und 10 ml Eisessig zufügen
- Zugabe von 2,1 g Natriumjodat
- gebrauchsfertig nach 24-stündiger Reifung

Die Durchführung der immunhistologischen Färbungen erfolgten mit dem Antikörper anti-Human Nuclei, welcher spezifisch nur die humanen Zellkerne anfärbt. Zu Beginn wurden die Schnitte für 20-30 min mit Citratpuffer pH 6 bei mehr als 90 °C behandelt. Die Peroxidasen des Probenmaterials wurden für fünf Minuten mit der gebrauchsfertigen Blockierungslösung gehemmt. Im Anschluss erfolgte ein Spülen mit Tris-Puffer. Der Primäantikörper wurden entsprechend der gewünschten Konzentration in der Antikörperverdünnungslösung angesetzt und das Probenmaterial anschließend für 30 min mit dem verdünnten Primäantikörper inkubiert. Es schloss sich wieder ein Spülschritt mit Tris-Puffer an. Schließlich erfolgte die Bindung des Sekundäantikörpers an den primären Antikörper, sowie der Meerrettichperoxidase mit dem ZytoChem-Plus (HRP) Polymer Bulk-Kit. Die einzelnen Schritte wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Abschließend erfolgte die Inkubation mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Durch die enzymatische Umsetzung des Substrates kommt es zu einem irreversiblen Farbumschlag und somit zur erfolgreichen Detektion der Bindung des Primäantikörpers, welches mikroskopisch sichtbar war. Die histologischen Färbungen (H/E, anti-human nucleii) erfolgten ausschließlich durch die Mitarbeiter der Praxis für Pathologie der Dres. Broschewitz, Kramm, Stubbe und Schmidt.

Nach dem gleichen Prinzip, der Antigendetektion durch die Umsetzung eines Substrates mit Hilfe einer Peroxidase, erfolgte auch die Detektion von P27 im Probenmaterial. Für die Demaskierung der Schnitte wurde die Epitope Retrieval Solution 2 verwendet, der Primäantikörper gegen P27 in Bond Primary antibody Diluent gelöst und die Detektion des

Antikörpers erfolgte mit dem Bond Polymer Refine Detection Kit. Die immunhistologische Färbung und anschließende Detektion von P27 erfolgte durch die Mitarbeiter der Firma provitro AG (Charité Campus Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin).

2.2.3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden stets die Ergebnisse aus drei oder mehr unabhängigen Experimenten verwendet. Für alle *in vitro*-Experimente, außer der qRT-PCR-Analyse sowie der Sphärenassays, wurde der Zweistichproben t-Test angewandt. Die statistische Signifikanz wurde mit $p < 0.05$ angegeben. Hingegen für die Analysen der qRT-PCR sowie der Sphärenassays wurde der Einstichproben t-Test angewandt. Die statistische Signifikanz wurde mit $p < 0.02$ angegeben.

3 Ergebnisse

Diese Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes ANDANTE (FP7-295970) angefertigt. Der erste Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der *in vitro*-Untersuchung des Einflusses der Photonenstrahlung auf Normalgewebszellen der humanen Brust, appliziert in zwei verschiedenen Dosisraten (*high dose rate; HDR* und *low dose rate; LDR*). Diese Ergebnisse sind im Kapitel 3.1 dargestellt. Da sich das ANDANTE-Projekt zudem mit der Einschätzung der biologischen Wirksamkeit von Neutronen im Vergleich zu Photonen beschäftigt hat, lag der zweite Schwerpunkt auf den *in vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von Photonen- und ergänzend Neutronenstrahlung, dargestellt in Kapitel 3.2.

3.1. Einfluss von Photonenstrahlen auf Normalgewebszellen der Brust - *in vitro*

3.1.1 Ermittlung der Überlebensfraktion sowie der relativen biologischen Wirksamkeit

Zu Beginn der *in vitro*-Untersuchungen wurden mit Hilfe von Koloniebildungstests Überlebenskurven, als ein Maß für das Langzeitüberleben, der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung erstellt.

Da diese Arbeit im Rahmen des ANDANTE-Projektes bearbeitet wurde und dessen Kernthema die Abschätzung der Wirkung der gestreuten sekundären Neutronen (*scattered secondary neutrons*) in Relation zu der Neutronen- und Photonenstrahlung war, sind hier zum besseren Verständnis alle Überlebenskurven nach Photonen- und Neutronenbestrahlung dargestellt. Die Ergebnisse der Photonenexposition stammen dabei aus der vorliegenden Arbeit. Die *in vitro*-Einflüsse der Neutronenstrahlung werden in der Dissertation von Frau Dipl. Biol. Monique Zwar mit dem Titel „Effekte einer Neutronenexposition auf gesunde humane Brustzellen“ (Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock) detaillierter beschrieben. Die Daten wurden bereits publiziert [69].

Das klonogene Überleben aller Bestrahlungsqualitäten wurde untersucht (Abbildung 9). Als Referenzstrahlung zu den Neutronen wurde die Photonenbestrahlung mit einer niedrigen Dosisrate (Photonen LDR) verwendet.

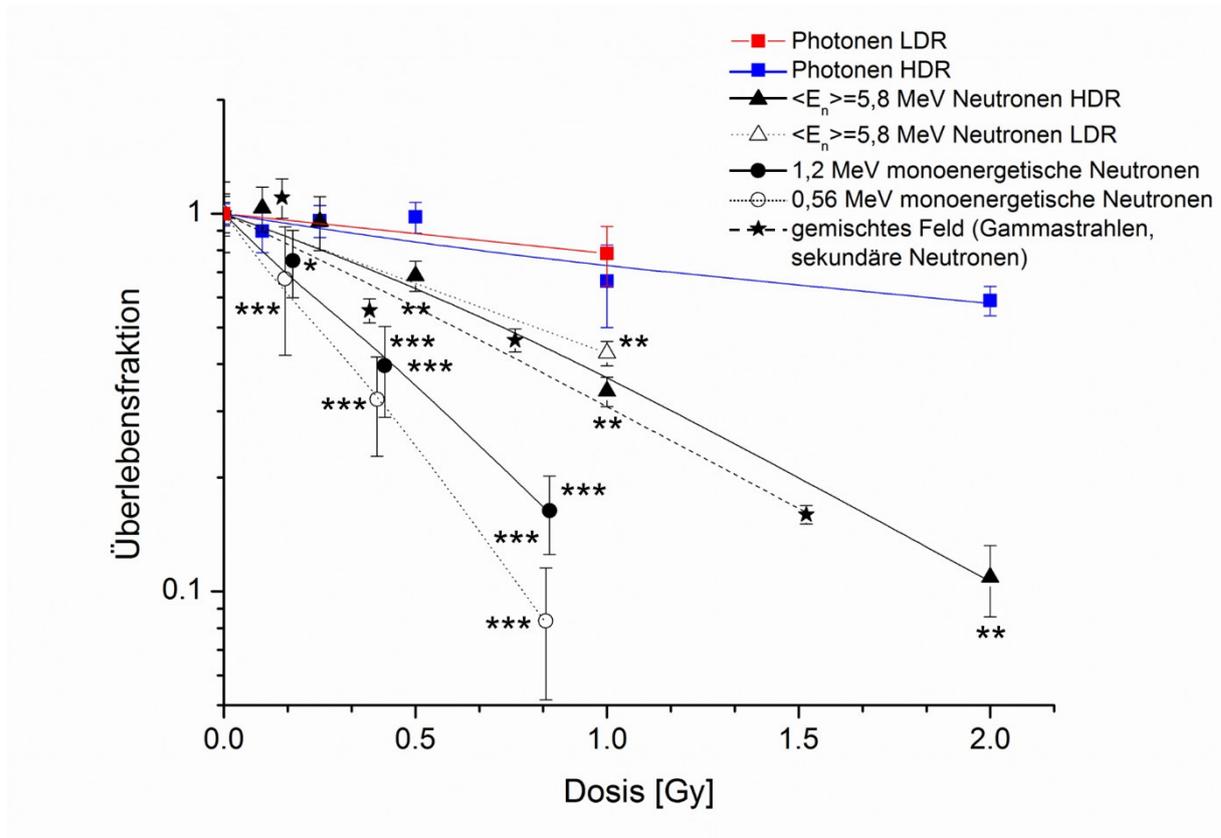


Abbildung 9: Klonogenes Überlebens der MCF10A-Zellen nach Photonen- und Neutronenbestrahlung. MCF10A-Zellen wurden mit Photonen in Niedrigdosisraten (LDR)- und Hochdosisratenbereich (HDR) bestrahlt. Die Neutronenbestrahlung erfolgte mit Neutronen mit einem breiten Energiespektrum ($\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$) im Niedrigdosisraten (LDR)- und Hochdosisratenbereich (HDR) sowie mit monoenergetischen Neutronen mit einem Energiespektrum von 1,2 MeV bzw. 0,56 MeV sowie sekundär gestreuter Neutronen. Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=3-5$). Die Photonen dienten als Referenz für die Signifikanzberechnung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$; Low dose rate (LDR), high dose rate (HDR) [69].

Für alle Bestrahlungsqualitäten war eine signifikante dosisabhängige Verminderung der Überlebensfraktionen erkennbar. Die Überlebensfraktion der MCF10A-Zellen lag nach einer Photonenbestrahlung mit einer hohen Dosisrate (HDR) bei nur noch 66 % nach 1 Gy und 59 % nach 2 Gy Bestrahlungsdosis. Im Vergleich dazu resultierte die gleiche Strahlenqualität mit einer niedrigeren Dosisrate (LDR) bei 1 Gy in einem geringeren Abfall der Überlebensfraktion (78 %).

Der Einfluss auf das sinkende klonogene Überleben durch die verschiedenen Neutronenqualitäten war deutlich stärker ausgeprägt. Die Bestrahlung mit Neutronen eines breiten Energiespektrum ($\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$) zeigte im Vergleich zu der Photonenstrahlung einen stärkeren und zugleich signifikanten Effekt, bei 1 Gy lagen die Überlebensfraktionen bei 35 %

(HDR) und 42 % (LDR). Sowohl im Bereich der niedrigeren als auch der hohen Dosisrate wirkte die Neutronenbestrahlung deutlich stärker auf das klonogene Überleben im Gegensatz zur Photonenbestrahlung. Im Hinblick auf die Bestrahlung der Zellen mit der höchsten angewandten Dosis von 2 Gy (HDR) war die Überlebensfraktion nach der Neutronenbestrahlung verglichen zu der Photonenbestrahlung (HDR) um einen Faktor von 5 reduziert.

Die größten Effekte waren nach der Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen (0,56 MeV und 1,2 MeV) sowie den sekundär gestreuten Neutronen zu beobachten. Signifikante Veränderungen traten bei beiden monoenergetischen Neutronenqualitäten auf, bereits bei geringen Dosen von 0,4 Gy (0,56 MeV) und 0,42 Gy (1,2 MeV) war die Überlebensfraktion der Zellen stark minimiert. Dieser Trend setzte sich dann bei der nächst höheren Dosis von 0,84 Gy (0,56 MeV) und 0,85 Gy (1,2 MeV) fort. Die Überlebensfraktion betrug weniger als 20 %. Sekundär gestreute Neutronen hatten auf die Überlebensfraktion eine vergleichbare Wirkung wie die monoenergetischen Neutronen mit der geringeren Energie (0,56 MeV), nach einer Bestrahlungsdosis mit 0,76 Gy lag die Überlebensfraktion bei nur noch 16 %.

Aufgrund der experimentellen Daten zu den Überlebensfraktionen wurde die relative biologische Wirksamkeit (RBW, engl. *relative biological effectiveness, RBE*) für die verschiedenen Strahlenqualitäten bei einer Überlebensfraktion von 10 % errechnet (Tabelle 14). Die Photonenstrahlung mit der niedrigen Dosisrate, Photonen (LDR), diente hierfür als Referenzstrahlung.

Tabelle 14: Darstellung der relativen biologischen Wirksamkeit der verschiedenen Strahlungsqualitäten. Als Referenzstrahlung wurde die Photonenstrahlung mit der niedrigen Dosisrate (LDR) verwendet. Der RBW wurde für die Überlebensfraktion von 10 % berechnet. Niedrigdosisrate (engl. *low dose rate, LDR*), Hochdosisrate (engl. *high dose rate, HDR*), relative biologische Wirksamkeit (RBW, engl. *relative biological effectiveness, RBE*), Überlebensfraktion (engl. *survival fraction, SF*). Die Daten sind bereits publiziert in [69].

Strahlenqualität	α -Werte des klonogenen Überlebens	RBE (SF 0.1)
Photonen, LDR (Referenzstrahlung)	0,12	1,00
Photonen, HDR	0,24	0,58
$\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV Neutronen, LDR	0,43	2,06
$\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV Neutronen, HDR	0,65	1,99
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	1,91	3,75
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	2,55	4,97
gemischtes Feld aus Gammastrahlen - sekundäre Neutronen ($\langle E_n \rangle = 70,5$ MeV)	1,03	2,09

Die RBW ist ein Maß dafür wie hoch die Effekte im Organismus durch verschiedene Strahlenarten sind. Eine Bestrahlung mit Photonen (HDR) zeigte eine sehr geringe RBW (0,58) im Vergleich zu den Neutronen. Die Neutronen mit einem breiten Energiespektrum ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) zeigten eine RBW von 1,99 (HDR) und 2,06 (LDR). Die verschiedenen angewandten Dosisraten wiesen keinen großen Unterschied auf. Hingegen zeigten die monoenergetischen Neutronen eine deutlich höhere RBW, im Vergleich zur Referenzstrahlung ist die RBW um fast ein Vierfaches (3,75 bei 1,2 MeV) bzw. Fünffaches (4,97 bei 0,56 MeV) gesteigert. Die RBW der sekundär gestreuten Neutronen (2,09) konnte im Bereich der Neutronen mit einem breiten Energiespektrum ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) eingeordnet werden.

Zudem wurde eine zusätzliche Bestrahlung mit Photonen bis 6 Gy durchgeführt (Abbildung 10), um das linear-quadratische Verhältnis zwischen applizierter Dosis und Zellüberleben für die verwendete Photonenstrahlung, welche in den Neutronen-Experimenten für das ANDANTE-Projekt als Referenzstrahlung genutzt wurde, zu prüfen.

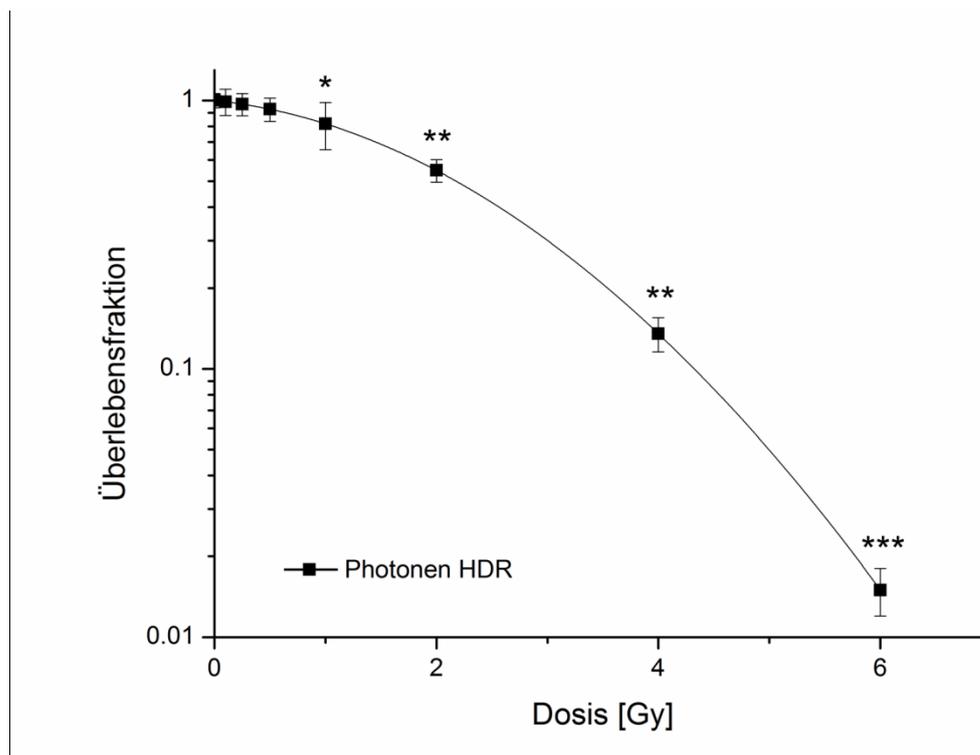


Abbildung 10: Klonogenes Überleben der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung. MCF10A-Zellen wurden mit Photonen im Hochdosisbereich (HDR) bestrahlt. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3). $p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$; High dose rate (HDR) [69].

Im Vergleich zu den mitgeführten unbestrahlten Proben sinkt das klonogene Überleben bereits signifikant ab 1 Gy, dieser Trend setzt sich mit zunehmender Dosis bis zu 6 Gy noch deutlicher fort.

Alle weiteren, in dieser Arbeit aufgeführten, *in vitro*-Untersuchungen erfolgten unter Photonenbestrahlung.

3.1.2 Untersuchung der Vitalität nach Bestrahlung

Da die verschiedenen Dosisraten (HDR und LDR) unterschiedliche Bestrahlungszeiträume in Anspruch nehmen, erfolgte 24 h nach Bestrahlung eine Vitalitätsbestimmung der Zellen (Abbildung 11). Dies diente der Überprüfung, ob die Zellen die verschiedenen Bestrahlungen als Suspensionskultur in den PMMA-Containern unbeeinträchtigt überstehen. So dauerte zum Beispiel die LDR-Photonenbestrahlung für 1 Gy 60 min. In dieser Zeitspanne kühlten die Zellen aus und wurden auch nicht, wie im Brutschrank, zusätzlich mit CO₂ versorgt. Die HDR-Photonenbestrahlung für 1 Gy hingegen nahm nur ca. 2,5 min in Anspruch.

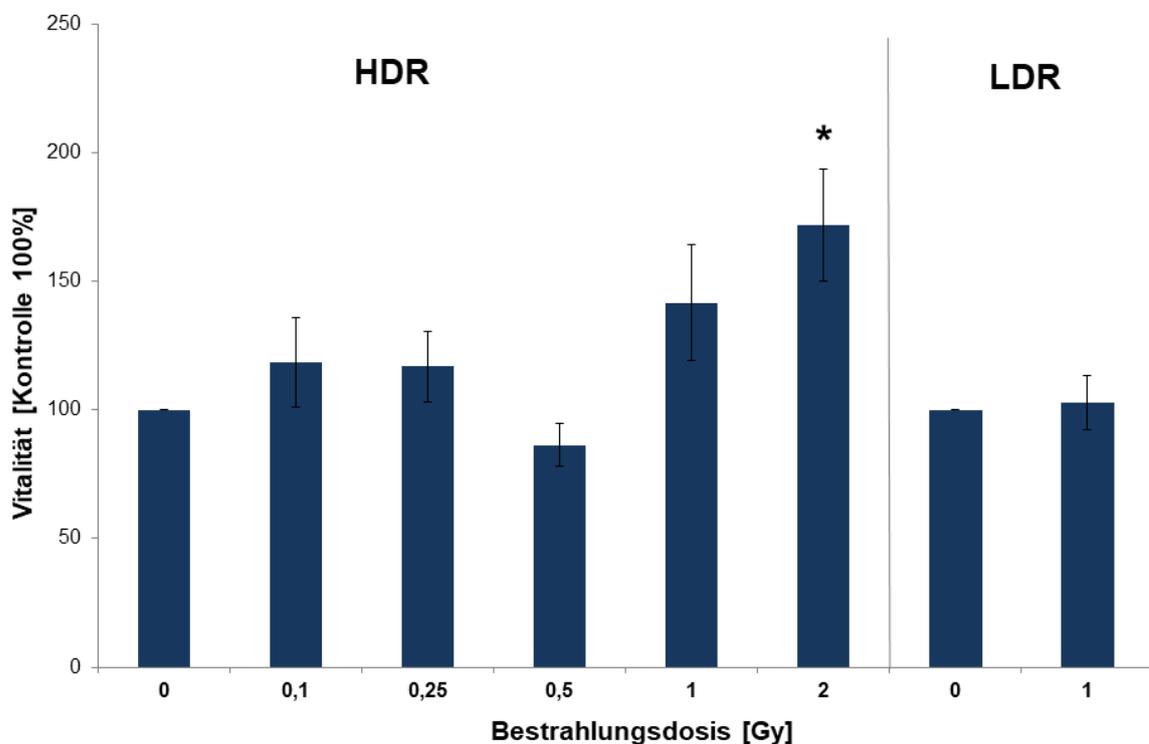


Abbildung 11: Untersuchung der Vitalität der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung mit zwei verschiedenen Dosisraten. 24 h nach Bestrahlung erfolgte die Vitalitätsbestimmung der Zellen mit Hilfe des WST-1 Assays. Die Werte der einzelnen Bestrahlungsdosen wurden auf die Kontrolle (0 Gy) normiert. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3); * p<0,05; Low dose rate (LDR), high dose rate (HDR).

24 h nach der Bestrahlung war die Vitalität der Zellen bei fast allen Dosen der HDR-Bestrahlung im Vergleich zu der unbestrahlten Probe (100 %) angestiegen (Abbildung 11). Nach einer Photonenbestrahlung stieg die Vitalität nur leicht, nach 0,1 Gy auf 118,4 % und nach 0,25 Gy auf 116,8 %. Höhere Dosen verursachten teilweise signifikante Ansteige der Vitalität auf 141,6 % (1 Gy) und 171,6 % (2 Gy). Bei einer Bestrahlungsdosis von 0,5 Gy trat ein Abfall der Vitalität auf 86,3 % bezogen auf die Kontrolle auf. Die LDR-Bestrahlung mit 1 Gy hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der MCF10A-Zellen.

3.1.3 Analyse der Fähigkeit zur Sphärenformation

Mit Hilfe des Sphärenassays wurde analysiert, ob die Fähigkeit zur Sphärenformation durch die Bestrahlung beeinflusst wurde. Die höchste Dosis der Neutronenbestrahlung lag bei 1 Gy, daher wurde für die vergleichende Analyse eine Dosis von 1 Gy für die Photonenbestrahlung gewählt (Abbildung 12). Dieser Versuchsansatz wurde in einer nichtadhäsiven Umgebung durchgeführt.

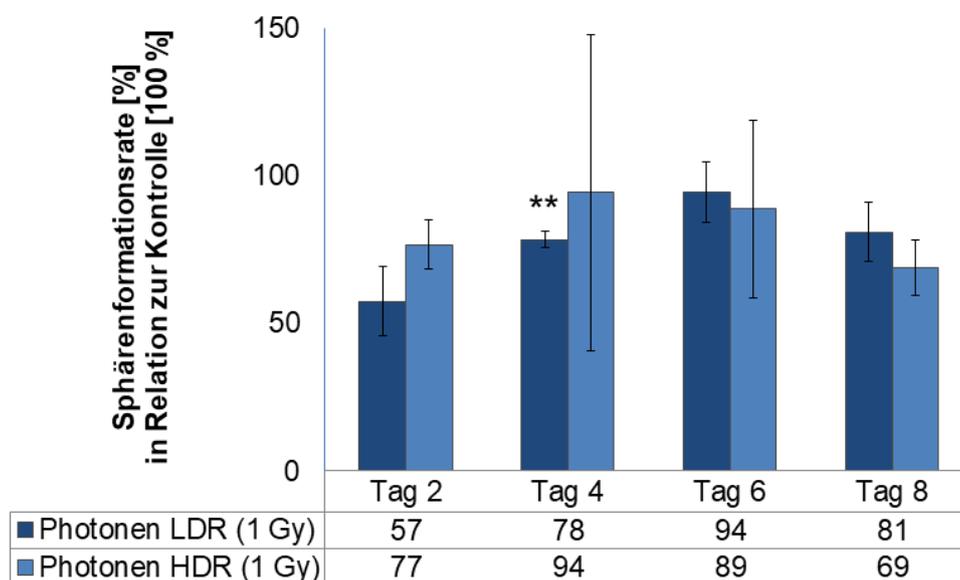


Abbildung 12: Sphärenformation nach Photonenbestrahlung der MCF10A-Zellen. Anzahl der gebildeten Sphären der MCF10A-Zellen bis acht Tage nach Bestrahlung (1 Gy) und in Relation zur unbestrahlten Kontrolle (100 %); dargestellt sind MW \pm SD (n=3); ** p<0,01; (HDR, high dose rate; LDR, low dose rate).

Die Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy resultierte in einer deutlichen Abnahme der Sphärenformation nach Bestrahlung über einen Zeitraum von acht Tagen. In Relation zur Kontrolle zeigten sowohl die HDR- als auch die LDR-Bestrahlung einen reduzierenden Effekt auf die Anzahl der Sphären. Wobei zwischen den zwei Bestrahlungsqualitäten kein eindeutiger Unterschied bestand. Innerhalb der ersten zwei Messpunkte (Tag 2 und Tag 4) deutet sich ein größerer Einfluss nach der LDR-Bestrahlung an, dies ändert sich aber an den zwei weiteren Messpunkten (Tag 6 und Tag 8).

3.1.4 Expressionsuntersuchung von MUC-1 und EpCAM

Das Expressionsmuster der Oberflächenproteine MUC-1 und EpCAM wurde 72 h nach Photonenbestrahlung durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 13).

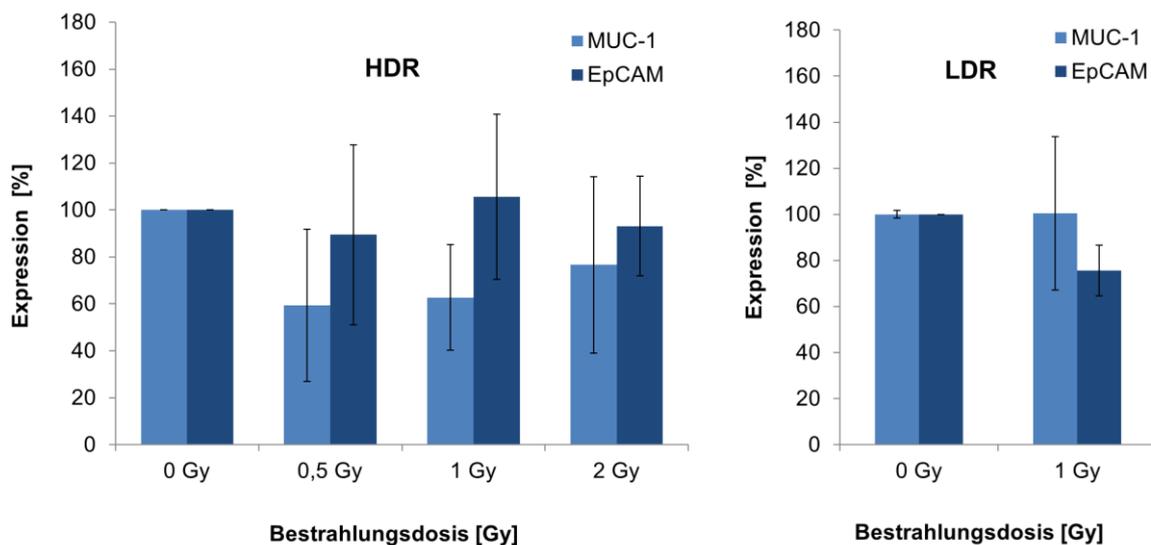


Abbildung 13: Expression der Oberflächenmarker MUC-1 und EpCAM in den MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung. Die durchflusszytometrische Expressionsanalyse erfolgte 72 h nach Bestrahlung. Das Diagramm präsentiert die prozentuale Verteilung des x-Mean der einzelnen Proben in Relation zur Kontrolle (100 %); dargestellt sind MW ± SD (n=3 (MUC-1), n=4 (EpCAM)); HDR, high dose rate; LDR, low dose rate.

Im Vergleich miteinander wiesen die unabhängigen Versuche ein inkonsistentes Expressionsmuster beider Oberflächenproteine auf. Die Verteilung des Oberflächenproteins

EpCAM nach HDR-Bestrahlung zeigte keinen eindeutigen Trend. Die LDR-Bestrahlung mit 1 Gy hingegen resultierte in einer leichten Abnahme der EpCAM-Expression. Bei MUC-1 deutete sich ebenfalls eine Abnahme der Expression nach der HDR-Bestrahlung an, dieser Trend zeigte sich bei der LDR-Bestrahlung nicht. Bei beiden Oberflächenproteinen war eine signifikante Änderung nach der Bestrahlungsdosis bzw. Dosisrate nicht nachweisbar.

3.1.5 Analyse der residualen DNA-Doppelstrangbrüche

Die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen, als eine Form des DNA-Schadens, erfolgte mit Hilfe der immunzytochemischen Anfärbung der γ H2AX-Foci (Abbildung 14).

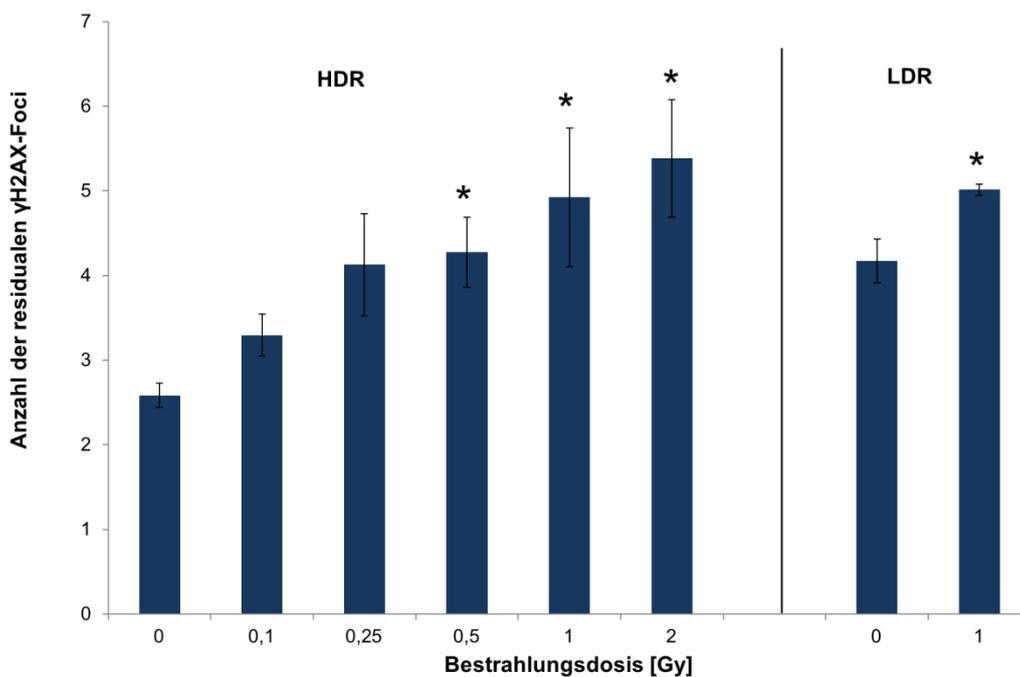


Abbildung 14: Residuale DNA-Doppelstrangbrüche der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung. 24 h nach Photonenbestrahlung erfolgte die immunzytochemische Detektion der γ H2AX-Foci. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3); * p<0,05; (HDR, high dose rate; LDR, low dose rate).

Es konnte, sowohl für die HDR- als auch für die LDR-Bestrahlung, ein dosisabhängiger Anstieg der residualen DNA-Doppelstrangbrüche beobachtet werden. Dieser war sowohl für eine Bestrahlungsdosis von 0,5 Gy (\bar{x} 4,28 Foci/Zelle) als auch bei höheren Dosen von 1 Gy (\bar{x} 4,92 Foci/Zelle) und 2 Gy (\bar{x} 5,38 Foci/Zelle) signifikant. Nach der LDR-Bestrahlung der Zellen konnte ein ähnlicher Effekt auf die Anzahl der residualen DNA-Doppelstrangbrüche

beobachtet werden, bei 1 Gy (LDR) war die Anzahl mit durchschnittlich 5,02 Foci/Zelle signifikant erhöht. Bemerkenswert ist, dass sich die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zwischen den Kontrollen stark unterschied, mit durchschnittlich 2,58 Foci/Zelle (HDR) sowie 4,17 Foci/Zelle (LDR).

3.1.6 Genexpressionsanalyse strahlungsrelevanter Gene

Um die Einflüsse der Bestrahlung auf der Ebene des Genoms zu untersuchen, erfolgte die Expressionsanalyse der strahlungsrelevanten Gene *P53*, *P27* und *RB1* mittels qRT-PCR (Abbildung 15). Die Analyse erfolgte 72 h nach Photonenbestrahlung. Für die anschließende relative Quantifizierung wurde *GAPDH* als Referenz gewählt, dieses wurde zuvor mit Hilfe eines *TaqMan® Array Human Endogenous Control* ermittelt. Die Reichweite der dafür gewählten Bestrahlungsdosen deckte sowohl moderate (1 Gy) als auch hohe (5 Gy) Bestrahlungsdosen ab. Die Expression von *GAPDH* zeigte sich auch unter der Bestrahlung stabil und wies nur geringe Schwankungen auf, daher eignete sich *GAPDH* sehr gut als Referenz für die relative Quantifizierung.

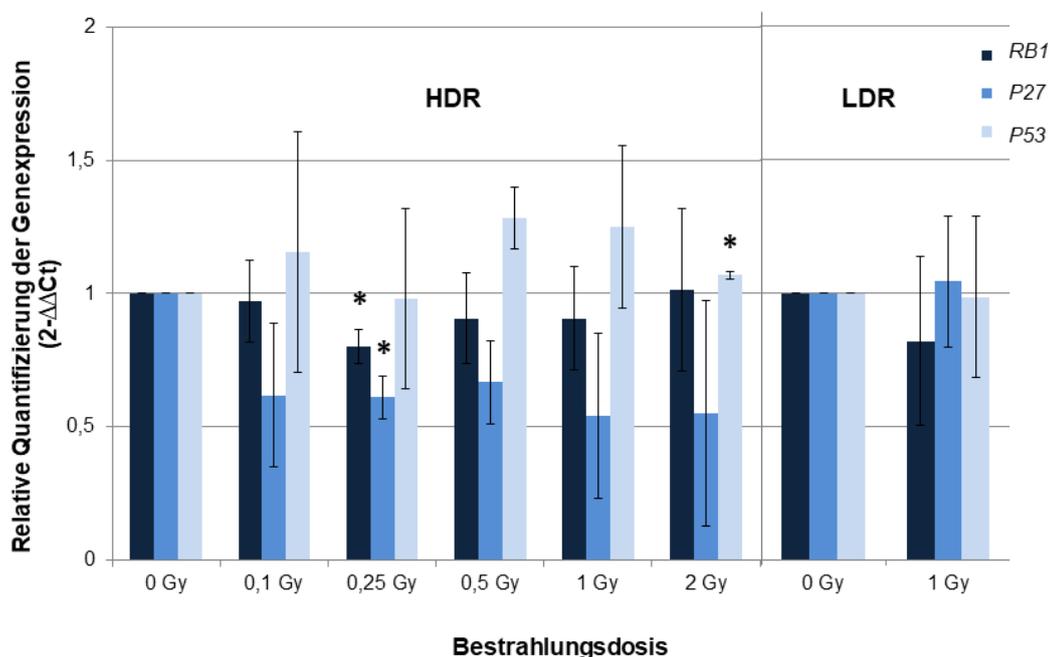


Abbildung 15: Expressionsunterschiede von *P53*, *P27* und *RB1* nach Photonenbestrahlung der MCF10A-Zellen. Die Veränderungen der Expressionsmuster von *P53*, *P27* und *RB1* wurde 72 h nach Bestrahlung ermittelt. Für die relative Quantifizierung wurde *GAPDH* als Referenz verwendet. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3); ** p<0,05 (HDR, high dose rate; LDR, low dose rate).

Die *RB1*-Expression zeigte eine Abnahme nach Bestrahlung (HDR), jedoch lag keine Dosisabhängigkeit vor. Es zeigte sich, dass für 0,25 Gy die sinkende Expression signifikant war. Der Trend einer abnehmenden *RB1*-Expression deutete sich auch nach der LDR-Bestrahlung an. Für *P27* zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, die Expression nahm unter der Bestrahlung (HDR) ab, nach einer Bestrahlung mit 0,25 Gy war die Abnahme signifikant. Aufgrund der erhöhten Standardabweichung war auch für *P27* keine eindeutige Dosisabhängigkeit zu erkennen. Nach einer LDR-Bestrahlung mit 1 Gy war die Expression kaum beeinflusst.

Im Gegensatz zu *RB1* und *P27*, welche einen abnehmenden Effekt auf die Expression vorweisen, zeigte sich eine deutliche Steigerung in der Expression von *P53* nach Bestrahlung (HDR), die bei 2 Gy signifikant auftrat. Eine lineare Dosisabhängigkeit war nicht zu erkennen. Auch hier zeigte die LDR-Bestrahlung mit 1 Gy kaum einen Effekt auf die Expression.

3.1.7 Expressionsanalyse der miRNA nach Bestrahlung

Ob die Photonenbestrahlung einen Einfluss auf die miRNA-Expression hat, wurde 48 h und sieben Tage nach Bestrahlung untersucht. Hierfür wurde das Sureprint G3 Human miRNA r21 Microarray der Firma Agilent verwendet, dabei wurden die Proben dreier unabhängiger Experimente für die Durchführung des Arrays gepoolt. 48 h nach der Strahlenexposition waren 27 miRNAs signifikant reguliert, sieben Tage später waren es sechs miRNAs (Abbildung 16).

48h	miRNA	Fold change ([48h_0.25Gy] vs [48h_0Gy])				7d	miRNA	Fold change ([48h_0.25Gy] vs [48h_0Gy])			
		Fold change ([48h_0.25Gy] vs [48h_0Gy])	Fold change ([48h_0.5Gy] vs [48h_0Gy])	Fold change ([48h_1.0Gy] vs [48h_0Gy])	Fold change ([48h_2.0Gy] vs [48h_0Gy])			Fold change ([48h_0.25Gy] vs [48h_0Gy])	Fold change ([48h_0.5Gy] vs [48h_0Gy])	Fold change ([48h_1.0Gy] vs [48h_0Gy])	Fold change ([48h_2.0Gy] vs [48h_0Gy])
	hsa-miR-6515-3p					hsa-miR-6076					
	hsa-miR-222-5p					hsa-miR-6800-3p					
	hsa-miR-125a-3p					hsa-miR-513b-5p					
	hsa-miR-6769b-5p					hsa-miR-484					
	hsa-miR-7152-3p					hsa-miR-138-2-3p					
	hsa-miR-378a-5p					hsa-miR-5787					
	hsa-miR-8063										
	hsa-miR-8072										
	hsa-miR-625-5p										
	hsa-miR-4787-3p										
	hsa-miR-550a-3p										
	hsa-miR-140-3p										
	hsa-miR-30e-3p										
	hsa-miR-484										
	hsa-miR-181a-3p										
	hsa-miR-3659										
	hsa-miR-4478										
	hsa-miR-101-3p										
	hsa-miR-7110-5p										
	hsa-miR-532-5p										
	hsa-miR-7-1-3p										
	hsa-miR-19b-1-5p										
	hsa-miR-4746-3p										
	hsa-miR-7107-5p										
	hsa-miR-505-3p										
	hsa-miR-1268b										
	hsa-miR-4512										

Abbildung 16: Darstellung der in der Expression signifikant veränderten miRNA der MCF10A-Zellen 48 h und sieben Tage nach Photonenbestrahlung. Analyse der miRNA-Expression mit Hilfe des Sureprint G3 Human miRNA r21 Microarray der Firma Agilent. Als signifikant wurden Expressionsunterschiede immer im Vergleich zur Kontrolle ab -2 (grün) und +2 (rot) bezeichnet. Zu beiden Zeitpunkten signifikante miRNA wurden fett markiert. (n=3; Messung erfolgte aber in einer zusammengefassten (engl. gepoolten) Probe)

Die Analyse der miRNA-Expression zeigte, dass einige miRNA schon bei einer geringen Strahlendosis deutlich herunterreguliert wurden und diese Veränderung konstant blieb. Andere miRNAs hingegen zeigten erst bei höheren Dosen eine veränderte Expression.

Zum frühen Zeitpunkt wiesen sechs miRNAs eine konstante und dosisunabhängige Herunterregulation der Expression auf (hsa-miR-6515-3p, hsa-miR-222-5p, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-6769-5p, hsa-miR-7152-3p und hsa-miR-378a-5p). Lediglich zwei miRNAs (hsa-miR-1268b und hsa-miR-4512) waren in ihrer Expression bereits ab der geringen Dosis von 0,25 Gy hochreguliert. Die 18 verbliebenen miRNAs wiesen eine dosisabhängige Abnahme der Expression, vor allem nach Bestrahlung mit 1 Gy und höher, auf. Sieben Tage nach Bestrahlung waren zwei miRNAs (hsa-miR-6076 und hsa-miR-6800-3p) konstant herunterreguliert, hsa-miR-5787 wies nur bis zu einer Dosis von 1 Gy eine abnehmende Expression auf. Hsa-miR-138-2-3p wurde nur bei einer Dosis von 0,25 Gy deutlich hochreguliert, bei höheren Dosen ging dieser Effekt verloren. Die miRNAs, hsa-miR-484 und hsa-miR-513b-3p, wiesen eine ungleichmäßige Veränderung auf. Hsa-miR-484 wurde bis zu einer Dosis von 0,5 Gy hochreguliert und bei höheren Dosen (1 Gy und 2 Gy) herunterreguliert. Die hsa-miR-484 war die einzige miRNA, welche zu beiden Zeitpunkten in ihrer Expression deutlich verändert war. Ein gegensätzlicher Effekt war bei hsa-miR-513b-3p zu beobachten, bis zu einer Dosis von 1 Gy erfolgte eine Herunterregulation, ab 2 Gy wurde diese miRNA signifikant hochreguliert.

3.1.8 Proteomanalyse nach Bestrahlung

Die Diagramme in Abbildung 17 zeigen die Anzahl der, in ihrer Proteinsynthese, signifikant herunter- bzw. hochregulierten Proteine für die drei Messzeitpunkte (30 min, 48 h und 7 d) und innerhalb dieser Zeitpunkte gemeinsam regulierten Proteine.

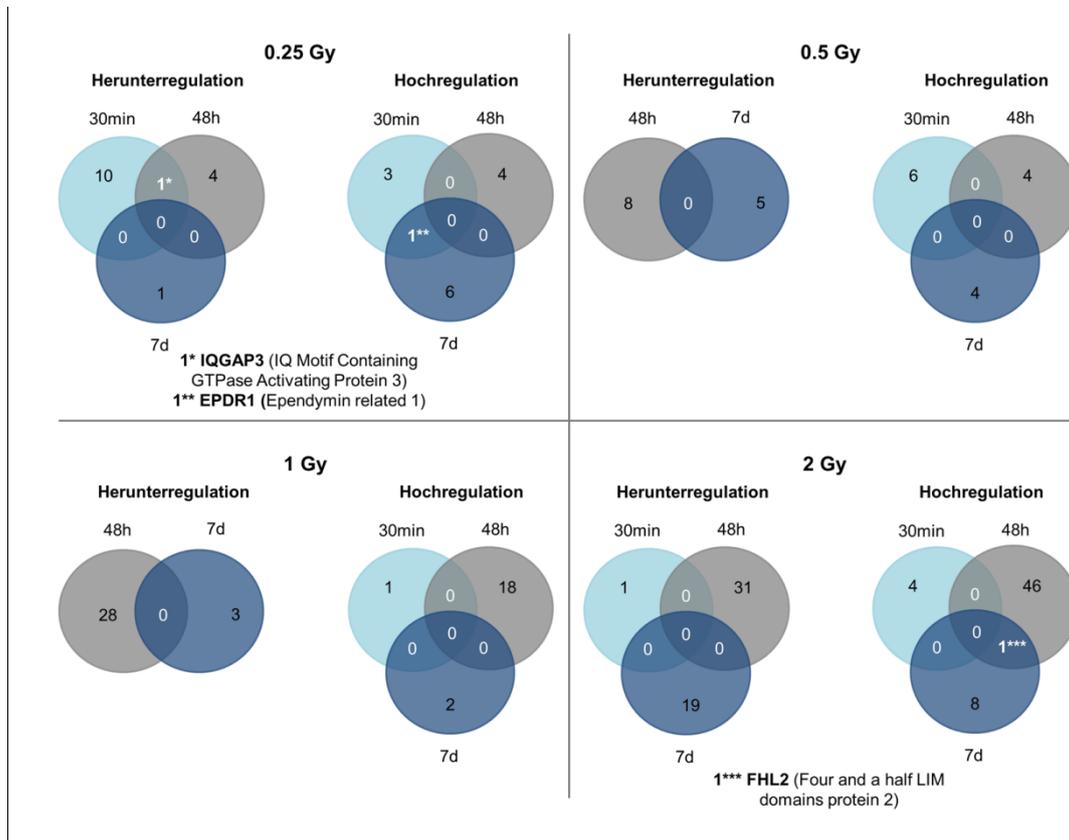


Abbildung 17: Quantitative Darstellung der signifikant regulierten Proteine. In den Venn-Diagrammen ist die Anzahl der signifikant herunter- bzw. hochregulierten Proteine für die drei Messzeitpunkte (30 min, 48 h und 7 d) sowie die innerhalb dieser Zeitpunkte gemeinsam regulierten Proteine dargestellt.

Nach Photonenbestrahlung mit 0,25 Gy waren insgesamt 16 Proteine herunterreguliert. Das Protein *IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 3* (IQGAP3) wurde sowohl nach 30 min als auch nach 48 h signifikant herunterreguliert. Bei gleicher Bestrahlungsdosis wurden 14 Proteine hochreguliert. Das Protein *Ependymim related 1* (EPDR1) wurde sowohl nach 30 min als auch nach 7 d signifikant hochreguliert. Bei einer Bestrahlung mit 0,5 Gy waren 13 Proteine herunterreguliert und 14 Proteine in ihrer Synthese hochreguliert. Jedoch gab es hier keine Proteine welche zu mehreren Zeitpunkten reguliert wurden. Die Anzahl der signifikant regulierten Proteine stieg mit ansteigender Bestrahlungsdosis, dies war deutlich ab 1 Gy zu erkennen. Auffällig war, dass bei 1 Gy 30 min nach Bestrahlung keine signifikanten

Veränderungen in der Herunterregulation von Proteinen detektiert werden konnte. Lediglich die zwei Messpunkte 48 h und 7 d wiesen insgesamt 31 hochregulierte Proteine auf. Bei gleicher Bestrahlungsdosis wurden 21 Proteine hochreguliert. Bei 2 Gy konnten 51 signifikant herunterregulierte und 59 hochregulierte Proteine detektiert werden. Das Protein *Four and a half LIM domain s protein 2* (FHL2) wurde sowohl 48 h als auch 7 d nach Bestrahlung signifikant hochreguliert.

Mit Hilfe des Softwareprogrammes Cytoscape [62] und der dazugehörigen Applikation Clue GO [63,64] sowie der GOtrack-Datenbank (<https://gotrack.msl.ubc.ca/>) konnte eine Netzwerkanalyse der signifikanten Proteine durchgeführt werden und somit bestimmten Prozessen innerhalb der Zelle zugeordnet werden (Abbildung 18).

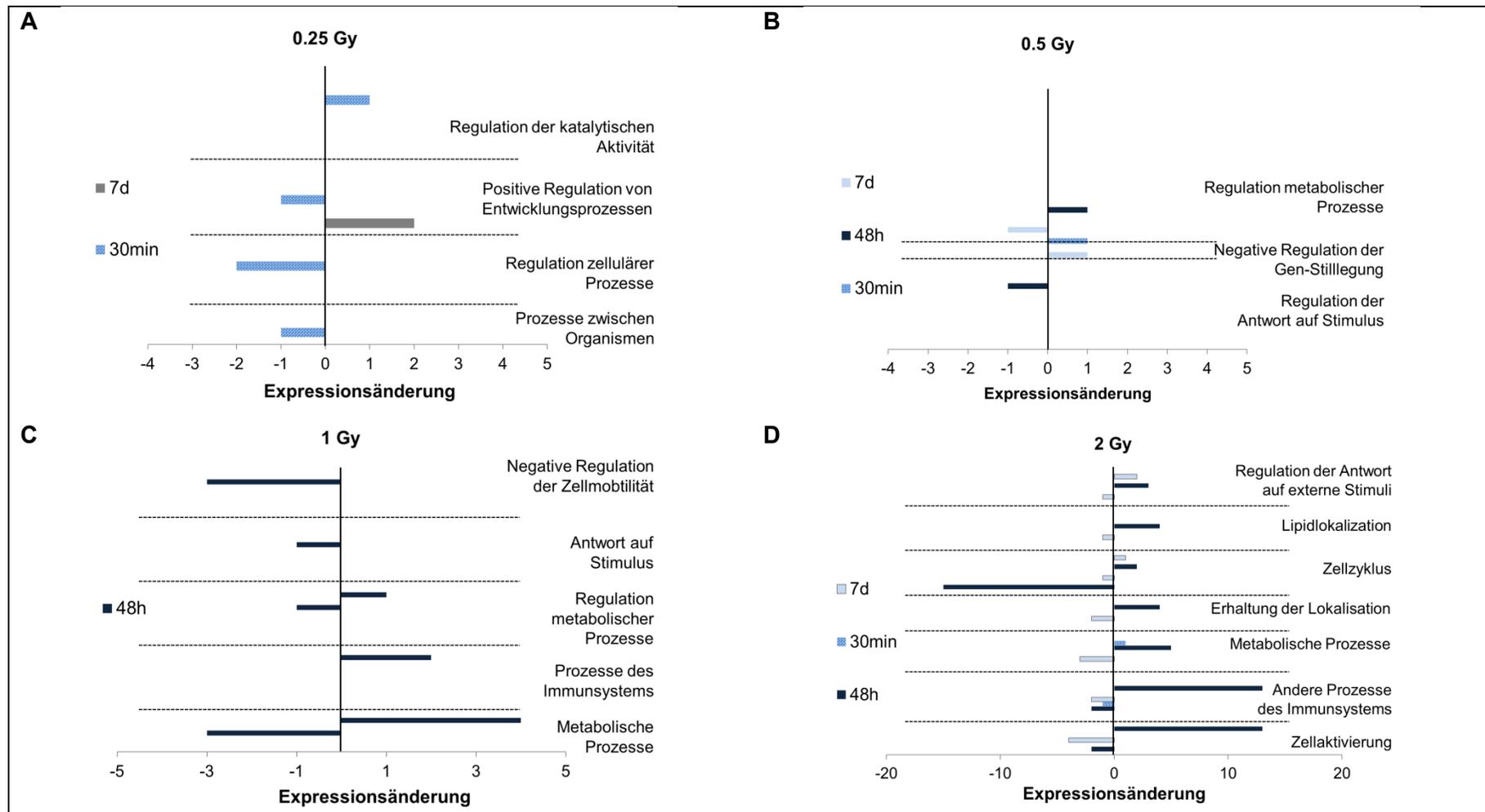


Abbildung 18: Darstellung einer Netzwerkanalyse der signifikant hoch- oder herunterregulierten Proteine der MCF10A-Zellen nach Photonenbestrahlung. Die Proteomanalyse erfolgte an drei verschiedenen Zeitpunkte (30 min, 48 h und 7 d) nach der Photonenbestrahlung. Die Netzwerkanalyse wurde mit Hilfe der Software Cytoscape und der dazugehörigen Applikation Clue GO durchgeführt.

Die Netzwerkanalyse zeigte auf, dass mit zunehmender Dosis vermehrt Netzwerke von der veränderten Proteinsynthese betroffen waren. Die quantitativ und qualitativ stärksten Auswirkungen der Bestrahlung auf die Proteinproduktion im Zusammenhang mit der vorliegenden Netzwerkanalyse hatte eine Bestrahlung von mindestens 1 Gy vor allem 48 h nach Bestrahlung. Unterhalb der Dosis von 1 Gy waren vor allem Netzwerke betroffen, welche mit zellulären und regulatorischen Prozessen der Zelle beschäftigt sind. Ab 1 Gy wurden Proteine, welche im Netzwerk, (andere) „Prozesse im Immunsystem“ zusammengefasst wurden, deutlich in ihrer Synthese beeinflusst. Erst ab einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy wurden zum Beispiel Proteine signifikant reguliert, welche laut Netzwerkanalyse im Zusammenhang mit dem Zellzyklus stehen. Die vorliegende Netzwerkanalyse zeigte keine direkten Veränderungen in Netzwerken, welche sich mit radiobiologischen relevanten Punkten wie dem Zellüberleben oder der DNA-Reparatur beschäftigen.

3.2. *In vivo*-Untersuchungen zum Einfluss der unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten auf eine mögliche Karzinogenese der Normalgewebszellen der Brust

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, war es das Ziel eine potentielle karzinogene Wirkung der unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten (Photonen, Neutronen mit breitem Energiespektrum, sowie monoenergetischen und sekundär gestreuten Neutronen) *in vivo* zu untersuchen. Da *in vitro* jedoch die Möglichkeiten zur Untersuchung bezüglich der potentiellen Tumorentstehung begrenzt sind, sollte dies *in vivo* am Mausmodell der NOD-SCID-Mäuse betrachtet werden. Aus diesem Grund wurden zwei Transplantationsmodelle etabliert und miteinander verglichen, um dann das am besten geeignete Modell für die Xenotransplantation auswählen zu können. Die mit den unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten behandelten MCF10A-Normalgewebszellen wurden dafür in die Versuchstiere transplantiert und nach einem Beobachtungszeitraum von sechs Monaten die Proben auf eine mögliche Karzinogenese untersucht. Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Biol. Monique Zwar und Frau Meike Riedel (Medizinisch-technische Assistentin) durchgeführt.

3.2.1 Testung der maximalen Lebensdauer der Versuchstiere

Anhand der *in vivo*-Experimente dieser Arbeit sollten langfristige Auswirkungen der Bestrahlung auf die humanen Brustepithelzellen untersucht werden. Angaben zum Langzeitüberleben der NOD-SCID-Mäuse gab es nur wenige. Shultz et al. (1995) beschrieben eine Lebensdauer von 269,5 +/- 23,1 Tagen (~8,8 Monate) für Weibchen [72]. Direkt vom Lieferanten kamen Angaben von ~8,5 Monaten. Daher wurde zu Beginn der *in vivo*-Experimente die Lebensdauer der NOD-SCID-Mäuse unter den vorliegenden Laborbedingungen getestet (Tabelle 15). Die Mäuse wurden dafür in individuell ventilierten Käfigen unter spezifisch pathogenfrei (SPF)-nahen Bedingungen gehalten, wöchentlich überwacht, jedoch keiner Behandlung unterzogen.

Tabelle 15: Untersuchung zum Langzeitüberleben der NOD-SCID-Mäuse

Identifikationsnummer der Maus	Lebensdauer (Wochen+Tage)
3/1/008	30+3
3/2/009	58+2
3/3/010	45+5

Die mittlere Überlebensdauer der NOD-SCID-Mäuse betrug 10,3 Monate (44 Wochen und sechs Tage). Somit konnte ein Nachbeobachtungszeitraum von bis zu sechs Monaten angestrebt werden. Als Haupttodesursache wurden sowohl vom Lieferanten sowie von Shultz et al. [72] spontane Thymuslymphome beschrieben. Diese traten auch bei den drei Versuchstieren auf.

3.2.2 Etablierung der zwei Xenograftmodelle

Für die *in vivo*-Transplantation der humanen Zellen in die NOD-SCID-Mäuse standen sowohl die von Proia & Kuperwasser (2006) beschriebene orthotope Transplantationsmethode (*mammary fat pad model*), als auch das Setzen eines Transplantats unterhalb der murinen Nierenkapsel, beschrieben von Eirew et al. (2010), zur Verfügung [55,70]. Beide Transplantationsmethoden sind als Xenotransplantationen zu bezeichnen, da lebende Zellen zwischen Individuen verschiedener Spezies übertragen werden. Die Methoden wurden zu Beginn im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Anschließend erfolgte die Auswahl der für die vorliegende Fragestellung passendsten Methode.

3.2.2.1 Subrenal capsule assay

Die Transplantation unterhalb der Nierenkapsel, das *subrenal capsule assay* nach Eirew et al., wird als heterotop bezeichnet, da Herkunftsort (Brustepithel) und Transplantationsort (zwischen Niere und Nierenkapsel) nicht übereinstimmen. Im Vergleich zum *mammary fat pad model* ist dieser Eingriff invasiver, da die Körperhöhle der Maus geöffnet und die Niere anschließend ausgelagert wurde. Die Zugänglichkeit der Nieren variiert auch zwischen den zwei Körperhälften. Dieser Vorgang war kompliziert, da die Lokalisation der Schnitte entscheidend für das erfolgreiche Auslagern der Niere war. Vorzugsweise befand sich der Schnitt oberhalb der Niere (Abbildung 19). Da es schwierig war die Niere von außen genau zu lokalisieren, wurde als Hilfsmittel ein Stift unterhalb der Maus positioniert. Durch die Wölbung im Oberkörper zeichnete sich in einigen Fällen die Niere leichter ab. Dies variierte aber, bedingt durch die anatomische Lage zwischen den beiden Körperseiten. Korrekturen, also Vergrößerungen des Schnittes führten dazu, dass die Auslagerung der Niere nicht einwandfrei funktionierte, da das Organ dann nicht ohne zusätzliche Fixierung am Zurückgleiten in die Körperhöhle gehindert werden konnte. (Abbildung 19°D). Jegliche zusätzliche Fixierung mit Hilfe der Pinzetten konnte bereits eine Schädigung der Nierenkapsel, welche als dünne Haut um die Niere gespannt ist, verursachen. Die Nierenkapsel wurde während des gesamten

Eingriffes stetig mit einer NaCl-Lösung feucht gehalten, da sie durch Austrocknung leicht einreißt. Die Konsequenz eines Einreißens der Nierenkapsel wäre das Euthanasieren des Versuchstieres gewesen, da das Überleben ohne bzw. mit eingerissener Nierenkapsel nicht vertretbar war.

Das Setzen des Schnittes in die Nierenkapsel verlief problemlos, jedoch zeigte sich, dass das Einsetzen der Kollagen-Gele, welche die zu transplantierenden Zellen enthielten, sehr problematisch war. Die Gele mussten weit genug entfernt von der Öffnung der Nierenkapsel liegen, damit sie nicht wieder herausgleiten konnten. Zudem durfte die Niere nicht beschädigt werden. Um die Gele unterhalb der Nierenkapsel auf der glatten Struktur der Niere verschieben zu können, wurden einige Instrumente wie Spritzen, abgeflamnte Glaspipetten und Flexülen ausgetestet (Abbildung 19 E-G). Keines der Objekte zeigte eine optimale Leistung; die Anheftung zwischen Transplantat und Niere bzw. Nierenkapsel war sehr hoch und damit ein einfaches Verschieben der Gele nur schwer möglich. Problematisch war zudem, dass zeitgleich permanent der Schnitt in der Nierenkapsel mit einer Pinzette offen gehalten werden musste.

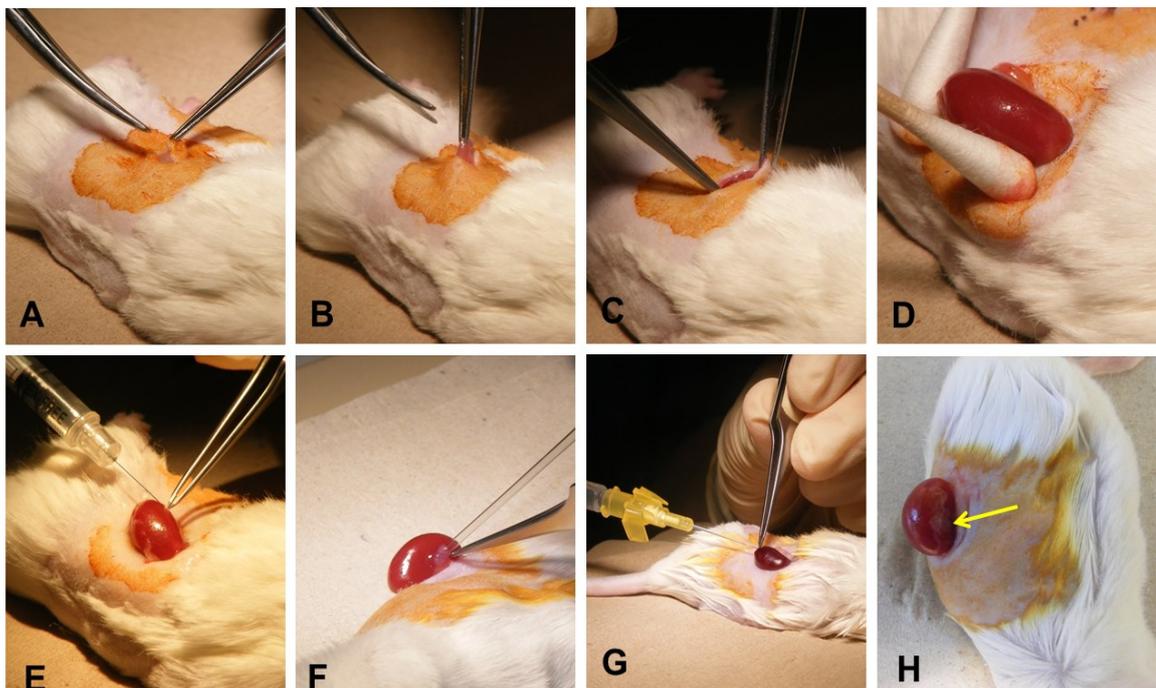


Abbildung 19: Schrittweise Darstellung des *subrenal capsule assay* an NOD-SCID-Mäusen. Setzen eines ca. 1 cm großen Schnittes direkt unterhalb des Rippenbogens einer seitlich liegenden Maus (A), Freipräparieren der einzelnen Hautschichten und Eröffnung der Abdominalwand mit einem kleineren Schnitt (B), visuelle Lokalisation der Niere (C), Auslagerung der Niere durch leichten Druck der Daumen und Zeigefinger (D), Setzen eines Transplantats mit Hilfe einer Spritze (E), Positionieren des Transplantats mit Hilfe einer abgeflamnten Glaspipette (F), Positionieren des Transplantats mit Hilfe einer Flexüle (G), erfolgreich injiziertes Transplantat (gelber Pfeil) unterhalb der murinen Nierenkapsel (H)

Bei dieser Prozedur kam es sehr häufig zum weiteren Einreißen der Nierenkapsel, was wie schon beschrieben zur Folge hatte, dass das Versuchstier aus dem Versuch genommen und euthanasiert werden musste. Die Etablierung der Methode bzw. das Setzen der Kollagen-Gele war durchaus erfolgreich (Abbildung 19 H), durch die Schwierigkeiten bei dem Verschieben der Gele war die Reproduzierbarkeit jedoch schwer zu gewährleisten. Weiterhin wurde eine hohe Sterberate während der Operation einkalkuliert, da das Einreißen der Nierenkapsel bei allen Vorsichtsmaßnahmen sehr schnell erfolgen konnte und dieser Schaden für das Tier nicht zu beheben war.

Vorteilhaft an dieser Methode war, dass die Transplantation im Rahmen nur eines operativen Eingriffes erfolgen konnte. Während der Beobachtungszeit wäre ein mögliches Tumorwachstum an der Niere aber nur sehr schwer nachweisbar und zu kontrollieren gewesen.

3.2.2.2 Mammary fat pad model

Die Transplantation von humanen Zellen in die Region der vierten Brustdrüse einer Maus, das *mammary fat pad model* nach Kuperwasser et al. (2004) [54]., wird als orthotop bezeichnet, da nicht nur die anatomische Lage, sondern auch eine Übereinstimmung der histologischen/funktionellen Merkmale vorliegt. Diese Methode ist weniger invasiv, da lediglich die erste Hautschicht geöffnet wird und keine Eingriffe innerhalb der Körperhöhle durchgeführt werden. Die Transplantation erfolgt jedoch in zwei operativen Eingriffen.

Nach der Fellrasur konnten die Brustdrüsen der Maus leicht lokalisiert werden. Das Setzen des Schnittes verlief unkompliziert, da durch das vierte und fünfte Brustdrüsenpaar äußerliche Anhaltspunkte gegeben waren (Abbildung 20 A). Die Lokalisation des Transplantationsortes war nicht abhängig von der Schnittgröße, Schnitterweiterungen konnten jederzeit vorgenommen werden, und bei jeder Maus war die Brustdrüse anatomisch gut zu erkennen. Unterhalb der vierten Brustdrüse musste der Lymphknoten mit den drei zulaufenden Blutgefäßen identifiziert werden, was nahezu bei jedem Versuchstier möglich war (Abbildung 20 B-C). Die Handhabung des Kauterisierens, der Gewebeentnahme und das Injizieren der Transplantate (Abbildung 20 D-G) wies zu keiner Zeit ein Risiko auf, dem Versuchstier mögliche irreparable Schäden zu zufügen und das Tier euthanasieren zu müssen. Durch die Gewebeentnahme war die Injektion der Zellen erschwert. Es kam häufiger vor, dass beim Einstechen der Spritzennadel in die dünne Hautschicht gleichzeitig die Haut auf der anderen Seite durchstoßen wurde und somit das Transplantat auslief. In diesem Fall, wurde das Volumen des ausgelaufenen Materials durch die Reservetransplantate ersetzt. Der Umstand,

dass 14 Tage später eine zweite Operation mit der Transplantation der Brustepithelzellen an der gleichen Stelle durchgeführt wurde, stellte kein Problem dar.

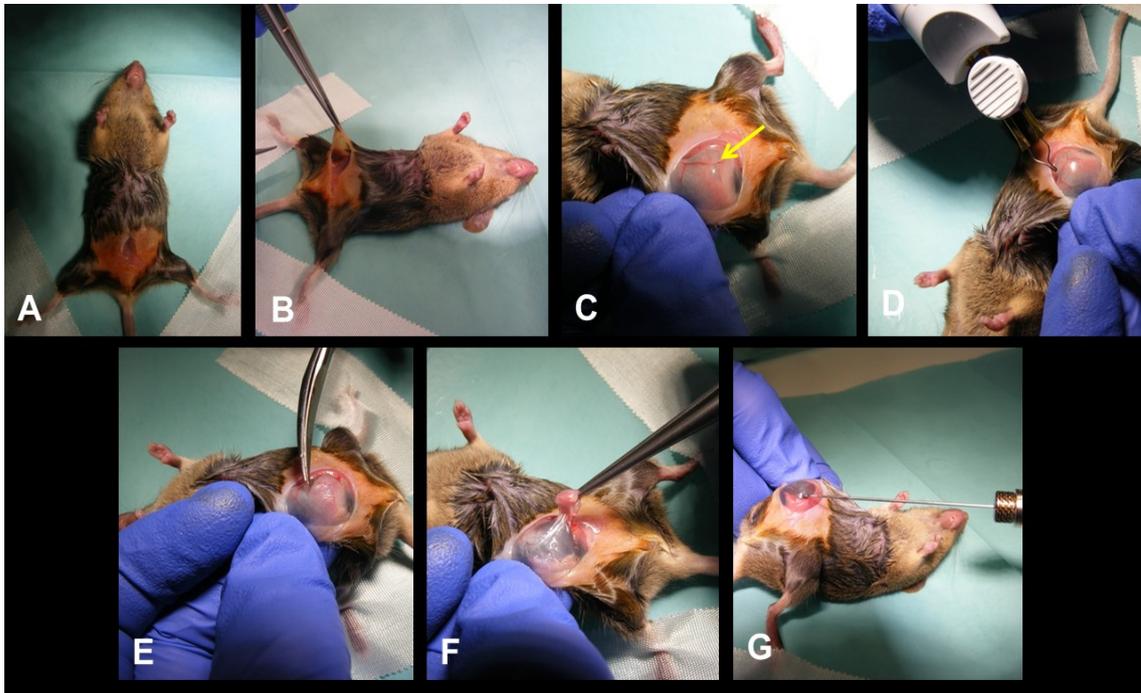


Abbildung 20: Schrittweise Darstellung des *mammary fat pad-model* an NOD-SCID-Mäusen. Setzen eines Y-förmigen Schnittes zwischen dem vierten und fünften Brustdrüsenpaar (A), Freipräparieren der einzelnen Hautschichten (B), Lokalisation des Lymphknotens mit den drei zulaufenden Blutgefäßen (gelber Pfeil) unterhalb der vierten Brustdrüse (C), Kauterisation der Blutgefäße (D), Freipräparieren des Lymphknotens (E), Entnahme des Gewebes inklusive Lymphknoten (F) und Injektion der Zellen in das gereinigte Fettpolster (G).

Dieses Xenograftmodell gewährleistete, durch die unkomplizierte Durchführung und die günstige anatomische Lage des Transplantationsortes, eine hohe Reproduzierbarkeit. An beiden Körperseiten der Maus konnten gleichermaßen gut und zeitgleich, bei einer gemeinsamen Schnittführung, Transplantationen vorgenommen werden. Die Transplantation erforderte aber stets zwei operative Eingriffe innerhalb von zwei Wochen.

3.2.3 Vergleich und Auswahl des geeigneten Xenograftmodells

Nach erfolgreicher Etablierung beider Xenograftmodelle wurde das *mammary fat pad model*, die orthotope Transplantation in das murine Brustgewebe, als Xenograftmodell ausgewählt. Diese Entscheidung beruht auf folgenden Kriterien: einer unkomplizierteren Durchführung, bessere Reproduzierbarkeit, geringere Sterblichkeitsrate und weniger Stress für die Versuchstiere.

Durch die unkomplizierte Durchführung des *mammary fat pad model* im Vergleich zum zweiten Xenograftmodell war eine höhere Reproduzierbarkeit sowie eine geringere Sterblichkeit der Versuchstiere während des operativen Eingriffes gegeben. Diese beiden Kriterien sowie der daraus resultierende geringere Bedarf an Versuchstieren, waren entscheidend für die Versuchsdurchführung, da die Gesamtzahl an Versuchstieren beschränkt war. Ein weiterer Vorteil des *mammary fat pad-model* war, dass das Abdomen nicht eröffnet werden musste, wodurch den Tieren weniger körperlicher Stress infolge der Transplantation zugemutet wurde, trotz dass dieses Xenograftmodell aus zwei operativen Eingriffen besteht. Die hohe Sterberate der Versuchstiere beim Nierenkapselmodell war bedingt durch das notwendige Euthanasieren der Tiere bei Schädigung der Nierenkapsel. Dieses konsequente Vorgehen war bei dem *mammary fat pad model* nicht notwendig, da durch den operativen Eingriff keine lebenswichtigen Organe verletzt wurden.

Zudem war die Nachbeobachtung einer möglichen Tumorentstehung und die Erfassung tumorspezifischer Parameter (z. B. Tumorgroße) beim *mammary fat pad model* besser gegeben, da sich mögliche Tumore unterhalb der Haut bilden und ab einer bestimmten Größe mit einer Schiebelehre messbar waren. Ein weiterer wesentlicher Punkt, die orthotope Transplantation der heterotopen Transplantation vorzuziehen, war, dass durch dieses Transplantationsmodell der Ursprungsort der Zellen (Brustepithel) mit dem Transplantationsort (murines Brustdrüsengewebe) übereinstimmte.

Aufgrund dieser Entscheidung ergab sich folgender zeitlicher Ablauf des Transplantationseingriffes (Abbildung 21).

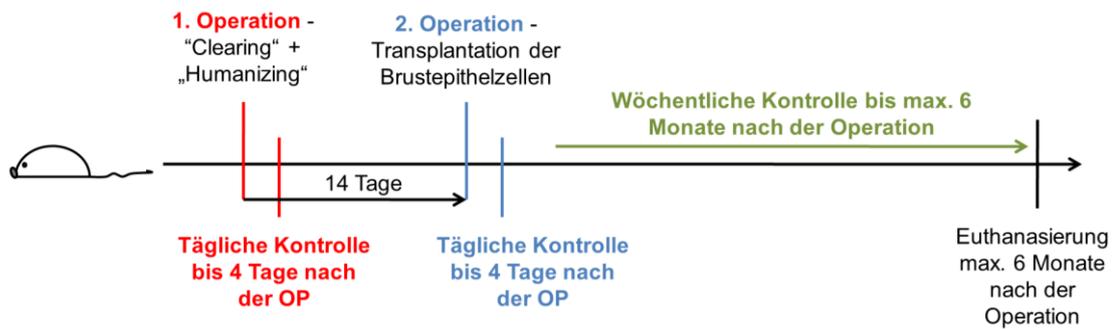


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf für die *in vivo*-Transplantationen unter Nutzung des *mammary fat pad model* an NOD-SCID-Mäusen. Der erste operative Eingriff erfolgte an einer drei bis fünf Wochen alten Maus und umfasst die Schritte „*Clearing*“ (Entfernung des murinen Brustdrüsenepithels) und „*Humanizing*“ (Transplantation der humanen Fibroblasten). 14 Tage nach erfolgreicher Operation mit anschließender Kontrolle erfolgt die zweite Operation bei der die humanen Brustepithelzellen transplantiert wurden. Im Anschluss begann erneut ein viertägiger Beobachtungszeitraum, der nach maximal sechs Monaten mit der Euthanasierung der Tiere endete.

Versuchstiere im Alter von drei bis fünf Wochen wurden der ersten Operation („*Clearing*“ und „*Humanizing*“) unterzogen. Anschließend erfolgte für vier Tage eine Analgesie. Nach 14 Tagen fand dann die zweite Operation mit der Transplantation der humanen Brustepithelzellen statt. Auch hier erfolgte eine Analgesie für vier Tage. Es folgte eine Phase in der das Monitoring der Versuchstiere im wöchentlichen Abstand durchgeführt wurde. Da sich auch unabhängig von der Transplantation der Zustand der Versuchstiere verschlechtern kann, wurde dieser mit Hilfe verschiedener Bewertungskriterien (Aktivität, Fellpflege, Gewicht, Atmung, Schmerzen und Tumorgröße) des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Bewertungsbogens (*score sheet*) erfasst (siehe Anhang, Abbildung A.1). Veränderungen der Versuchstiere wurden mit Punkten von null bis vier bewertet, wobei ein Gesamtwert von zwei eine tägliche Kontrolle gegebenenfalls mit Analgesie nach sich zog und ein Gesamtwert von vier eine sofortige Beendigung des Versuches für das jeweilige Tier mit Hilfe einer zervikalen Dislokation unter vorangegangener Narkosegabe zur Folge hatte. Nach einer maximalen Beobachtungszeit von sechs Monaten wurde der Versuch beendet, die Versuchstiere euthanasiert und das Gewebe der vierten Brustdrüse als Probe für weitere Untersuchungen entnommen. Für die Durchführung des *mammary fat pad model* wurden laut Proia & Kuperwasser [70] drei Wochen alte Versuchstiere empfohlen, da in diesem Alter das Brustepithel noch undifferenziert ist. Aufgrund logistischer Rahmenbedingungen wurden fünf Wochen alte Versuchstiere verwendet. Diese wiesen aber ebenfalls noch ein wenig differenziertes Brustepithel auf (Abbildung 22), es waren hauptsächlich Fettzellen und vereinzelte Milchgänge zu finden.

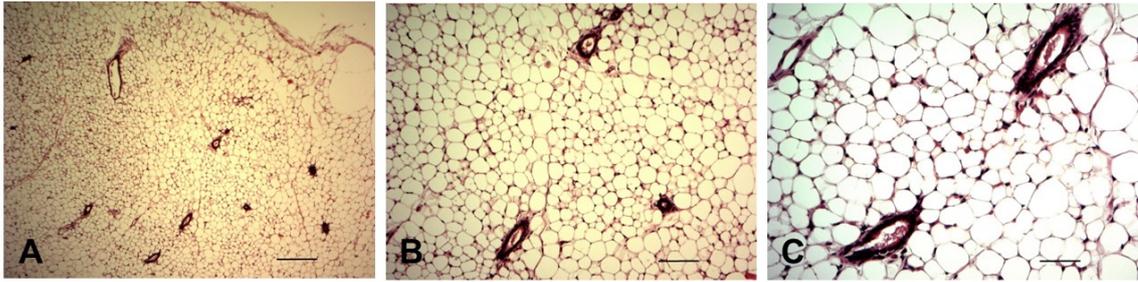


Abbildung 22: Histologische Darstellung des juvenilen Mausgewebes der NOD-SCID-Mäuse im Bereich der Brustdrüse. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte des Brustgewebes einer fünf Wochen alten Maus zeigen noch undifferenziertes Gewebe mit vielen Fettzellen und einigen Milchgängen bei einer Vergrößerung von 40x (A; Maßstab 100 µm), 100x (B; Maßstab 40 µm) und 200x (C; Maßstab 20 µm).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden vier verschiedene Einsaatdichten der humanen Normalgewebszellen, zwischen 1.000 und 100.000 Zellen pro Transplantat, getestet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Austestung der verschiedenen Einsaatdichten

Versuchstiernummer	Einsaatdichte der Normalgewebszellen pro Transplantat
7/1/20	links: 1.000; rechts: 100.000
7/2/21	links: 50.000; rechts: 100.000
7/3/22	links: 50.000; rechts: 10.000
7/4/23	links: 1.000; rechts: 10.000

Nach vier Monaten wurden die Proben entnommen und immunhistologisch auf Zellen humanen Ursprungs untersucht. Hierfür wurde der Antikörper anti-human nuclei verwendet, welcher spezifisch an den Zellkernen humaner Zellen bindet (Abbildung 23). Nach Analyse der vier verschiedenen Konzentrationen wurde die Einsaatdichten von 50.000 - 100.000 Zellen pro Transplantat gewählt, da bei dieser Einsaatdichte das Ergebnis der detektierten Zellen am vielversprechendsten war.

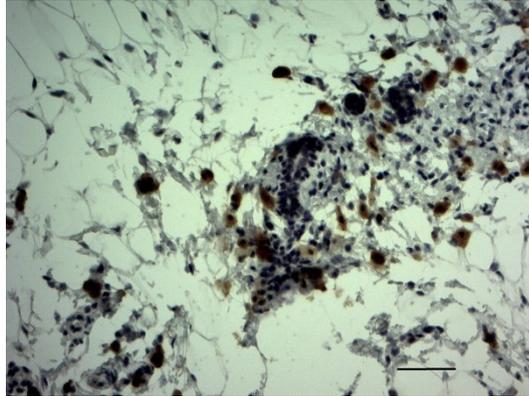


Abbildung 23: Detektion der humanen Epithelzellen in den Gewebeproben der NOD-SCID-Mäusen. Immunhistologisch mit anti-Human Nuclei-Antikörper angefärbt (positiv detektierte Zellen sind durch Braunfärbung zu erkennen). 200x-Vergrößerung (Maßstab entspricht 20 µm).

3.2.4 Hormonelle Stimulation zur Induktion einer Scheinschwangerschaft

Hintergrund des ANDANTE-Projektes war es, den Einfluss der bei einer Protonentherapie unerwünscht generierten gestreuten Neutronenstrahlung zu untersuchen, da sich im jungen Erwachsenenalter nach einer primären Protonenstrahlentherapie im Kindesalter, vermehrt Sekundärtumore, z. B. im Bereich der Mamma, ausbilden können. Die Zeitspanne von der primären Strahlentherapie bis zum Erscheinen des Sekundärtumors ist sehr groß und in dieser Zeit findet eine enorme körperliche Entwicklung der Patientinnen statt. Durch die hormonelle Stimulation und die damit einhergehenden Ausbildung der sekundären Geschlechtsorgane und den Menstruationszyklus durchläuft die humane Brust eine enorme Entwicklung und unterliegt einem stetigen Wandel. Um im Tiermodell vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde entschieden, die Versuchstiere ebenfalls einer hormonellen Stimulation zu unterziehen.

Es wurden mehrere Möglichkeiten wie z. B. Applikation über Futtermittel bzw. Wasser, eine tägliche Injektion, osmotischen Pumpen und langsam freisetzende Hormonpellets (*slow release pellets*) in Betracht gezogen, jedoch aus folgenden Gründen verworfen:

Bei der Hormonapplikation über das Futtermittel bzw. Wasser bestand keine Möglichkeit zu kontrollieren wieviel Hormon das einzelne Tier zu sich genommen hat, da die Tiere *ad libitum* gefüttert und zu viert im Käfig gehalten wurden. Eine tägliche Injektion hätte den Vorteil, dass jedes Tier die geplante Dosis an Hormonen appliziert bekommt, jedoch wäre eine tägliche Injektion ein zu hoher Stressfaktor für die Tiere. Daher wurde auch diese Möglichkeit ausgeschlossen. Zudem ist die schwere Wasserlöslichkeit von Hormonen wie z. B. β -Estradiol und Progesteron ein Hindernis, optimale Lösungsmittel wären laut Herstellerangaben (u. a. Sigma Aldrich) z. B. Ethanol, DMSO, Chloroform und Pflanzenfette. Dies war ebenfalls

ungeeignet da Substanzen wie DMSO und Chloroform ohnehin toxisch wirken. Desweiteren wurden osmotische Pumpen, welche im Nackenbereich operativ eingesetzt, sowie *slow release pellets*, welche ebenfalls unter die Haut transplantiert werden, in Erwägung gezogen. Beide Möglichkeiten müssen in zusätzlichen operativen Eingriffen eingesetzt bzw. erneuert werden, da die Freisetzung der Hormone nur auf einen bestimmten Zeitraum begrenzt ist.

Aus diesen Gründen und um das Stresslevel der Tiere so gering wie möglich zu halten, wurde darauf verzichtet und die hormonelle Stimulation stattdessen mit Hilfe vasktomierter Mausböcke die Induktion einer Scheinschwangerschaft zwei Wochen nach der Transplantation der Brustepithelzellen herbeigeführt (Abbildung 24).

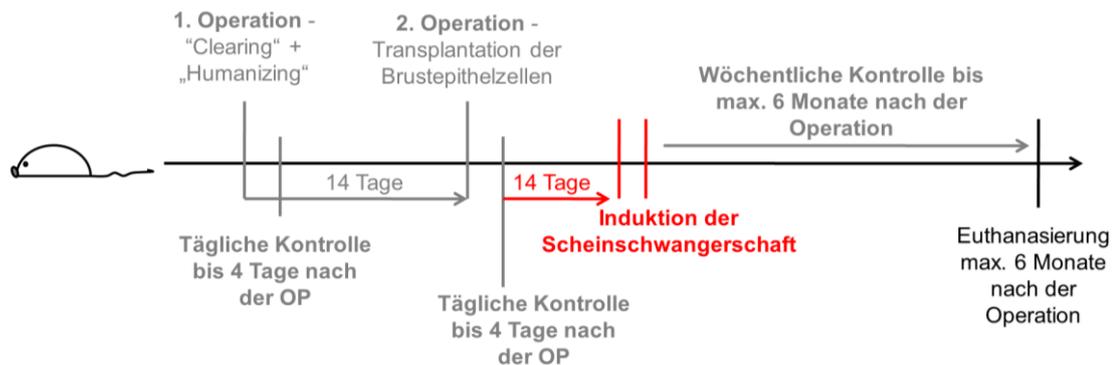


Abbildung 24: Zeitliche Einordnung der Scheinschwangerschaftsinduktion. 14 Tagen nach der zweiten Operation begann die Induktion einer Scheinschwangerschaft mit Hilfe vasktomierter Mausböcke.

Hierfür wurden die weiblichen Versuchstiere mit vasktomierten Mausböcken für maximal fünf Tage (1. Induktion) verpaart und täglich auf einen Vaginalpfropf kontrolliert. Die Funktion des Vaginalpfropfes ist das Zurückhalten der Spermien in der Vagina, der Pfropfen besteht aus einem Sekret des Prostatalappens und der Samenblase. War dieser zu erkennen, war der Deckakt erfolgreich verlaufen und die Versuchstiere wurden wieder von den Mausböcken getrennt. Nicht alle Versuchstiere wurden bei der ersten Induktion erfolgreich scheinsschwanger, daher wurden maximal drei Induktionen mit jeweils unterschiedlichen Mausböcken durchgeführt. Die vasktomierten Mausböcke wurden uns vom Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar zur Verfügung gestellt.

3.2.5 Evaluation der *in vivo*-Ergebnisse

Nach einer Beobachtungszeit von maximal sechs Monaten wurden die Versuchstiere euthanasiert, Gewebeproben entnommen und histologisch aufgearbeitet sowie anschließend durch Pathologen befundet. Insgesamt wurden 145 Versuchstiere analysiert, davon wiesen 39 Proben einen pathologischen Befund auf (Tabelle 17).

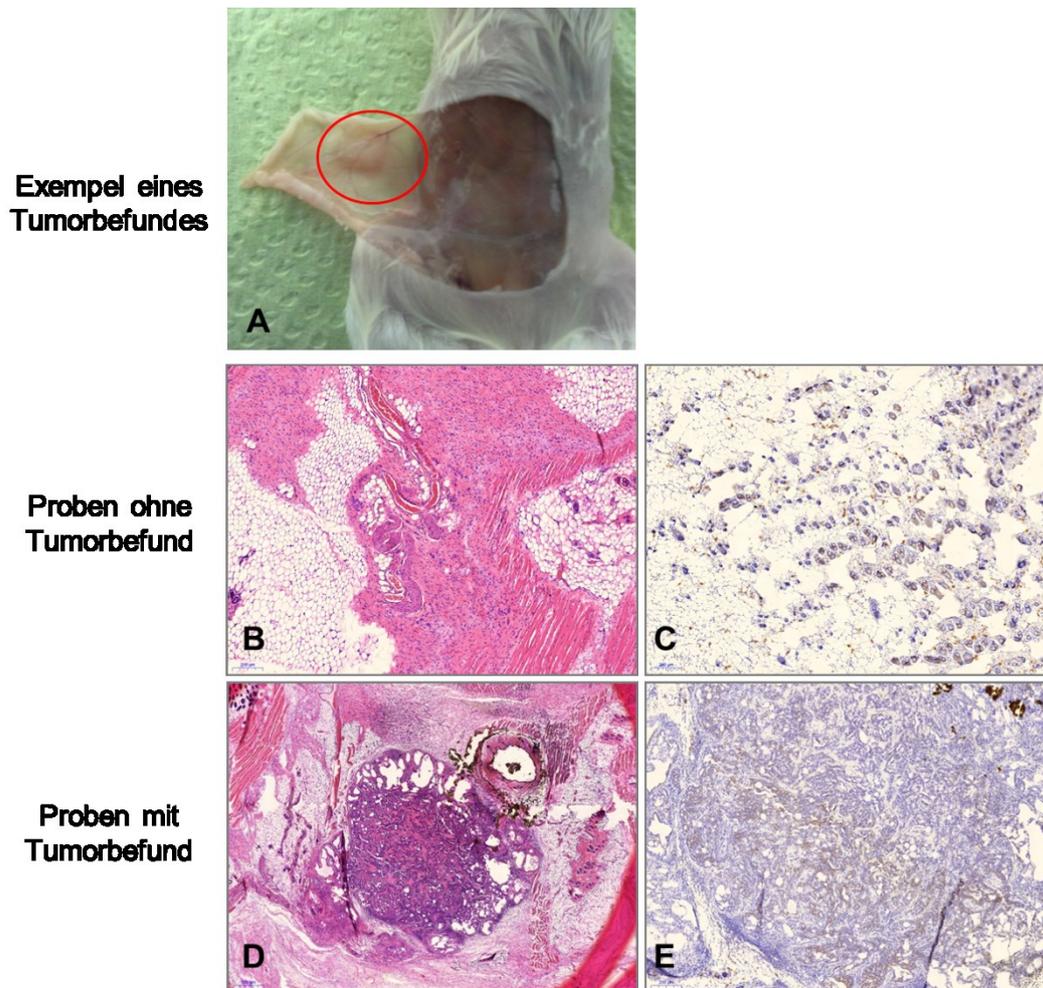


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung eines Tumorbefundes sowie immunhistologische Aufarbeitung der Proben. (A) Versuchstier (44/4/155, rechte Seite eröffnet) weist rechtsseitig ein Mammakarzinom (innerhalb des roten Kreises) als pathologischen Befund auf. Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Proben (B+D) sowie immunhistologische Detektion von P27 (C+E) (Maßstab (links unten im jeweiligen Bild) entspricht 200 µm)

In den 39 Proben der 145 Versuchstiere, welche einen pathologischen Befund aufwiesen, konnten Tumorbefunde identifiziert werden.

Tabelle 17: Zusammenfassung aller analysierten Gewebeproben der NOD-SCID-Mäuse nach erfolgreicher *mammary fat pad model*-Xenotransplantation mit und ohne pathologischen Befund (Tumor, Hyperplasien oder chronische Inflammation). Low dose rate (LDR), high dose rate (HDR). Se (Summe)

Bestrahlungsdosis [Gy]	Summe aller analysierte Transplantate								Se	Befunde
	0	0,1	0,25	0,5	0,76	0,84	0,85	1		
220 kV X-rays HDR	14	10	4	6				11	45	32/45
220 kV X-rays LDR	8							8	16	11/16
<En>=5,8 MeV Neutronen, HDR	8	7		5				7	27	21/27
<En>=5,8 MeV Neutronen, LDR	6							5	11	8/11
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	5						5		10	9/10
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	6				6				12	12/12
sekundäre gestreute Neutronen	12	6			6				24	13/24
Summe	59	23	4	11				48	145	106/145

Bestrahlungsdosis [Gy]	Mammakarzinom								Se
	0	0,1	0,25	0,5	0,76	0,84	0,85	1	
220 kV X-rays HDR	3/14	3/10	1/4	1/6				0/11	8/45
220 kV X-rays LDR	2/8							0/8	2/16
<En>=5,8 MeV Neutronen, HDR	2/8	1/7		1/5				0/7	4/27
<En>=5,8 MeV Neutronen, LDR	3/6							0/5	3/11
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	0/5							1/5	1/10
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	0/6							0/6	0/12
sekundäre gestreute Neutronen	3/12	0/6						0/6	3/24
Summe	13/59	4/23	1/4	2/11				1/48	21/145

Bestrahlungsdosis [Gy]	Fibrosarkom								Se
	0	0,1	0,25	0,5	0,76	0,84	0,85	1	
220 kV X-rays HDR	0/14	0/10	0/4	0/6				1/11	1/45
220 kV X-rays LDR	1/8							0/8	1/16
<En>=5,8 MeV Neutronen, HDR	0/8	0/7		0/5				0/7	0/27
<En>=5,8 MeV Neutronen, LDR	0/6							0/5	0/11
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	0/5							0/5	0/10
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	0/6							0/6	0/12
sekundäre gestreute Neutronen	0/12	1/6						0/6	1/24
Summe	1/59	1/23	0/4	0/11				1/48	3/145

Bestrahlungsdosis [Gy]	Hyperplasie								Se
	0	0,1	0,25	0,5	0,76	0,84	0,85	1	
220 kV X-rays HDR	0/14	0/10	0/4	0/6				0/11	0/45
220 kV X-rays LDR	0/8							2/8	2/16
<En>=5,8 MeV Neutronen, HDR	0/8	0/7		0/5				0/7	0/27
<En>=5,8 MeV Neutronen, LDR	0/6							0/5	0/11
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	0/5							0/5	0/10
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	0/6							0/6	0/12
sekundäre gestreute Neutronen	0/12	1/6						0/6	1/24
Summe	0/59	1/23	0/4	0/11				2/48	3/145

Bestrahlungsdosis [Gy]	Chronische Entzündung								Se
	0	0,1	0,25	0,5	0,76	0,84	0,85	1	
220 kV X-rays HDR	2/14	1/10	0/4	1/6				0/11	4/45
220 kV X-rays LDR	0/8							0/8	0/16
<En>=5,8 MeV Neutronen, HDR	1/8	0/7		0/5				1/7	2/27
<En>=5,8 MeV Neutronen, LDR	0/6							0/5	0/11
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	0/5							0/5	0/10
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	0/6							0/6	0/12
sekundäre gestreute Neutronen	1/12	0/6			2/6			0/6	3/24
Summe	0/59	1/23	0/4	0/11				2/48	9/145

Bestrahlungsdosis [Gy]	Nervenscheidentumor								Se
	0	0,1	0,25	0,5	0,76	0,84	0,85	1	
220 kV X-rays HDR	0/14	0/10	0/4	0/6				0/11	0/45
220 kV X-rays LDR	0/8							0/8	0/16
<En>=5,8 MeV Neutronen, HDR	0/8	0/7		0/5				0/7	0/27
<En>=5,8 MeV Neutronen, LDR	0/6							0/5	0/11
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	0/5							0/5	0/10
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	0/6							0/6	0/12
sekundäre gestreute Neutronen	1/12	2/6						0/6	3/24
Summe	1/59	2/23	0/4	0/11				0/48	3/145

Die 39 Proben mit pathologischen Befund wiesen Mammakarzinome (21x), Fibrosarkome (3x), Hyperplasien (3x), chronische Entzündungen (9x) und Nervenscheidentumore (3x) auf (Tabelle 17). Die prozentuale Verteilung der pathologischen Befunde für die jeweilige Strahlenqualität ist in Abbildung 26 dargestellt.

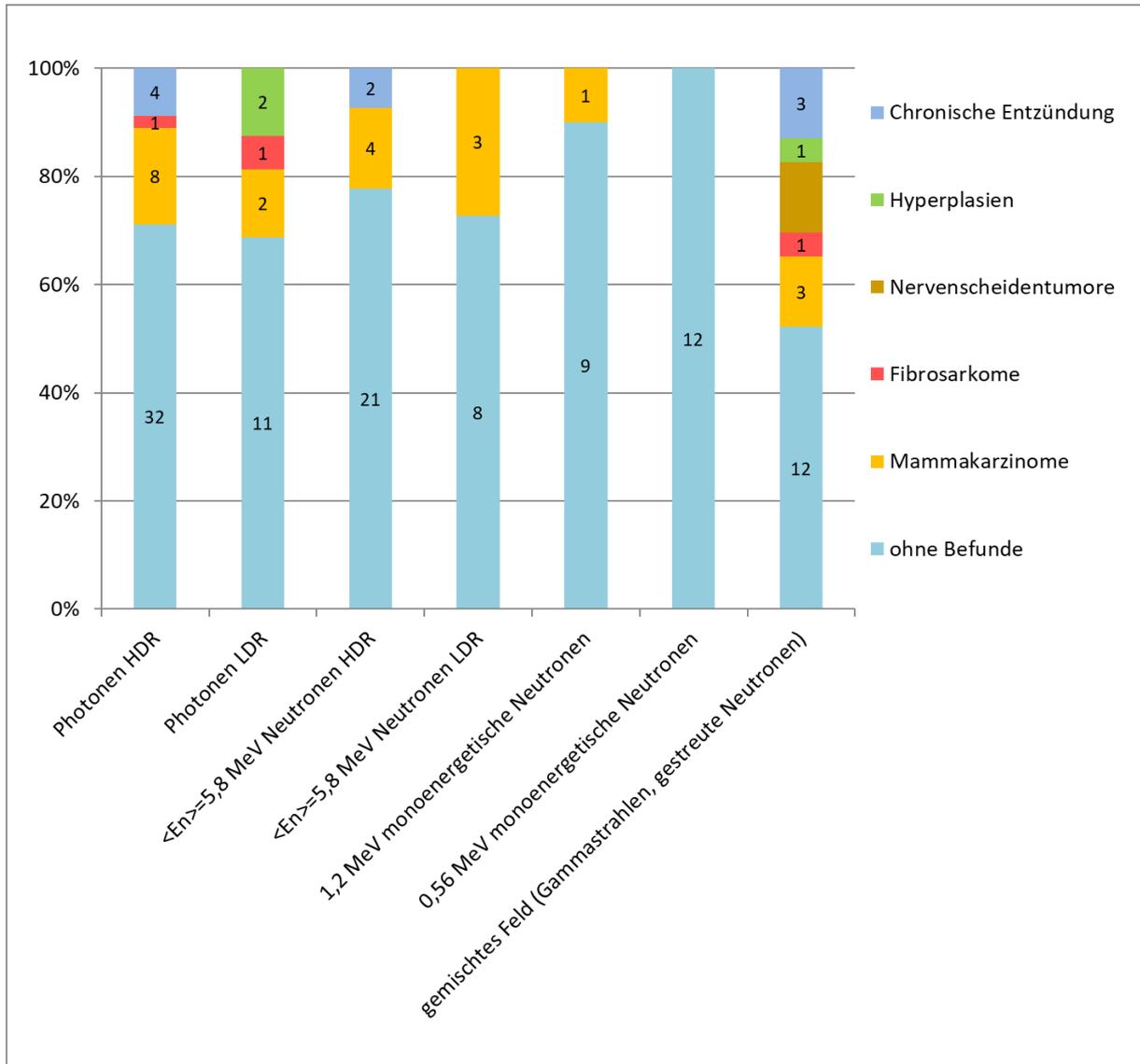


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der pathologischen Befunde aller analysierten Gewebeproben der NOD-SCID-Mäuse nach erfolgreicher *mammary fat pad model*-Xenotransplantation für die jeweilige Strahlenqualität. Low dose rate (LDR), high dose rate (HDR)

Die aufgetretenen pathologischen Befunde allen voran die Mammakarzinome und Hyperplasien wiesen keine Abhängigkeit in der Dosis und Strahlenqualität auf. Die Mammakarzinome waren vor allem in den Kontrolltieren zu finden. Für das Auftreten der Mammakarzinome wurden die spontanen Transformationsraten berechnet (Abbildung 27). Diese stellt das Verhältnis zwischen der Gesamtanzahl der Transplantate und der Anzahl an aufgetretenen Tumoren pro Dosis je Bestrahlungsart dar.

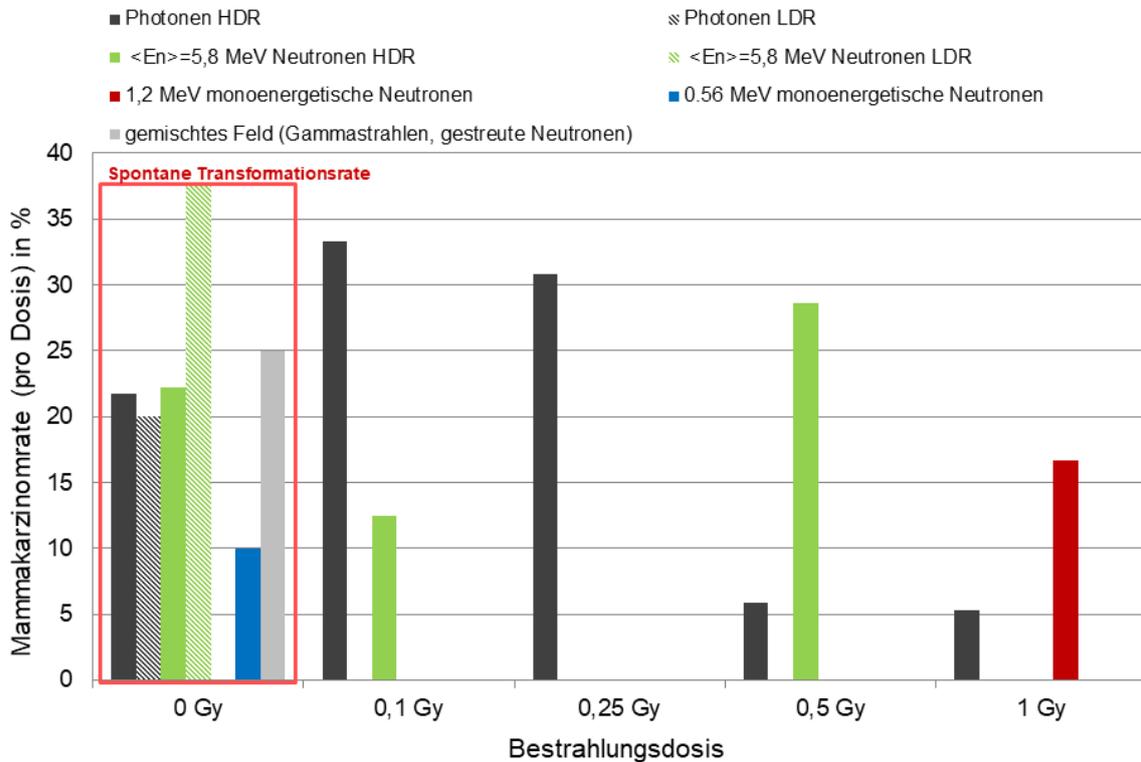


Abbildung 27: Darstellung der spontanen Transformationsrate der NOD-SCID-Mäuse nach erfolgreicher *mammary fat pad model*-Xenotransplantation. Diese Kalkulation gibt das Verhältnis zwischen der Gesamtanzahl an Transplantaten und der Anzahl an aufgetretenen Tumoren pro Dosis je Bestrahlungsart dar. Low dose rate (LDR), high dose rate (HDR)

Beispielsweise traten in der Kontrollgruppe der Photonen (HDR) drei Mammakarzinome bei 14 Transplantaten auf (Tabelle 17), dies wurde mit einer Transformationsrate von 21,4 % angegeben. Basierend auf der Berechnung der Transformationsrate für alle angewendeten Dosen (0,1 Gy, 0,25 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy) und Strahlenqualitäten, ergaben sich keine ersichtlichen Anzeichen für eine Abhängigkeit bezüglich der Dosis oder Strahlenqualität.

Desweiteren wurden die Proben, welche ein Mammakarzinom, Fibrosarkom oder einen Nervenscheidentumor aufwiesen, immunhistochemisch auf das Vorkommen von P27 analysiert (Tabelle 18). P27 übernimmt wichtige Kontrollfunktionen im Zellzyklus, eine abweichende Produktion von P27 kann den fehlerfreien Prozess des Zellzyklus beeinflussen.

Tabelle 18: Pathologische Auswertung der P27-Detektion in den aufgetretenen Mammakarzinomen der NOD-SCID-Mäuse nach erfolgreicher *mammary fat pad model-Xenotransplantation*. Die P27-Detektion wurde prozentual angegeben. Low dose rate (LDR), high dose rate (HDR), k.A.= keine Angabe

Strahlungsqualitäten	Dosis	Tumorbefund	P27 Expression
220 kV X-rays HDR	0 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0 Gy	Mammakarzinom	5%
	0,1 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0,1 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0,1 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0,25 Gy	Mammakarzinom	15%
	0,5 Gy	Mammakarzinom	10%
	1 Gy	Fibrosarkom	5%
220 kV X-rays LDR	0 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0 Gy	Fibrosarkom	k.A.
	0 Gy	Mammakarzinom	70%
$\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$ Neutronen, HDR	0 Gy	Mammakarzinom	30%
	0 Gy	Mammakarzinom	20%
	0,1 Gy	Mammakarzinom	5%
	0,5 Gy	Mammakarzinom	k.A.
$\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$ Neutronen, LDR	0 Gy	Mammakarzinom	k.A.
	0 Gy	Mammakarzinom	40%
	0 Gy	Mammakarzinom	30%
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	0,85 Gy	Mammakarzinom	20%
gemischtes Feld aus Gammastrahlen - sekundäre Neutronen ($\langle E_n \rangle = 70,5 \text{ MeV}$)	0 Gy	Mammakarzinom	5%
	0 Gy	Nervenscheidentumor	k.A.
	0 Gy	Mammakarzinom	10%
	0 Gy	Mammakarzinom	50%
	0,1 Gy	Nervenscheidentumor	k.A.
	0,1 Gy	Fibrosarkom	k.A.
	0,1 Gy	Nervenscheidentumor	k.A.

Die einzelnen Mammakarzinome sowie die Fibrosarkome und Nervenscheidentumore zeigten eine unterschiedliche Detektion von P27. Die Spannweite reichte von Karzinomen, die kein P27 aufwiesen bis hin zu Karzinomen bei denen 70 % aller Zellen eine P27-Detektion zeigten. Jedoch konnte keine signifikante Veränderung in der P27-Detektion gezeigt werden. Die Detektion von P27 war nicht abhängig von der Bestrahlungsdosis und der Strahlenqualität.

4 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit standen die Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Strahlenqualitäten auf Normalgewebszellen. Für die *in vitro*-Experimente, mit Ausnahme der Untersuchungen zum Zellüberleben, waren die Strahlenqualitäten auf Photonenstrahlen, appliziert in zwei verschiedenen Dosisraten, eingegrenzt. Für die *in vivo*-Untersuchungen wurde das Spektrum der Strahlenqualitäten um Neutronenstrahlen, zum einen mit einem breiten Energiespektrum sowie als monoenergetische Strahlung, zum anderen um sekundär gestreute Neutronenstrahlen erweitert.

4.1 Einfluss der diversen Strahlungsqualitäten auf das Zellüberleben von Normalgewebszellen der Brust

Um die relative biologische Wirksamkeit der Photonen- und Neutronenstrahlung zu ermitteln wurde zunächst das klonogene Überleben nach Bestrahlung untersucht. Entscheidend ist hierbei, dass die Zelle soweit geschädigt wird, dass sie ihre Reproduktionsintegrität verliert und somit die Fähigkeit sich unbegrenzt teilen und eine große Anzahl an Tochterzellen produzieren zu können [22]. Neben Photonen- und Neutronenstrahlung (breites Energiefeld und monoenergetisch) wurde, durch die Interaktion von 190 MeV Protonen mit einem Wasserphantom, ein Feld gemischt aus Gammastrahlen und sekundären Neutronen erzeugt. Dieses Spektrum an Strahlung ähnelt dem Spektrum, welches bei der Protonentherapie in der klinischen Situation vorliegt.

Es konnte gezeigt werden, dass das klonogene Überleben deutlich mehr durch die Neutronen und sekundär gestreute Neutronen beeinflusst wurde als durch Photonen. Es gab signifikante Unterschiede in der Überlebensfraktion zwischen den Bestrahlungsarten bei einer Bestrahlungsdosis von 1 Gy (Photonen, HDR: 66 %; Neutronen mit breitem Energiefeld $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV HDR: 34 %). Die weiteren Neutronenqualitäten zeigten bei leicht geringeren Dosen zwischen 0,76 Gy- 0,85 Gy ebenfalls signifikant geringere Überlebensfraktionen (monoenergetische Neutronen 1,2 MeV [0,85 Gy]: 16 %; monoenergetische Neutronen 0,56 MeV [0,84 Gy]: 8 %; sekundär gestreute Neutronen [0,76 Gy]: 46 %).

Zudem konnte für die Photonen- sowie für die Neutronenstrahlung mit breitem Energiefeld gezeigt werden, dass eine veränderte Dosisrate bei gleicher Strahlenqualität einen unterschiedlichen Effekt hat. Hierbei wurde das klonogene Überleben bei 1 Gy mit zunehmender Dosisrate der Photonen (HDR: 66 %; LDR: 78 %) und der Neutronen mit breitem Energiefeld $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (HDR: 34 %; LDR: 42 %) stärker beeinträchtigt. Für die

Neutronen konnte weiterhin gezeigt werden, dass das klonogene Überleben mit abnehmendem Energieniveau (Neutronen mit breitem Energiefeld $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV [HDR 1 Gy]: 34 %; monoenergetische Neutronen 1,2 MeV [0,85 Gy]: 16 %; monoenergetische Neutronen 0,56 MeV [0,84 Gy]: 8 %) stärker beeinflusst wurde, sowie dass die sekundär gestreuten Neutronen einen vergleichbaren Effekt ähnlich der Neutronenstrahlung mit breitem Energiefeld aufwiesen (Neutronen mit breitem Energiefeld $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV [HDR 1 Gy]: 34 %; sekundär gestreute Neutronen [0,76 Gy]: 46 %).

Die vorliegende Arbeit ist von besonderem Interesse, da es derzeit nur wenige Studien gibt, welche sich gezielt mit den Auswirkungen von Neutronenbestrahlung vergleichend zur Photonenstrahlung auf humane Normalgewebszellen beschäftigen. Hervorzuheben ist u. a. die Studie von Göhde et al. (2003), in dieser wurde der Einfluss monoenergetischer Neutronen unterschiedlicher Energien (0,56 MeV, 2,5 MeV und 14,8 MeV) im Vergleich zu Photonen (100 kV, 200 kV) untersucht. Die Überlebensfraktion sank deutlich nach der Neutronenbestrahlung, verglichen mit dem Einfluss der Photonen (Photonen [0,2 Gy]: 80 %; 0,56 MeV [\sim 0,15 Gy]: 50 %; 2,5 MeV [\sim 0,15 Gy]: 45 %; 14,8 MeV [\sim 0,18 Gy]: 50 %). In dieser Studie wurden jedoch die Neutronen nur bis 0,2 Gy angewandt. [73]. In der vorliegenden Arbeit hingegen konnten noch weitaus größere Differenzen im klonogenen Überleben zwischen den einzelnen Neutronenqualitäten sowie Photonenstrahlung (Photonen LDR [1 Gy]: 78 %; Neutronen mit breitem Energiefeld $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV [HDR 1 Gy]: 34 %; monoenergetische Neutronen 1,2 MeV [0,85 Gy]: 16 %; monoenergetische Neutronen 0,56 MeV [0,84 Gy]: 8 %) aufgezeigt werden, dies wurde verursacht durch die größere Dosisbandbreite bis zu 1 Gy und die damit einhergehende stärkere Schädigung der Zellen.

Okumura et al. (2013) untersuchte ebenfalls Neutronen mit einer vergleichbaren Energie zu den Neutronen mit 0,56 MeV bei 1 Gy und im Vergleich zur vorliegenden Studie konnten ähnliche Werte der Überlebensfraktionen der untersuchten *xrs5*-Zellen erzielt werden (10 %), die zweite Zelllinie CHO-K1-Zellen hingegen wiesen eine Überlebensfraktion von ca. 75 % auf [74]. Eine Gemeinsamkeit dieser beiden Studien ist, dass sie keine humanen Zelllinien verwendet haben, sondern Zellen der Hamsterovarien [74] oder A_L -cells, welche Hybridzellen aus humanen- und Hamsterzellen darstellen [73].

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Analysen zum klonogenen Überleben ein Wert von 4,97 ($RBE_{SF,0,1}$) für die relative biologische Wirksamkeit ermittelt werden. Einen ähnlich hohen Wert (5,4) gaben auch Frankenberger-Schwager et al. (2010) für eine Hybridzelllinie aus Hela- und Fibroblastenzellen nach einer Bestrahlung mit Neutronen einer Energie von 0,56 MeV mit einer Maximaldosis von 1,5 Gy an [67,69]. Aber auch hier unterscheidet sich die Studie zu der vorliegenden Arbeit bei den verwendeten Zellen, dem experimentellen Aufbau und der verwendeten Referenzstrahlung.

Die zuvor genannten Studien bestätigen die hohe Effektivität einer Bestrahlung mit Neutronen einer Energie von 0,56 MeV, jedoch fehlt die Anwendung von humanen gewebespezifischen Zelltypen und höherer Bestrahlungsdosen. Die vorliegende Arbeit hingegen repräsentiert eine bisher nicht vorhandene Untersuchung zu den Effekten von Neutronen diverser Energien und Photonen auf das klonogene Überleben von Normalgewebszellen der humanen Brust.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Verwendung von verschiedenen Dosisraten der Photonen- und der Neutronen mit einem breiten Energiespektrum. Hierbei zeigte sich, dass mit zunehmender Dosisrate ein stärkerer Effekt auf das klonogene Überleben auftrat. Dies bestätigt die bisherige Annahme, dass eine Verringerung der Dosisrate mit einer reduzierten Abnahme des klonogenen Überlebens einhergeht [22]. Diese Annahme beruht auf experimentellen Untersuchungen zum klonogenen Überleben wie beispielsweise von Bedford & Mitchell (1973), in denen verschiedene Dosisraten von Gammastrahlen auf Zellen des chinesischen Hamsters (CHL-F-Zellen) angewendet wurden [75]. Leider ist die Datenlage sehr inkonsistent. Viele Veröffentlichungen bezüglich des klonogenen Überlebens nicht tumorigener Zellen benennen zwar die verwendete Dosisrate, verwenden jedoch keine zweite Dosisrate zum Vergleich; weiterhin werden stets unterschiedliche Dosisraten verwendet [76–79]. Ein weiteres Beispiel ist, dass verschiedene Dosisraten zur Minimierung der Bestrahlungsdauer verwendet wurden, jedoch wurden die möglichen unterschiedlichen biologischen Effekte der Dosisraten nicht untersucht [51]. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stimmen im Zellkulturmodell mit denen von Radulovic et al. (2017), Vares et al. (2013) überein; jedoch werden in deren Arbeiten Dosisraten (angewandt wurden Photonen [80] und Gammastrahlung [76]) im Bereich von 0,5 Gy/min bis 0,9 Gy/min genutzt [76,80]. Die zwei Publikationen zeigen vergleichbare Ergebnisse auf das klonogene Überleben nach einer Bestrahlung mit 6 Gy; die Überlebensfraktionen lagen bei 2 % (vorliegende Arbeit), 10 % [80] und 8 % [76]. Im Vergleich zeigt sich, dass die Dosisraten (0,37 Gy/min–0,9 Gy/min) im Bereich einer hohen Dosis von 6 Gy keine stark voneinander abweichenden Effekte aufweisen.

Zudem wurden die Zellen in dieser Arbeit als Zellsuspension bestrahlt. Dieses besondere Merkmal trifft auch auf die Studien von Okumura et al (2013) und Frankenberg-Schwager et al. (2010) zu [67,74] zu. Dass die Art und Weise wie die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung kultiviert werden auch einen Einfluss auf die Effektivität der Bestrahlung hat, wurde in einer Studie von Cansolino et al. (2015) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen als Suspensionskultur strahlenresistenter waren verglichen zu adhärent kultivierten Zellen nach einer Bestrahlung mit Neutronen bis zu 10 Gy oder ^{60}Co [81]. Dieser Effekt könnte auf der ungleichmäßigen Verteilung der Zellen im Medium beruhen, weniger auf die bereits beschriebene gesteigerte Radioresistenz von Zellen, welche in einer 3D-Matrix über längere

Zeit kultiviert wurden [82], da die Zellen nur für den Zeitraum der Bestrahlung in Suspension kultiviert wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten bereits publiziert werden [69] und bereichern damit die derzeitige schwache Datenlage zu den biologischen Effekten hinsichtlich des klonogenen Überlebens von humanen Normalgewebszellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Neutronenqualitäten vergleichend zur Photonenstrahlung.

4.2 Einfluss der Photonenstrahlung auf zelluläre Parameter wie Viabilität, Expression spezifischer Oberflächenmarker und Fähigkeit zur Sphärenformation

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde analysiert, in welchem Maße die Photonenstrahlung mit den unterschiedlichen Dosisraten einen Einfluss auf die Viabilität der Normalgewebszellen hat. Es war anzunehmen, dass mit ansteigender Bestrahlungsdosis die Viabilität, aufgrund des verminderten Zellüberlebens nach Bestrahlung, abnimmt.

Die Viabilität der Normalgewebszellen wurde mit Hilfe der Aktivität des mitochondrialen Komplexes II untersucht. Die Photonenbehandlung der MCF10A-Zellen resultierte 24 h nach Bestrahlung in einem Anstieg der Aktivität des mitochondrialen Komplexes II, ermittelt durch den Umsatz des Tetrazoliumsalzes. Diese Zunahme galt für fast alle Bestrahlungsdosen unter Verwendung der höheren Dosisrate von 0,37 Gy/min. Die Bestrahlung mit der niedrigen Dosisrate von 0,02 Gy/min hingegen beeinflusste die Viabilität nicht. Abweichende Ergebnisse beobachteten Radulovic et al. (2017), welche mit einer Dosisrate von 0,5 Gy/min und Dosen von 0,25 Gy und 2,5 Gy MCF10A-Zellen bestrahlten. Hierbei zeigte sich eine leichte Abnahme der Viabilität bei 2,5 Gy [76]. Falcao et al. (2015) untersuchten die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 über einen Zeitraum bis 72 h nach Bestrahlung mit zwei verschiedenen Dosisraten (3.39 Gy/min und 0.85 Gy/min), es zeigte sich eine Abnahme der Viabilität nach der Bestrahlung mit der höheren Dosisrate, wohingegen die niedrige Dosisrate einen leichten Anstieg in der Viabilität verursachte [83]. Da die Bezeichnung der niedrigen und höheren Dosisrate relativ zu den verwendeten Dosisraten ist, ist die niedrige Dosisrate (0.85 Gy/min) von Falcao et al. (2015) vergleichbar mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten höheren Dosisrate (0,37 Gy/min). Der Anstieg der Viabilität nach Bestrahlung könnte in einer Hyperaktivität der Mitochondrien bzw. in einem Anstieg der mitochondrialen Masse begründet sein, dieser Effekt wurde an einem breiten Spektrum von etablierten Zelllinien analysiert [84]. Die Annahme der Hyperaktivität der Mitochondrien wird durch weitere Untersuchungen, die

eine gesteigerte Aktivität des mitochondrialen Komplex II unter Bestrahlung zeigen, bekräftigt [85].

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Untersuchung der Expression zweier spezifischer Oberflächenmarker. Im Rahmen der Ausdifferenzierung der Stammzellen besitzen bestimmte Subpopulationen der Zellen im Brustgewebe sehr spezifische Expressionsmuster von Oberflächenmarkern. Das Experiment diente dem Nachweis, ob die Bestrahlung einen Einfluss auf die Expressionsmuster zweier Oberflächenmarker hat und somit auf die anteilmäßige Verteilung der Subpopulationen.

Die Expressionsmuster von EpCAM und MUC-1 wurden nach Bestrahlung durchflusszytometrisch analysiert. Die Expression beider Oberflächenproteine änderte sich nicht signifikant, es war keine signifikante Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis bzw. Dosisrate erkennbar, jedoch war tendenziell eine abnehmende Expression von MUC-1 unter Bestrahlung erkennbar.

Es wurde beschrieben, dass die MCF10A-Zellen ein zuverlässiges Modell sind, um humane epitheliale Zellen der Brust zu untersuchen [86]. Dies beruht u. a. auch darauf, dass die MCF10A-Zellen nachweislich eine kleine potentielle stammzellähnliche Subpopulation enthalten [52]. Bekanntlich sind die Stammzellen und die weniger potenten Progenitorzellen der Brust in der Lage sich in die gewebespezifischen Zelltypen ausdifferenzieren zu können [87]. Im humanen Brustgewebe wurden bipotente Progenitorzellen, welche sowohl in luminaire als auch in myoepitheliale Zellen ausdifferenzieren können, mit folgendem Phänotyp $\text{EpCAM}^{\text{low}} \text{CD49}^{\text{high}} \text{MUC1}^-$ beschrieben und im Laufe der weiteren Zelldifferenzierung weisen die luminalen Progenitorzellen folgenden Phänotyp $\text{EpCAM}^{\text{high}} \text{CD49}^+ \text{MUC1}^+$ auf [88].

Anhand der durchflusszytometrischen Daten von MUC-1 und EpCAM in dieser Arbeit, ist nicht davon auszugehen, dass sich der mengenmäßige Anteil der Subpopulation der Progenitorzellen verändert hat. Es ist aber bereits bekannt, dass Noxen wie Bestrahlung und Chemotherapeutika eine Veränderung im Expressionsprofil der Oberflächenproteine sowie die Größe spezifischer Subpopulationen haben. Zum einen moduliert Bestrahlung (8 Gy Photonen/Protonen) das Expressionsmuster diverser Oberflächenproteine u. a. MUC-1 von Tumorzellen der Brust [89]. Zum anderen kann die Applikation von Chemotherapeutika die Größe der Population von Krebsstammzellen der Brust beeinflussen [90]. Derzeit gibt es jedoch nur wenig vergleichbare Untersuchungen, da sich zahlreiche Publikationen mit der Expression von EpCAM und MUC-1 und schon bereits vorhandenem Krebs beschäftigen und damit einhergehend in der Funktion als Tumormarker [91,92]. Um die Modulation einzelner Subpopulationen noch genauer zu untersuchen, würde sich im weiteren Verlauf eine FACS-Analyse eignen, welche die Auftrennung einzelner Subpopulationen, aufgrund des

Expressionsmuster spezifischer Oberflächenproteine, ermöglicht. Dass Bestrahlung einen modulierenden Effekt auf Oberflächenproteine besitzt, konnte auch in der Studie von Meineke et al. (2002) gezeigt werden. Hierbei konnte eine erhöhte Expression von Integrinen sowie eine gesteigertes Adhäsionspotential einer kolorektalen Karzinomzelllinie nach Bestrahlung detektiert werden [93].

Stammzellen der humanen Brust sind in der Lage in einer nicht adhäsiven Umgebung dreidimensionale Zellaggregate, sogenannte Mammosphären, auszubilden und in diesen zu proliferieren und sich auszudifferenzieren [94]. Diese Fähigkeit zur Mammosphärenbildung weisen auch die MCF10A-Zellen auf [86]. Daher wurde neben der Viabilität und der Expression spezifischer Oberflächenmarker zusätzlich auch die Fähigkeit der Mammosphärenbildung untersucht.

Hierbei konnte sowohl für die HDR- als auch die LDR-Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy ein reduzierender Effekt auf die Fähigkeit zur Mammosphärenbildung über einen Zeitraum von acht Tagen nachgewiesen werden. Die LDR-Bestrahlung zeigte innerhalb der ersten zwei Messpunkte (2. und 4. Tag) einen größeren Einfluss auf die Fähigkeit der Sphärenbildung, dies ändert sich jedoch für die zwei weiteren Messpunkte (6. und 8. Tag), wo die HDR-Bestrahlung effektiver die Mammosphärenbildung unterbindet (bereits publiziert in [69]).

Ein Vergleich mit der Literatur ist schwierig, da die meisten Publikationen im Zusammenhang mit Sphärenformation und Bestrahlung auf Krebszelllinien fokussiert sind. So konnte beispielsweise von Chang et al. (2014) beobachtet werden, dass die Sphärenformation der Brustkrebszelllinie MCF-7 unter Bestrahlung und in Kombination mit einem Nukleosid-Analogen inhibiert wurde [95]. Zudem wurde beschrieben, dass Brustkrebs- initiiierende Zellen, welche aus Mammosphären gewonnen wurden, im Vergleich zu adhärent gewachsenen Zellkulturen radioresistenter sind [96]. Eine der wenigen Publikationen welche die Fähigkeit zur Sphärenformation bei MCF10A als Normalgewebszellen nach Bestrahlung untersuchte, ergab einen Anstieg der Sphärenformation, jedoch wurde dies nur in Verbindung mit einer weiteren Noxe, dem Kondensat aus Zigarettenrauch, analysiert [50].

Zusammenfassend zeigen die ermittelten Daten einen deutlichen Einfluss der Bestrahlung auf die Viabilität und die Fähigkeit zur Sphärenbildung, jedoch waren keine starken Effekte auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker (EpCAM, MUC-1) nachweisbar.

4.3 Untersuchung des residualen DNA-Schadens

DNA-Schäden infolge einer Exposition mit ionisierender Bestrahlung können, falls sie irreparabel sind, zum Zelltod bzw. Mutationen führen. Diese können mit Hilfe von Reparaturprozessen u. a. homologe Rekombination und nicht homologes *end joining* repariert werden. Gelingt dies nicht erhöht sich durch die fehlerhafte Reparatur das Risiko einer Krebsentstehung [97]. Aus diesem Grund wurde der residuale DNA-Schaden mit Hilfe von γ H2AX-Foci analysiert.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass 24 h nach einer HDR-Bestrahlung mit 1 Gy die Anzahl der γ H2AX-Foci sich nahezu verdoppelt hat. Dieser Effekt des Foci-Anstieges war für die LDR-Bestrahlung ebenfalls zu beobachten, jedoch etwas gemäßiger, da hier der Referenzwert der γ H2AX-Foci innerhalb der Kontrolle höher war als der Wert für die HDR-Kontrolle. Die DNA-Reparaturprozesse starten schon wenige Minuten nach der Bestrahlung. Es ist anzunehmen, dass die DNA-Doppelstrangbrüche im Zeitraum der LDR-Bestrahlung schon repariert waren, noch bevor die absolute Dosis von 1 Gy erreicht wurde. Dass die Dosisrate einen Einfluss auf die Ausprägung der γ H2AX-Foci hat, konnte durch die Studie von Ishizaki et al. gezeigt werden [98]. Auch in anderen Studien konnte die Abhängigkeit der Anzahl der verbliebenen γ H2AX-Foci von der ansteigenden Dosisrate nachgewiesen werden [74,77,99,100]. Die Studie von Mariotti et al. (2013) untersuchte bei einer ähnlichen Dosisrate von 0,59 Gy/min Fibroblasten. Im Vergleich zu den vorliegenden Daten wiesen sie eine höhere Anzahl an γ H2AX-Foci bei 2 Gy 24 h nach Bestrahlung auf [99].

Hervorzuheben ist die Studie von Oorschot et al. (2015), hier wurde die Wirkung einer impulsartigen Bestrahlung mit einer geringen Dosisrate von 10 cGy/h mit einer einmaligen Bestrahlung mit einer Dosisrate von 1 Gy/min auf Lymphozyten verglichen. Nach Applikation einer absoluten Dosis von 2,4 Gy konnte ein deutlich steigernder Effekt der LDR-Bestrahlung auf die Anzahl der γ H2AX-Foci beobachtet werden [102]. Möglicherweise ist die Zelle nicht in der Lage, während des langen Bestrahlungszeitraumes, welcher typisch für LDR-Bestrahlungen ist, und der wiederholten Bestrahlung, die vorhandenen Doppelstrangbrüche ausreichend zu reparieren. Basierend auf den Daten dieser Arbeit ist kein deutlicher Unterschied in der Ausprägung von Doppelstrangbrüchen nach Photonenbestrahlung mit verschiedener Dosisrate (0,37 Gy/min und 0,02 Gy/min) nachzuweisen. Jedoch variiert die Anzahl der Doppelstrangbrüche in den Kontrollen. Möglicherweise wird dieser Umstand hervorgerufen, durch die lange Phase des Auskühlens und keine CO₂-Gabe während der LDR-Bestrahlung. Der deutliche Anstieg der γ H2AX-Foci nach der HDR-Bestrahlung bestätigt die Ergebnisse von Groesser et al. (2011), welche 24 Stunden nach einer Bestrahlung

(0,5 Gy/min- 1 Gy/min) mit 1 Gy bzw. 2 Gy im Durchschnitt fünf Foci pro Zelle detektieren konnten [100].

In der Literatur ist zu erkennen, dass auch hier in vielen Publikationen nur eine Dosisrate verwendet wurde oder wenn zwei Dosisraten verwendet wurden, dann sind diese schwer mit anderen publizierten Daten vergleichbar, da die verwendeten Dosisraten sehr stark variieren (von cGy/h bis Gy/min).

Zusammenfassend ist, ähnlich den Untersuchungen zum klonogenen Überleben, ein deutlicher Effekt zwischen den zwei verwendeten Dosisraten bei der Photonenstrahlung zu erkennen.

4.4 Einfluss der Bestrahlung auf RNA- und miRNA-Ebene

Ein weiterer Ansatzpunkt war die Wirkung von Strahlung auf der molekularen Ebene zu untersuchen. Hierfür wurde die Expression der Gene *P27*, *RB1* und *P53* analysiert. Diese drei fungieren als wichtige Tumorsuppressorgene, sie übernehmen u. a. Schlüsselpositionen während des Zellzyklus [103]. Ist deren Expression fehlerhaft oder herunterreguliert, können diese Kontrollmechanismen nicht mehr erhalten werden und es kann zu karzinogenen Veränderungen kommen [46,104–106].

Im Anschluss an diese Analyse wurde zusätzlich ein Profil der exprimierten miRNAs erstellt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *P27* und *RB1* schon bei geringen Dosen eine veränderte Expression aufweisen. Die Expression beider Gene wurde bei allen Bestrahlungsdosen (HDR) herunterreguliert; schon geringe Dosen von 0,25 Gy verursachten signifikante Veränderungen in der Expression. Bezüglich *P53* zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression, welche bei der Höchstdosis von 2 Gy signifikant war. Es zeigte sich für alle drei Gene jedoch keine lineare Dosisabhängigkeit. Nach der LDR-Bestrahlung war die Genexpression kaum beeinflusst worden. Die Tendenz der abnehmenden Genexpression von *P27* und *RB1* zeigt, dass die Expression dieser zwei Gene anfällig für Effekte einer Photonenbestrahlung ist, auch schon im Bereich niedriger Bestrahlungsdosen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bereits bei einer Bestrahlung unterhalb von 1 Gy eine Abnahme der *RB1*-Expression vorzufinden ist. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass niedrigdosierte Bestrahlung die genomische Instabilität beeinflussen kann, aufgrund der geringeren *RB1*-Expression. Denn es ist bereits bekannt, dass die Instabilität des Genoms durch die Inaktivierung von *RB1* beeinflusst wird [107]. Zusätzlich wurde auch beschrieben,

dass der Verlust von *RB1* mittels einer veränderter Mad2-Expression im Zusammenhang mit einer defekten mitotischen Kontrolle und daraus resultierend mit einer Aneuploidie der Zellen steht [107]. In einer Vergleichsstudie zwischen Brustkrebszellen und Proben von Brustkrebspatientinnen wurden die Proben in die drei Haupttypen (ER^+/PR^+ , $Her2^+$, $ER^-/PR^-/Her2^-$) eingeteilt. Dabei zeigte sich das u. a. *RB1*-Mutationen häufig in dem dreifach-negativen Subtypen mit hoher genomischer Instabilität vorkommt [108]. Durch die Abnahme der *P27*-Expression ist davon auszugehen, dass *P27* seine regulatorische Funktion vermindert ausführen kann und es dadurch schneller zu einer Transition der G_0 - in die S-Phase kommt [106].

Die Studie von Ghandhi et al. (2015) ist kontrovers zu den Daten aus der vorliegenden Arbeit, da dort eine gleichermaßen stark ausgeprägte Veränderung der Genexpression nach der LDR-Bestrahlung (3,1m Gy/min) sowie nach der HDR-Bestrahlung (1,03 Gy/min) bei einer Gesamtdosis von 4,45 Gy zu verzeichnen war. Zudem ergaben ihre Untersuchungen, dass manche Gene, wie z. B. die *P53* verwandten Gene *TP53INP1* und *TP53I3*, erst bei einer höheren Dosis hochreguliert werden. Im Gegensatz dazu werden einige strahlenbiologisch relevante Gene, wie *GADD45A*, *DDB2* und *AEN*, schon ab einer geringen Dosis von 0,56 Gy deutlich hochreguliert, was mit ansteigender Dosis konstant blieb [109].

Durch die Zunahme der *P53*-Expression wird deutlich, dass schon geringe Bestrahlungsdosen Effekte auf die regulatorischen Prozesse des Zellzyklus verursachen können. Die Abnahme von *RB1* und *P27* deutet zudem daraufhin, dass die Bestrahlung im Bereich von 0,1 Gy bis 2 Gy bereits eine destabilisierende Wirkung auf das Genom der Normalgewebszellen hat.

Ein weiterer Aspekt im Bereich der genomischen Analyse war die Untersuchung hinsichtlich der miRNA-Expression. Die miRNA-Signatur unterscheidet sich nicht nur zwischen normalem und tumorigenem Gewebe, sondern kann auch spezifisch Tumorsubtypen einteilen und das mögliche Therapieansprechen prognostizieren. Daher sind die miRNA, welche kleine endogene nicht kodierenden RNA-Einzelstränge sind, potentiell geeignet als diagnostische und prognostische Marker zu verwenden [110]. Im Fokus dieser Untersuchung stand potentielle miRNAs, deren Expression signifikant durch die Bestrahlung beeinflusst wird, zu identifizieren.

Im Folgenden werden beispielhaft einzelne miRNAs, welche im Zusammenhang mit Brustkrebs schon beschrieben wurden, diskutiert. Die vorliegenden Daten zeigten beispielsweise, dass die Expression der miRNA-378a-5p konstant abnahm nach Bestrahlung. Eine erhöhte Expression der miRNA-378a-5p steht u. a. im Zusammenhang mit einer

Veränderung des Zellmetabolismus zu Gunsten des Warburg-Effekts [111], sowie mit einer Beeinflussung des Zellzyklus und Korrelation mit einer Tumorigenese von Brustkrebs *in vivo* [112]. Dazu wurde gezeigt, dass die miRNA-378a-5p die Seneszenz von Fibroblasten verzögert und dadurch positiv auf die Tumorentwicklung wirken könnte [113]. Diese Beispiele heben die onkogene Funktion von miRNA-378a-5p, im Falle einer Überexpression, welche jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar war, hervor. Auch die Expression der miRNA-484 war nach 48 h sowie sieben Tagen nach Bestrahlung ab einer Dosis von 1 Gy signifikant gesunken. Interessanterweise stieg dessen Expression am späteren Zeitpunkt bei einer Dosis von 0,25 bis 0,5 Gy an. Es ist bekannt, dass die miRNA-484 bei Patienten mit Mamma- sowie Pankreaskarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden einen erhöhten Serumwert aufweist [114,115]. Kontroverserweise wird in der Studie von Hu et al. (2012) die miRNA-484 als endogene Kontrolle für ein miRNA-Screening in Serumproben von Brustkrebspatienten verwendet [116]. Die Expression der miRNA-140-3p nahm signifikant nach einer Bestrahlung mit 2 Gy ab. Diese miRNA steht im Zusammenhang mit Brustkrebs und wurde bereits anhand von Expressionsanalysen als prognostischer Marker für Brustkrebs beschrieben [117]. Diese Untersuchung zeigt einen neuen Aspekt auf, da bekannte miRNAs, dessen Überexpression mit Brustkrebs assoziiert sind, innerhalb dieser Analyse bei humanen Normalgewebszellen der Brust eine verminderte Expression nach einer Bestrahlung von 2 Gy zeigen.

Zudem zeigten Iorio et al. (2005), dass speziell bei Brustkrebs fünf miRNA (miR-125b, miR145, miR10b, miR21 und miR155) in ihrer Expression verändert sind im Vergleich zu gesunden Patientinnen [118]. Diese fünf miRNAs sind in der vorliegenden Analyse nicht signifikant verändert worden.

Anhand der miRNA-Analyse ist abzulesen, dass bisher bekannte Brustkrebs-assoziierte miRNAs nach der Photonenbestrahlung bis zu einer Dosis von 2 Gy keine signifikanten Veränderungen in ihrer Expression bei humanen Normalgewebszellen der Brust aufwiesen.

4.5 Einfluss der Bestrahlung auf das Proteom

Als finaler *in vitro*-Aspekt wurde der Einfluss von Bestrahlung bis zu einer maximalen Dosis von 2 Gy auf der Proteinebene untersucht. Mit ansteigender Dosis nahm auch die Anzahl der signifikant veränderten Proteine zu. Aufgrund der hohen Anzahl an beeinflussten Proteinen erscheint der Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung sehr gut geeignet für Proteomanalysen zu sein. Drei Proteine, IQGAP3, EPDR1 und FHL2, hoben sich durch eine übergreifende Synthese in

zwei Zeitpunkten nach Bestrahlung mit der entsprechenden Dosis zusätzlich hervor. So wurden das Protein IQGAP3 (30 min und 48 h) nach Bestrahlung signifikant herunterreguliert, sowie EPDR1 (30 min und 7 d) und FHL2 (48 h und 7 d) signifikant hochreguliert.

Im Zusammenhang mit Brustkrebs liegen für IQGAP3 lediglich Daten auf der mRNA-Ebene aus der aktuellen Literatur vor. Auf mRNA-Ebene konnte schon gezeigt werden, dass IQGAP3 in Karzinomproben verglichen zu gesunden Gewebeproben u. a. auch in Brustkrebs [119] signifikant erhöhte Werte aufweist. Eine weitere experimentelle Studie zeigte zudem, dass ein Ausschalten des IQGAP3-Gens Zellen eines Mammakarzinoms hinsichtlich Proliferation und Metastasierung inhibiert [120]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme der Proteinregulation von IQGAP3 nach Bestrahlung von Normalgewebszellen festgestellt. In Bezug auf IQGAP3-vermittelte Veränderungen deutet sich somit kein nachteiliger Effekt auf die Normalgewebszellen nach Bestrahlung an.

Hingegen EPDR1 wird mit dem Prostata- [121] sowie Kolorektalkarzinom [122] assoziiert. Die Aktivierung von FHL2 spielt eine Rolle im Rahmen der Invasion und Metastasierung von Brust- und Kolorektalkarzinomen [123].

Im Allgemeinen stieg die Anzahl der Proteine, welche signifikant herunter- bzw. hochreguliert wurden, mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Mit Hilfe einer Netzwerkanalyse konnten diese Proteine kategorisiert werden. Bei allen Bestrahlungsdosen wurden Proteine, welche in zelluläre bzw. metabolische Prozesse bzw. Reaktionen auf Stimuli involviert sind, reguliert. Jedoch wurden erst ab einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy konkrete strahlenbiologisch relevante Prozesse wie der Zellzyklus reguliert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Mi-Hyoung et al. (2015) nach einer Bestrahlung mit 10 Gy von MDA-MB-231-Zellen, einer Tumorzelllinie der humanen Brust, aufgezeichnet [124].

Die Proteine IQGAP3, EPDR1 und FHL2 stehen zwar im Zusammenhang mit Brustkrebs oder anderen Krebserkrankungen, jedoch zeigte sich keine Dosisabhängigkeit der Proteinalterationen bzw. sind die Proteine auch nicht über die Bandbreite der Bestrahlungsdosen verändert. Daher ist aufgrund der Proteomanalyse nicht davon auszugehen, dass ein karzinogenes Potential der Photonenbestrahlung im Bereich zwischen 0,25 Gy bis 2 Gy besteht.

4.6 Evaluation der *in vivo*-Ergebnisse

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde *in vivo* untersucht, ob die verschiedenen Bestrahlungsqualitäten der Photonen und Neutronen möglicherweise Auswirkungen auf die

Karzinogenese der humanen Epithelzellen haben. Dies sollte im Xenograftmodell untersucht werden. Die erste Fragestellung umfasste die Auswahl der am besten geeigneten Transplantationsmethode. Hierfür wurden zwei verschiedene Xenograftmodellen etabliert, miteinander verglichen und schließlich wurde ein Modell für die nachfolgenden *in vivo*-Untersuchungen ausgewählt. Die zweite Fragestellung umfasste die Analyse der potentiellen Effekte der verschiedenen Bestrahlungsqualitäten der Photonen und Neutronen auf eine Karzinogenese der humanen Epithelzellen mit Hilfe der zuvor etablierten *in vivo*-Transplantationsmethode.

4.6.1 Auswahl des Xenograftmodells

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst zwei Xenograftmodelle erfolgreich etabliert. Erstens, dass in der Brustkrebsforschung altbewährte *subrenal capsule assay*, welches als besonders gut geeignet für Wirkstoffscreenings beschrieben wurde, und zweitens, dass noch recht junge orthotope Xenograftmodell in das *mammary fat pad model* einer Maus. Eine detaillierte Beschreibung beider Transplantationstechniken ist unter 3.2.2 aufgeführt.

In der gegenwärtigen Krebsforschung gibt es eine Vielzahl an *in vivo*-Studien, welche unterschiedliche Xenograft-Techniken, wie z. B. die orthotope und ektopische Transplantation benutzen [53]. Der Vorteil einer orthotopen Transplantation ist, dass die zu transplantierenden Zellen histologisch mit dem Transplantationsort übereinstimmen. Hingegen werden bei einer ektopischen Transplantation, bei der die zu transplantierenden Zellen und der Transplantationsort physiologisch nicht übereinstimmen, beispielsweise Brustkrebszellen subkutan in das hintere Bein einer Maus transplantiert, wo sich dann später ein Tumorwachstum beobachten lässt.

In der zurückliegenden Forschung waren *in vivo*-Studien eine überzeugende Technik um vor allem die Wirksamkeit von Chemotherapeutika auf transplantierte humane Tumoren zu untersuchen [125,126]. Hier wurden vor allem ektopische Techniken wie die subkutane Injektion oder die Transplantation unterhalb der Nierenkapsel (*engl.: subrenal capsule assay*) angewandt [125,127]. Die subkutane Injektion zeichnet sich durch eine unkomplizierte Durchführung und gute Beobachtungsmöglichkeiten des Tumorwachstums aus. Die Transplantation unter die Nierenkapsel wird als besonders geeignet beschrieben, aufgrund der leichten Zugänglichkeit der Niere, der guten Sichtbarkeit des Tumors unterhalb der Niere, der hervorragenden Nährstoffversorgung durch den Nierenkortex sowie einer stabilen Umgebung [126]. Diese *in vivo*-Technik hat sich für schnelle Wirkstoffscreenings hinsichtlich humaner Tumore bewährt [126,127]. Eirew et al. (2010) veröffentlichte eine Studie in der die

Transplantation unter die Nierenkapsel, dem *subrenal capsule assay*, auch mit nicht tumorigenen humanen Epithelzellen der Brust funktioniert [55]. Diese ektopische Xenotransplantation hat den großen Vorteil, dass die Nieren in Relation zu anderen Organen leicht zugänglich sind. Zudem ist nicht für jedes Organ eine orthotope Transplantation möglich, daher bietet sich mit dem diesem Modell eine gute Alternative.

Im Bereich der Brustkrebsforschung konnte darüber hinaus von Kuperwasser et al. (2004) ein vielversprechendes und gut durchführbares orthotopes Modell der Transplantation von humanen Epithelzellen des Brustgewebes in das Fettgewebe der murinen Brustdrüse immundefizienter Mäuse (*engl.: mammary fat pad model*) beschrieben werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich humanes Brustepithel in der murinen Brustdrüse rekonstruieren lässt [54]. Dieses vielversprechende Modell, welches den Vorteil der physiologischen Übereinstimmung hat, wurde sowohl für zahlreiche Studien an Brustkrebszellen als auch an humanen nicht tumorigenen Epithelzellen verwendet [128–130]. Die Anzahl der Studien vergrößert sich noch weiter, wenn die Studien berücksichtigt werden, welche auf zwei charakteristische Operationsschritte des Modells, die Entnahme des murinen Brustepithels, welches als Reinigung des Fettgewebes (*engl.: clearing of the fat pad*) bezeichnet wird, und die zusätzliche Transplantation von Fibroblasten (*engl.: humanizing of the fat pad*), verzichteten und lediglich das Transplantat in das murine Fettgewebe injizierten [131–133].

Nach der erfolgreichen Etablierung beider Xenograftmodelle wurde für die vorliegende Fragestellung das *mammary fat pad model* nach Kuperwasser et al. (2004) [54] ausgewählt. Dieses Modell wurde nicht nur ausgewählt aufgrund der Tatsache, dass es eine orthotope Transplantation ist, sondern bedingt durch die unkomplizierte Durchführung ergab sich eine höhere Garantie der Reproduzierbarkeit, eine geringere Sterberate an Versuchstieren sowie eine bessere Möglichkeit der Nachbeobachtung einer möglichen Tumorentstehung.

Das *mammary fat pad model* wurde in der ursprünglichen Variante mit dem Schritt der Entnahme des murinen Brustepithels sowie der unterstützenden Transplantation der Fibroblasten im Bereich der Brustdrüse (*engl.: clearing of the fat pad*) durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass tumorigene Zellen, aufgrund ihrer nicht natürlich regulierten Proliferationsfähigkeit, unabhängig von dem umgebenden Mikromilieu proliferieren und Tumore ausbilden können. Nicht tumorigene Zellen hingegen weisen aufgrund fehlender Entartung keine uneingeschränkte Proliferation auf und reagieren möglicherweise sensitiver auf das vorhandene Mikromilieu. Kuperwasser et al. (2004) verwiesen darauf, dass vor allem die bestrahlten Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung der extrazellulären Matrix spielen, welche eine wichtige Komponente für eine erfolgreiche Transplantation

humaner Epithelzellen ist. [54]. Vermutlich wird die Umgestaltung der extrazellulären Matrix durch die bestrahlten Fibroblasten u. a. durch TGF β vermittelt [136]. Die gewählten Einsaatdichten stimmen mit bereits publizierten Daten ähnlicher Studien überein [130,137,138].

Die Entnahme des murinen Brustepithels erfolgte in der vorliegenden Arbeit aufgrund von logistischen Gründen erst bei fünf Wochen alten Versuchstieren. Kuperwasser et al. (2004), führten diesen Schritt bereits bei drei Wochen alten Versuchstieren durch. Diese Abweichung ist jedoch zu vernachlässigen, da das murine Brustepithel unter den vorliegenden Bedingungen zu diesem Zeitpunkt kaum ausgeprägt war. Dies ist wichtig für den Zeitpunkt der Entnahme des murinen Brustepithels und kann zwischen den Versuchstierarten variieren [139].

Für die vorliegende Arbeit wurde das bekannte *NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrCrI* (NOD-SCID)-Mausmodell ausgewählt, da es als ein sehr gut etabliertes und funktionierendes Versuchstiermodell im Bereich der Untersuchungen zur Entwicklung, Karzinogenese und Tumorwachstum der Brust beschrieben sind [12,134,135]. Basierend auf der Untersuchung der mittleren Lebensdauer der Versuchstiere konnte ein Zeitraum für die Langzeitstudie festgelegt werden. Es zeigte sich, dass die weiblichen NOD-SCID-Mäuse in der vorliegenden Untersuchung eine mittlere Lebensdauer von 10,3 Monate hatten. Dieser Wert ist deutlich höher als die von Shultz et al. beschriebene mittlere Lebensdauer von 8,8 Monate [72].

Im weiteren experimentellen Verlauf erfolgte eine hormonelle Stimulation durch die Induktion einer Scheinschwangerschaft nach erfolgreicher Transplantation, da dies für die Versuchstiere ohne weitere operative Eingriffe verbunden war. Kuperwasser et al. (2004) beschrieb, dass keine zusätzliche hormonelle Stimulation nötig wäre, wenn die Transplantation vor dem Eintritt der Pubertät erfolgte [54], Eirew et al (2010) hingegen transplantierten den Versuchstieren zusätzlich ein Hormonpellet, angereichert mit beta-Estradiol und Progesteron. In einer weiteren Studie, welche die Bestrahlungseffekte auf MCF10A-Zellen in NOD-SCID-Mäusen über einen Zeitraum von bis zu 600 Tagen analysierte, wurde keine zusätzlichen hormonelle Stimulation der Versuchstieren durchgeführt [52].

Abschließend wichtig zu erwähnen ist, dass trotz des Vorteils der orthotopen Transplantation auch dieses Injektionsmodell experimentelle Grenzen besitzt. Zum einen wiesen Fleming et al., (2010) Unterschiede im Erfolg der Transplantation abhängig von der Lokalisation der Brustdrüse entlang der murinen Milchleiste nach. Die abdominale Brustdrüse war deutlich besser für Transplantationseingriffe geeignet, als die im Thoraxbereich lokalisierte Brustdrüse der Maus [140]. Zum anderen gilt generell für alle Xenograftmodelle, dass die Möglichkeiten die Situation von Patienten zu imitieren deutlich limitiert sind. Koontz et al.(2017) fassten

diesbezüglich zusammen, dass viele Faktoren wie zum Beispiel Art der Anästhesie, Fraktionierung der Bestrahlung, Immunsystem des Versuchstieres, Unterschiede zwischen den Bestrahlungsgeräten die *in vivo*-Modelle deutlich beeinflussen und daher es sehr schwer auf die humane Situation übertragbar ist [60]. Auf Parameter wie Reproduzierbarkeit des Xenografts und Sterberate der Versuchstiere wurde in der Literatur, welche zu beiden Modellen verfügbar ist, nicht weiter eingegangen.

Ein Bestandteil der gegenwärtigen Diskussion zur Optimierung des Xenografts ist u. a. die Verwendung von primären Patientenmaterial (*engl.: patient derived xenograft, PDX*), welches den Nachteil etablierter Zelllinien die mit zunehmender Passage eine veränderte Charakteristik aufweisen, ausschließen soll [60,61]. Ein Nachteil der PDX-Modelle allerdings ist, dass mehrere Spendermaterialien verwendet werden müssten, um spenderabhängige Effekte ausschließen zu können. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit für die experimentellen Untersuchungen die kontinuierliche Brustepithelzelllinie MCF10A ausgewählt. Bessette et al. (2015) nutzten ebenfalls MCF10A-Zellen für *in vivo*-Untersuchungen bezüglich Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktors und konnten im Gegensatz zur tumorigenen Zelllinie kein Tumorwachstums der MCF10A-Zellen nachweisen [133].

Das vorliegende Xenograftmodell von Kuperwasser et al. (2004) bietet, methodisch betrachtet, gegenwärtig eine der besten Möglichkeiten eine potentielle Tumorentstehung über einen längeren Zeitraum beobachten zu können.

4.6.2 Evaluation möglicher karzinogener Effekte im *mammary fat pad model*

Nach einer Beobachtungsdauer von sechs Monaten konnten innerhalb dieser Studie 145 Versuchstiere analysiert werden, von denen in 39 Proben diverse pathologische Veränderungen identifiziert wurden (Tabelle 17). Es traten neben 21 Mammakarzinomen und 3 Hyperplasien weitere pathologische Befunde wie 3 Fibrosarkome, 9 chronische Entzündungen und 3 Nervenscheidentumore auf. Diese pathologischen Befunde wiesen jedoch keine Abhängigkeit in der Dosis und Strahlenqualität auf. Daher ist anhand der vorliegenden Experimente zunächst davon auszugehen, dass die verschiedenen Bestrahlungsarten sowie die gewählten Bestrahlungsdosen sich nicht begünstigend auf eine mögliche Karzinogenese auswirken.

Hinsichtlich der Auswirkung der Bestrahlung mit Neutronen, zudem noch in unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten, gibt es keine vergleichbare Literatur zu *in vivo*-Experimenten. Basierend auf den vorliegenden Daten ist kein erhöhtes Potential des Tumorwachstums der

humanen Epithelzellen nach Bestrahlung mit diversen Neutronenqualitäten im Vergleich zu Photonenstrahlen zu beobachten. Diegeler & Hellweg (2017) fassten die Auswirkungen diverser Strahlenqualitäten (Gamma-, Röntgen- und Protonenstrahlen, sowie Karbonionen) auf die Kommunikation zwischen Tumor- und Immunzellen zusammen und zeigten auf, dass die Effekte infolge einer Bestrahlung mit Protonen und Karbonionen noch recht unerforscht sind. Jedoch scheinen Karbonionen einen stärkeren Effekt auf die Zell-Zell-Kommunikation zu haben [141]. Die vorliegende Studie beschäftigt sich ausschließlich mit dem Vergleich von Photonenstrahlung und diverser Qualitäten von Neutronenstrahlung, daher ist ein Vergleich schwierig, jedoch zeigt sich bei Diegeler & Hellweg (2017) dass eine Bestrahlung mit Karbonionen, welche wie Neutronen einen hohen linearen Energietransfer aufweisen, einen deutlich stärkeren Effekt auf die Zell-Zell-Kommunikation haben als Strahlungsarten mit einem geringeren Energietransfer (z. B. Photonen) [141]. Kürzlich veröffentlichte Kim et al. (2017) eine umfangreiche Studie über die Effekte von schnellen Neutronen auf das Osteosarkom, in der sie zeigten, dass schnelle Neutronen einen deutlichen stärkeren Effekt auf u. a. das klonogene Überleben, Apoptose und DNA-Schäden als Gammastrahlung besitzen, weiterhin konnten sie in einem orthotopischen Xenograft aufzeigen dass schnelle Neutronen zudem auch wirksamer im Bereich der Tumorreduktion sind [142].

Doch an dieser Publikation ist die Schwierigkeit zu erkennen, dass die vorhandene Literatur bis jetzt die Neutronen oft nur aus dem Blickwinkel betrachtet, ob und in welchem Maße diese dazu dienen können Tumorzellen zu schädigen. Eine mögliche karzinogene Wirkung der Neutronen auf Normalgewebszellen stand bisher nicht im Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen. Daher bietet die vorliegende Studie einen ersten seltenen Einblick in die Analyse der potentiellen Karzinogenese von Neutronen auf humane Brustepithelzellen im Rahmen eines orthotopen Xenograftmodells. Mit der gewählten Untersuchungsmethode konnte bisher jedoch keine Tumorentwicklung nach Exposition mit Neutronen verschiedener Qualitäten sowie Photonen nachgewiesen werden.

Einzelne Schritte der frühen Karzinogenese sind schwierig *in vivo* zu detektieren. Bereits in der *in vitro*-Situation gibt es eine Vielzahl voneinander unabhängiger Modifikationen innerhalb der Zelle, welche die Karzinogenese begünstigen. Es wäre sinnvoll einen Schwerpunkt im Bereich der *in vivo*-Untersuchungen auf die Genominstabilität der humanen Zellen zu legen. Wie schon einleitend beschrieben können nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche zu Chromosomenschäden und darüber hinaus zu einer Instabilität im Genom bzw. DNA-Mutationen führen und dadurch eine mögliche Karzinogenese begünstigen [4].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung des karzinogenen Potentials von Photonenstrahlung im niedrigen und moderaten Dosisbereich (*in vitro* und *in vivo*) am Beispiel von Normalgewebszellen der humanen Brust untersucht. Die *in vivo*-Experimente wurden zudem um diverse Neutronenqualitäten, hierbei hervorzuheben sind besonders die klinisch relevanten sekundär gestreuten Neutronen, erweitert.

Für die *in vitro*-Untersuchungen wurde die Photonenstrahlung mit zwei verschiedenen Dosisraten appliziert, einer hohen Dosisrate von 0,37 Gy/min (HDR) und einer niedrigen Dosisrate von 0,02 Gy/min (LDR). Im Vergleich hatte die HDR-Bestrahlung einen deutlich größeren Effekt auf die Überlebensfraktion. Hinsichtlich des klonogenen Überlebens zeigte sich bei allen Strahlenqualitäten eine dosisabhängige Abnahme der Überlebensfraktion, wobei die Photonen einen deutlich geringeren Effekt auf das klonogene Überleben im Vergleich zu den diversen Neutronenqualitäten besitzen.

Die Schädigung der DNA, in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen, nach HDR-Bestrahlung wies eine deutliche Dosisabhängigkeit mit ansteigender Dosis auf, dies war für die LDR-Bestrahlung nicht nachweisbar.

Weitere Untersuchungsaspekte waren die Vitalität, das Potential zur Sphärenformation und die Expression zweier Oberflächenmarker. Mit ansteigender Dosis konnte ein Anstieg der Vitalität der MCF10A-Zellen nach HDR-Bestrahlung detektiert werden, jedoch nicht für die LDR-Bestrahlung. Hinsichtlich der Sphärenformation, resultierte sowohl die HDR- als auch die LDR-Bestrahlung in einer Abnahme der Sphären. Die Bestrahlung beeinflusste die Expression der Oberflächenproteine (EpCAM, MUC-1); die MUC-1-Expression war deutlich reduziert nach der HDR-Bestrahlung. Ein ähnlicher, aber nicht so stark ausgeprägter, Effekt konnte auch innerhalb der EpCAM-Expression beobachtet werden. Die LDR-Bestrahlung verursachte vor allem eine Reduktion der EpCAM-Expression.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (*P53*, *P27* und *RB1*) deuten nach der HDR-Bestrahlung (0,1 Gy bis 2 Gy) eine destabilisierende Wirkung auf das Genom der Normalgewebszellen an. Innerhalb der miRNA-Analyse zeigte sich, dass bestimmte miRNAs (u. a. miRNA-378a-5p und miRNA-484), welche spezifisch bei einer Brustkrebserkrankung hochreguliert sind, nach der HDR-Bestrahlung, herunterreguliert wurden.

In der Proteomanalyse zeigte sich, dass mit ansteigender Dosis auch die Anzahl signifikant regulierter Proteine zunahm. So wurden das Protein IQGAP3 nach Bestrahlung signifikant

herrunterreguliert, sowie EPDR1 und FHL2 signifikant hochreguliert. Die Eingruppierung der Proteine präsentierte, dass vor allem Proteine in ihrer Regulation beeinflusst worden, welche mit metabolischen Prozessen, Prozessen des Immunsystems, der Zellaktivierung und des Zellzyklus assoziiert sind. Diese Veränderungen in der Proteinregulation sind keine eindeutigen Hinweise auf ein karzinogenes Potential der Photonenstrahlung.

Die *in vivo*-Untersuchungen begannen mit der Etablierung zweier Xenograftmodelle (*mammary fat pad*-Modell und *subrenal capsule*-Modell). Im Anschluss daran wurde das für die vorliegende Fragestellung geeignetere Verfahren, das *mammary fat pad*-Modell, ausgewählt.

Innerhalb der *in vivo*-Untersuchung erfolgte die Bestrahlung der Xenotransplantate mit Photonen sowie Neutronen diverser Qualitäten. Innerhalb von sechs Monaten konnten 145 Versuchstiere analysiert werden, von denen in 39 Proben diverse pathologische Veränderungen identifiziert wurden. Es traten neben 21 Mammakarzinomen und 3 Hyperplasien weitere pathologische Befunde wie 3 Fibrosarkome, 9 chronische Entzündungen und 3 Nervenscheidentumore auf. Insgesamt konnte keine signifikante Tumorentstehung in Abhängigkeit der unterschiedlichen Strahlenqualitäten beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Fragestellung und Auswahl der Analyseverfahren anhand der gewonnenen Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ein karzinogenes Potential der Photonenbestrahlung im niedrigen und moderaten Dosisbereich nicht eindeutig nachgewiesen werden.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund der *in vitro*- und *in vivo*-Daten kein karzinogenes Potential für eine Photonenbestrahlung mit zwei verschiedenen Dosisraten nachgewiesen werden. Zudem konnte auch kein *in vivo*-Nachweis eines möglichen karzinogenen Potentials diverser Neutronenqualitäten erbracht werden. Eventuell könnten andere Methoden, welche u. a. Auswirkungen auf das Genom und das Transkriptom stärker fokussieren, deutlichere Hinweise auf ein karzinogenes Potential der Strahlungsqualitäten liefern.

Weiterführende Untersuchungen zu einem möglichen karzinogenen Potential von Photonenstrahlung im niedrigen und moderaten Dosisbereich könnten sich somit ebenso genauer auf das Genom und das Transkriptom fokussieren, da hier erste interessante Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit erhoben werden konnten.

Ein Fokus könnte beispielsweise auf potentielle epigenetische Modifikationen der DNA gerichtet werden. Möglicherweise führen eben diese Modifikationen nach einer Bestrahlung zu der Entstehung einer malignen Neoplasie.

Ein weiterer Fokus und dazu von aktuell großem Interesse wäre die Analyse der langen nicht codierenden Abschnitte (engl. long-non-coding RNAs, lncRNA) der RNA. Deren Bedeutung für regulatorische Prozesse wie z. B. der Genexpression werden erst seit Kurzem diskutiert und gewinnen immer mehr an Bedeutung [143].

Eine weitere Optimierung sowohl des *in vitro*- als auch *in vivo*-Modells wäre die Verwendung von Primärzellen, da diese Zellen ein größeres Potential haben die natürliche Situation wiedergeben zu können. Wobei hier die Diskrepanz zwischen Kurzlebigkeit der Zellen und der längeren Versuchsdauer, vor allem im tierexperimentellen Bereich, überwunden werden muss. Zugleich müssen bei Verwendung von Primärzellen die spenderabhängigen Effekte beachtet und beispielsweise durch Poolen möglichst umgangen werden.

Um sich der klinischen Situation noch mehr anzunähern, könnte auch Probenmaterial von Patienten, welche im frühen Kindes bzw. -Erwachsenenalter bestrahlt wurden, u. a. hinsichtlich epigenetischer Modifikation, lncRNA und miRNA untersucht werden. Dies wäre besonders interessant im Hinblick auf die Untersuchung des karzinogenen Potentials der sekundär gestreuten Neutronen.

IV Literaturverzeichnis

1. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.
2. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400:464–8.
3. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011;144:646–74.
4. Boss M-K, Bristow R, Dewhirst MW. Linking the history of radiation biology to the hallmarks of cancer. *Radiat Res*. 2014;181:561–77.
5. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res*. 2003;159:567–80.
6. Kadhim M, Salomaa S, Wright E, Hildebrandt G, Belyakov O V., Prise KM, et al. Non-targeted effects of ionising radiation-Implications for low dose risk. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res*. 2013. p. 84–98.
7. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469:314–22.
8. Van Keymeulen A, Lee MY, Ousset M, Brohée S, Rorive S, Girardi RR, et al. Reactivation of multipotency by oncogenic PIK3CA induces breast tumour heterogeneity. *Nature*. 2015;525:119–23.
9. Olsson H. Cell of Origin of Breast Cancer: An Updated Hypothesis Merging Epidemiological Data with Molecular Biology. *J Carcinog Mutagen*. 2013;04:1–5.
10. Blaas L, Pucci F, Messal HA, Andersson AB, Josue Ruiz E, Gerling M, et al. Lgr6 labels a rare population of mammary gland progenitor cells that are able to originate luminal mammary tumours. *Nat Cell Biol*. 2016;18:1346–56.
11. Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2009;23:2563–77.
12. Stingl J, Raouf A, Emerman JT, Eaves CJ. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10:49–59.
13. O'Hare MJ, Ormerod MG, Monaghan P, Lane EB, Gusterson BA. Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation*. 1991;46:209–21.
14. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 4. Auflage. Thieme; 2012.
15. Fu N, Lindeman GJ, Visvader JE. *The Mammary Stem Cell Hierarchy*. 1st ed. Curr. Top. Dev. Biol. Elsevier Inc.; 2014.
16. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157–68.
17. Bachelard-Cascales E, Chapellier M, Delay E, Pochon G, Voeltzel T, Puisieux A, et al. The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells*. 2010;28:1081–8.
18. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17:1253–70.
19. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;67:93–109.

20. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*. 2015;14:196–202.
21. Howell A, Anderson AS, Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, et al. Risk determination and prevention of breast cancer. 2014;16:1–19.
22. Hall EJ, Giaccia; Ammato J. *Radiobiology for the Radiologist*. 7th Edition. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business; 2012.
23. Friedman DL, Whitton J, Leisenring W, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, et al. Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:1083–95.
24. Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, et al. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1996;334:745–51.
25. Greenfield DM, Wright J, Brown JE, Hancock BW, Davies H a, O'Toole L, et al. High incidence of late effects found in Hodgkin's lymphoma survivors, following recall for breast cancer screening. *Br J Cancer*. 2006;94:469–72.
26. Koo E, Henderson M a., Dwyer M, Skandarajah AR. Management and Prevention of Breast Cancer After Radiation to the Chest for Childhood, Adolescent, and Young Adulthood Malignancy. *Ann Surg Oncol*. 2015;545–51.
27. Schellong G, Riepenhausen M, Ehlert K, Brämshwig J, Dörffel W, Schmutzler RK, et al. Brustkrebs bei jungen Frauen nach Therapie eines Hodgkin-lymphoms im Kindes- und Jugendalter: Eine Beobachtungsstudie mit bis zu 33 Jahren Follow-Up. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111:3–9.
28. Newhauser WD, Durante M. Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:438–48.
29. Paganetti H, Athar BS, Moteabbed M, A Adams J, Schneider U, Yock TI. Assessment of radiation-induced second cancer risks in proton therapy and IMRT for organs inside the primary radiation field. *Phys Med Biol*. 2012;57:6047–61.
30. Chung CS, Yock TI, Nelson K, Xu Y, Keating NL, Tarbell NJ. Incidence of second malignancies among patients treated with proton versus photon radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Elsevier Inc.; 2013;87:46–52.
31. Zhang R, Howell RM, Giebeler A, Taddei PJ, Mahajan A, Newhauser WD. Comparison of risk of radiogenic second cancer following photon and proton craniospinal irradiation for a pediatric medulloblastoma patient. *Phys Med Biol*. 2013;58:807–23.
32. Suit H, Goldberg S, Niemierko A, Ancukiewicz M, Hall E, Goitein M, et al. Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects. *Radiat Res*. 2007;167:12–42.
33. Brenner DJ, Hall EJ. Secondary neutrons in clinical proton radiotherapy: A charged issue. *Radiother Oncol*. 2008;86:165–70.
34. Eidemüller M, Holmberg E, Jacob P, Lundell M, Karlsson P. Breast cancer risk among Swedish hemangioma patients and possible consequences of radiation-induced genomic instability. *Mutat Res*. 2009;669:48–55.
35. Eidemüller M, Holmberg E, Jacob P, Lundell M, Karlsson P. Breast cancer risk after radiation treatment at infancy: potential consequences of radiation-induced genomic instability. *Radiat Prot Dosimetry*. 2011;143:375–9.
36. Eidemüller M, Holmberg E, Jacob P, Lundell M, Karlsson P. Breast cancer risk and possible mechanisms of radiation-induced genomic instability in the Swedish hemangioma cohort after reanalyzed dosimetry. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2015;775:1–9.

37. Dondon M, de Vathaire F, Shamsaldin A, Doyon F, Diallo I, Ligot L, et al. Cancer mortality after radiotherapy for a skin hemangioma during childhood. *Radiother Oncol* . 2004;72:87–93.
38. Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, Jacqueline a, Hagan O, et al. Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). *Bmj*. 2015;351:h5359.
39. Frenzel M, Ricoul M, Benadjaoud MA, Bellamy M, Lenain A, Haddy N, et al. Retrospective cohort study and biobanking of patients treated for hemangioma in childhood – Telomeres as biomarker of aging and radiation exposure. *Int J Radiat Biol*. 2017;93:1040–53.
40. Ottolenghi, Baiocco G, Smyth V, Trott K. The ANDANTE project: A multidisciplinary approach to neutron RBE. *Radiat Prot Dosimetry*. 2015;166:311–5.
41. Hilton HN, Kantimm S, Dinny Graham J, Clarke CL. Changed lineage composition is an early event in breast carcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2013;28:1197–204.
42. Kurose K, Hoshaw-Woodard S, Adeyinka a, Lemeshow S, Watson PH, Eng C. Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1907–13.
43. Widschwendter M, Jones P a. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*. 2002;21–35:5462–82.
44. Nguyen DH, Oketch-Rabah H a., Illa-Bochaca I, Geyer FC, Reis-Filho JS, Mao JH, et al. Radiation Acts on the Microenvironment to Affect Breast Carcinogenesis by Distinct Mechanisms that Decrease Cancer Latency and Affect Tumor Type. *Cancer Cell*. Elsevier Inc.; 2011;19:640–51.
45. Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res* 2014;16:207.
46. Nielsen NH, Lodén M, Cajander J, Emdin SO, Landberg G. G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;56:105–12.
47. Mukhopadhyay R, Costes S V, Bazarov A V, Hines WC, Barcellos-Hoff MH, Yaswen P. Promotion of variant human mammary epithelial cell outgrowth by ionizing radiation: an agent-based model supported by in vitro studies. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R11.
48. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WDJ, Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*. 1990;50:6075–86.
49. Andarawewa KL, Costes S V., Fernandez-Garcia I, Chou WS, Ravani S a., Park H, et al. Lack of radiation dose or quality dependence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) mediated by transforming growth factor beta. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79:1523–31.
50. Botlagunta M, Winnard PT, Raman V. Neoplastic transformation of breast epithelial cells by genotoxic stress. *BMC Cancer*. 2010;10:343.
51. Sowa MB, Chrisler WB, Zens KD, Ashjian EJ, Opresko LK. Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutat Res*. Elsevier B.V.; 2010;687:78–83.
52. Tang J, Fernandez-Garcia I, Vijayakumar S, Martinez-Ruis H, Illa-Bochaca I, Nguyen DH, et al. Irradiation of juvenile, but not adult, mammary gland increases stem cell self-renewal and estrogen receptor negative tumors. *Stem Cells*. 2014;32:649–61.
53. Jung J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicol Res*. 2014;30:1–5.

54. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4966–71.
55. Eirew P, Stingl J, Eaves CJ. Quantitation of human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative properties using a subrenal capsule xenotransplantation assay. *Nat Protoc*. Nature Publishing Group; 2010;5:1945–56.
56. Contreras-Zárate MJ, Ormond DR, Gillen AE, Hanna C, Day NL, Serkova NJ, et al. Development of Novel Patient-Derived Xenografts from Breast Cancer Brain Metastases. *Front Oncol*. 2017;7:252.
57. Bharti SK, Mironchik Y, Wildes F, Penet M-F, Goggins E, Krishnamachary B, et al. Metabolic consequences of HIF silencing in a triple negative human breast cancer xenograft. *Oncotarget*. 2018;9:15326–39.
58. Wang Y, Wang JX, Xue H, Lin D, Dong X, Gout PW, et al. Subrenal capsule grafting technology in human cancer modeling and translational cancer research. *Differentiation*. Elsevier; 2016;91:15–9.
59. Xue A, Julovi SM, Hugh TJ, Samra JS, Wong MHF, Gill AJ, et al. A patient-derived subrenal capsule xenograft model can predict response to adjuvant therapy for cancers in the head of the pancreas. *Pancreatol*. 15:397–404.
60. Koontz BF, Verhaegen F, De Ruyscher D. Tumour and normal tissue radiobiology in mouse models: How close are mice to mini-humans? *Br J Radiol*. 2017;90.
61. Dobrolecki LE, Airhart SD, Harbor B, Alferez DG, Aparicio S. Patient-derived Xenograft (PDX) Models in Basic and Translational Breast Cancer Research. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;35:547–73.
62. Shannon P, Markiel A, Owen Ozier 2, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;2498–504.
63. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25:1091–3.
64. Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: Pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*. 2013;29:661–3.
65. Brede HJ, Dietze G, Kudo K, Schrewe UJ, Tancu F, Wen C. Neutron yields from thick Be targets bombarded with deuterons or protons. *Nucl Inst Methods Phys Res A*. 1989;274:332–44.
66. International Commission on Radiation Units and Measurements. ICRU Report No. 63, Nuclear Data for Neutron and Proton Radiotherapy and for Radiation Protection, International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, Maryland 2000, ISBN 0-913394-62-9.
67. Frankenberg-Schwager M, Spieren S, Pralle E, Giesen U, Brede HJ, Thiemig M, et al. The RBE of 3.4 MeV α -particles and 0.565 MeV neutrons relative to ^{60}Co γ -rays for neoplastic transformation of human hybrid cells and the impact of culture conditions. *Radiat Prot Dosimetry*. 2010;138:29–39.
68. Schmid E, Schlegel D, Guldbakke S, Kapsch RP, Regulla D. RBE of nearly monoenergetic neutrons at energies of 36 keV–14.6 MeV for induction of dicentric chromosomes in human lymphocytes. *Radiat Environ Biophys*. 2003;42:87–94.
69. Juerß D, Zwar M, Giesen U, Nolte R, Kriesen S, Baiocco G, et al. Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells. *Radiat Oncol*. Radiation Oncology; 2017;12:159.

70. Proia D, Kuperwasser C. Reconstruction of human mammary tissues in a mouse model. *Nat Protoc.* 2006;1:206–14.
71. Ip MM, Asch BB. *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research.* Ip MMI, Asch BB, editors. Springer US; 2000. p. 329.
72. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Tennent B, McKenna S, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD / LtSz-scid mice. *J Immunol.* 1995;154:180–91.
73. Göhde W, Uthe D, Wedemeyer N, Severin E, Greif K, Schlegel D, et al. Mutagenic effect of low energy neutrons on human chromosome 11. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:911–8.
74. Okumura K, Kinashi Y, Kubota Y, Kitajima E, Okayasu R, Ono K, et al. Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured mammalian cells. *J Radiat Res.* 2013;54:70–5.
75. Bedford J, Mitchell J. Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat Res.* 1973;54:316–27.
76. Radulovic V, Heider T, Richter S, Moertl S, Atkinson MJ, Anastasov N. Differential response of normal and transformed mammary epithelial cells to combined treatment of anti-miR-21 and radiation. *Int J Radiat Biol.* 2017;93:361–72.
77. Marková E, Schultz N, Belyaev IY. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol.* 2007;83:319–29.
78. Kundrát P, Friedland W. Non-linear response of cells to signals leads to revised characteristics of bystander effects inferred from their modelling. *Int J Radiat Biol.* 2012;88:743–50.
79. Dionet C, Muller-Barthelemy M, Marceau G, Denis J-M, Averbek D, Gueulette J, et al. Different dose rate-dependent responses of human melanoma cells and fibroblasts to low dose fast neutrons. *Int J Radiat Biol.* 2016;92:527–35.
80. Vares G, Cui X, Wang B, Nakajima T, Neno M. Generation of Breast Cancer Stem Cells by Steroid Hormones in Irradiated Human Mammary Cell Lines. *PLoS One.* 2013;8.
81. Cansolino L, Clerici AM, Zonta C, Dionigi P, Mazzini G, Di Liberto R, et al. Comparative study of the radiobiological effects induced on adherent vs suspended cells by BNCT, neutrons and gamma rays treatments. *Appl Radiat Isot.* 2015;106:226–32.
82. Eke I, Cordes N. Radiobiology goes 3D: How ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation. *Radiother Oncol.* Elsevier Ireland Ltd; 2011;99:271–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.007>
83. Falcão PL, Motta BM, de Lima FC, Lima CV, Campos TPR. Enhancement of viability of radiosensitive (PBMC) and resistant (MDA-MB-231) clones in low-dose-rate cobalt-60 radiation therapy. *Radiol Bras.* 2015;48:158–65.
84. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* Springer US; 2018;8:1–15.
85. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, et al. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med.* Elsevier; 2012;53:260–70.
86. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PLoS One.* 2015;10:1–16.
87. Ercan C, van Diest PJ, Vooijs M. Mammary development and breast cancer: the role of stem cells. *Curr Mol Med.* 2011;11:270–85.

88. Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J Pathol.* 2009;217:229–41.
89. Gameiro SR, Malamas AS, Bernstein MB, Tsang KY, Vasantachart A, Sahoo N, et al. Tumor Cells Surviving Exposure to Proton or Photon Radiation Share a Common Immunogenic Modulation Signature, Rendering Them More Sensitive to T Cell-Mediated Killing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Elsevier Inc; 2016;95:120–30.
90. Lu H, Chen I, Shimoda LA, Park Y, Zhang C, Tran L, et al. Chemotherapy-Induced Ca²⁺Release Stimulates Breast Cancer Stem Cell Enrichment. *Cell Rep.* Elsevier Company.; 2017;18:1946–57.
91. Kang Y, Hirano K, Suzuki N, Enomoto A, Morita A, Irimura T, et al. Increased expression after X-irradiation of MUC1 in cultured human colon carcinoma HT-29 cells. *Jpn J Cancer Res.* 2000;91:324–30.
92. Bolke E, Orth K, Gerber PA, Lammering G, Mota R, Peiper M, et al. Gene expression of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Eur J Med Res.* 2009;14:426–32.
93. Meineke V, Gilbertz K-P, Schilperoort K, Cordes N, Sendler A, Moede T, et al. Ionizing Radiation Modulates Cell Surface Integrin Expression and Adhesion of COLO-320 Cells to Collagen and Fibronectin in Vitro. *Strahlentherapie und Onkol.* 2002;178:709–14.
94. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003;36 Suppl 1:59–72.
95. Chang H-W, Wang H-C, Chen C-Y, Hung T-W, Hou M-F, Yuan S-S, et al. 5-Azacytidine Induces Anoikis, Inhibits Mammosphere Formation and Reduces Metalloproteinase 9 Activity in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Molecules.* 2014;19:3149–59.
96. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24⁻/low/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:1777–85.
97. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001. p. 366–74.
98. Ishizaki K, Hayashi Y, Nakamura H, Yasui Y, Komatsu K, Tachibana A. No induction of p53 phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells. *J Radiat Res.* 2004;45:521–5.
99. Mariotti LG, Pirovano G, Savage KI, Ghita M, Ottolenghi A, Prise KM, et al. Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PLoS One.* 2013;8:1–12.
100. Groesser T, Chang H, Fontenay G, Chen J, Costes S V, Helen Barcellos-Hoff M, et al. Persistence of γ -H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to γ -rays or iron ions. *Int J Radiat Biol.* 2011;87:696–710.
101. Lin Y-F, Nagasawa H, Peng Y, Chuang EY, Bedford JS. Comparison of several radiation effects in human MCF10A mammary epithelial cells cultured as 2D monolayers or 3D acinar structures in matrigel. *Radiat Res.* 2009;171:708–15.
102. van Oorschot B, Hovingh S, Dekker A, Stalpers LJ, Franken N a. P. Predicting Radiosensitivity with Gamma-H2AX Foci Assay after Single High-Dose-Rate and Pulsed Dose-Rate Ionizing Irradiation. *Radiat Res.* 2016;185:190–8.
103. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2:103–12.
104. Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to metastasis. *Cancer Discov.* 2014;4:405–14.
105. Sachdeva UM, O'Brien JM. Understanding pRb: Toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. *J Clin Invest.* 2012;122:425–34.

106. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:253–67.
107. Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*. 2004;430:797–802.
108. Hu X, Stern HM, Ge L, O'Brien C, Haydu L, Honchell CD, et al. Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol Cancer Res*. 2009;7:511–22.
109. Ghandhi SA, Smilenov LB, Elliston CD, Chowdhury M, Amundson SA. Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. *BMC Med Genomics*. *BMC Medical Genomics*; 2015;8:22.
110. Iorio MV., Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33:1126–33.
111. Eichner LJ, Perry M-C, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, et al. miR-378(*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR γ transcriptional pathway. *Cell Metab*. 2010;12:352–61.
112. Winsel S, Mäki-Jouppila J, Tambe M, Aure MR, Pruikkonen S, Salmela A-L, et al. Excess of miRNA-378a-5p perturbs mitotic fidelity and correlates with breast cancer tumourigenesis in vivo. *Br J Cancer*. 2014;111:2142–51.
113. Kooistra SM, Nørgaard LCR, Lees MJ, Steinhauer C, Johansen JV, Helin K. A screen identifies the oncogenic micro-RNA miR-378a-5p as a negative regulator of oncogene-induced senescence. *PLoS One*. 2014;9:e91034.
114. Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG, et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer*. 2014;14:200.
115. Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, et al. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin Cancer Res*. 2013;19:3600–10.
116. Hu Z, Dong J, Wang L-E, Ma H, Liu J, Zhao Y, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*. 2012;33:828–34.
117. Chang JTH, Wang F, Chapin W, Huang RS. Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas. *PLoS One*. 2016;11:e0168284.
118. Iorio M V., Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065–70.
119. Kumar D, Hassan MK, Pattnaik N, Mohapatra N, Dixit M. Reduced expression of IQGAP2 and higher expression of IQGAP3 correlates with poor prognosis in cancers. *PLoS One*. 2017;12:e0186977.
120. Hu G, Xu Y, Chen W, Wang J, Zhao C, Wang M. RNA Interference of IQ Motif Containing GTPase-Activating Protein 3 (IQGAP3) Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Breast Carcinoma Cells. *Oncol Res*. 2016;24:455–61.
121. Rosenberg EE, Gerashchenko G V, Hryshchenko N V, Mevs L V, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol*. 2017;39:131–7.
122. Riffo-Campos ÁL, Castillo J, Vallet-Sánchez A, Ayala G, Cervantes A, López-Rodas G, et al. In silico RNA-seq and experimental analyses reveal the differential expression and splicing of EPDR1 and ZNF518B genes in relation to KRAS mutations in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;36:3627–34.

123. Yan Q, Zhang W, Wu Y, Wu M, Zhang M, Shi X. KLF8 promotes tumorigenesis, invasion and metastasis of colorectal cancer cells by transcriptional activation of FHL2. *Oncotarget*. 2015;6.
124. Kim M-H, Jung S-Y, Ahn J, Hwang S-G, Woo H-J, An S, et al. Quantitative proteomic analysis of single or fractionated radiation-induced proteins in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cell Biosci*. 2015;5:2.
125. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (herceptin(TM)) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 1998;58:2825–31.
126. Stratton JA. The Murine Subrenal Capsule Human Tumor Implant Assay. *J Clin Lab Anal*. 1987;62–6.
127. Levi F, Blum JP, Bourut C, Mathá G, Lemaigre G, Reinberg A. A Four-Day Subrenal Capsule Assay for Testing the Effectiveness of Anticancer Drugs Against Human Tumors. *Cancer Res*. 1984;44:2660–7.
128. Ginestier C, Liu S, Diebel M. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest*. 2010;120:485–97.
129. Samineni S, Glackin C, Shively JE. Role of CEACAM1, ECM, and mesenchymal stem cells in an orthotopic model of human breast cancer. *Int J Breast Cancer*. 2011;2011:381080.
130. Arendt LM, McCreedy J, Keller PJ, Baker DD, Naber SP, Seewaldt V, et al. Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res*. 2013;73:6080–93.
131. Olsen CJ, Moreira J, Lukanidin EM, Ambartsumian NS. Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. *BMC Cancer*. 2010;10:444.
132. Verbeke S, Richard E, Monceau E, Schmidt X, Rousseau B, Velasco V, et al. Humanization of the mouse mammary gland by replacement of the luminal layer with genetically engineered preneoplastic human cells. *Breast Cancer Res*. 2014;16:504.
133. Bessette DC, Tilch E, Seidens T, Quinn MCJ, Wiegmanns AP, Shi W, et al. Using the MCF10A/MCF10CA1a Breast Cancer Progression Cell Line Model to Investigate the Effect of Active, Mutant Forms of EGFR in Breast Cancer Development and Treatment Using Gefitinib. *PLoS One*. 2015;10:e0125232.
134. Dontu G, Liu S, Wicha MS. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment. *Stem Cell Rev*. 2005;1:207–13.
135. Park MK, Lee CH, Lee H. Mouse models of breast cancer in preclinical research. *Lab Anim Res*. 2018;6055:160–5.
136. Barcellos-Hoff MH. Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland. *Cancer Res*. 1993;53:3880–6.
137. Keymeulen A Van, Fioramonti M, Centonze A, Bouvencourt G, Achouri Y, Blanpain C. Lineage-Restricted Mammary Stem Cells Sustain the Development, Homeostasis, and Regeneration of the Estrogen Receptor Positive Lineage Report Lineage-Restricted Mammary Stem Cells Sustain the Development, Homeostasis, and Regeneration of the Estrogen. 2017;1525–32.
138. Dunphy K, Tao L, Jerry DJ. Mammary epithelial transplant procedure. *J Vis Exp*. 2010;doi:10.379:e1849.
139. Brill B, Boecher N, Groner B, Shemanko CS. A sparing procedure to clear the mouse mammary fat pad of epithelial components for transplantation analysis. *Lab Anim*. 2008;42:104–10.

140. Fleming JM, Miller TC, Meyer MJ, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Local regulation of human breast xenograft models. *J Cell Physiol.* 2010;224:795–806.
141. Diegeler S, Hellweg CE. Intercellular communication of tumor cells and immune cells after exposure to different ionizing radiation qualities. *Front Immunol.* 2017;8.
142. Kim EH, Kim MS, Lee KH, Sai S, Jeong YK, Koh JS, et al. Effect of low- And high-linear energy transfer radiation on in vitro and orthotopic in vivo models of osteosarcoma by activation of caspase-3 and-9. *Int J Oncol.* 2017;51:1124–34.
143. Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol. Genome Biology;* 2017;18:1–13.
144. Seltzer SM, Bartlett DT, Burns DT, Dietze G, Menzel H-G, Paretzke HG, et al. Fundamental Quantities And Units For Ionizing Radiation (Revised) ICRU-report No 85. *J ICRU.* 2011;11:1–35.

V Anhang

A.1 Score Sheet

Bewertungsbogen für tierexperimentelle Untersuchungen (score sheet)		
Parameter	Symptome	Score
Aktivität	aktiv	0
	inaktiv (vorübergehende kauende Haltung, Zittern und Krämpfe nach Eingriff)	1
	inaktiv (zeitweilige kauende Haltung, Zittern und Krämpfe)	2
	Tier isoliert sich (ständig kauende Haltung, Zittern und Krämpfe)	3
Fellpflege	fell glatt und glänzend	0
	fell struppig	1
	vorübergehend Nasen- und Augenausfluss	1
	anhaltende Nasen- und Augenausfluss	2
	Selbstverstümmelung	3
Gewicht	Gewichtsabnahme von 0 %	0
	Gewichtsabnahme von <10 %	1
	Gewichtsabnahme von 10 % -20 %	2
	Gewichtsabnahme von >20 %	4
Atmung	normal	0
	flach	1
	Frequenz erhöht	1
	erschwert	2
Schmerzen	Wangen werden hochgezogen	2
	Tier läuft auf Zehenspitzen	2
	schwerfällige Gangart	3
Tumorgröße	Tumorgröße > 8mm	4
Bei Erreichen eines Score von 2 wird das Tier täglich beobachtet bei Erreichen eines Score von 4 wird das Tier vor Versuchsende schmerzlos getötet		

VI Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 10.02.2021

Dajana Juerß

VII Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zuerst bei Prof. Dr.med. Guido Hildebrandt für die Möglichkeit der Promotion zu diesem interessanten Thema bedanken. Ganz herzlich möchte ich mich auch für die Betreuung und stetige Unterstützung bedanken.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schröder für die stets sehr freundliche Unterstützung danken.

Weiterhin möchte ich Dr. rer. nat. Katrin Manda für die aufmerksame und intensive Betreuung sowie die vielen Anregungen während der Fertigstellung meiner Dissertation danken.

Zudem danke ich Dr. Stephan Kriesen für die Unterstützung und Beratung bei der experimentellen Bestrahlung.

Ein sehr großer Dank richtet sich an meine ehemaligen Kollegen Anke Sund, Meike Riedel, Sabine Schröder, Jana Baake, Elaine Reape, Annemarie Schröder und Monique Zwar für den tollen Zusammenhalt im Team, die gegenseitige Unterstützung, die aufmunternden Worte und die herzliche Atmosphäre im Arbeitsalltag.

Abschließend möchte ich meiner Familie herzlichst für die immerwährende Unterstützung und den nötigen Freiraum für die Bearbeitung der Dissertation danken.