

Lehrstuhl für Strahlentherapie und medizinische Onkologie  
der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

( Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls )

**Einfluss des p53-Status auf Apoptose, Zellzyklus und Strahlensensibilität  
nach ionisierender Strahlung**

Ines Puttkammer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten  
Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. Abend

2. Univ.-Prof. M. Molls

Die Dissertation wurde am 15.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2006 angenommen

**Meiner Familie**

---

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Austria
ATM	Ataxia teleangiectasia mutiert
Aqua dest	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
BrdU	5'-Brom-2'-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CAK	cdk aktivierende Kinase
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
cdkI	cdk-Inhibitor
Chk-1 / 2	Checkpoint Kinase-1 / 2
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
F	Frankreich
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GB	Großbritannien
Gy	Gray
h	Stunde, Stunden
HRP	Merretichperoxidase (horse raddish peroxidase)
J	Japan
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Angabe der Molarität
mA	Milliampere
min	Minute, Minuten
ml	Milliliter
MPF	Mitose promovierender Faktor
Mt	mutante Form
MV	Mittelwert (mean value)
N	Angabe der Normalität
NL	Niederlande
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer

---

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Platierungs-Effizienz
PJ	Propidiumjodid
rE	relative Einheiten
p.r.	post radiationem (nach Bestrahlung)
rel.	relativ
Rb	Retinoblastom-Genprodukt
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (standard error of mean)
SDS	sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
Sw	Schweden
vs.	versus
USA	United States of America
V	Volt
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp-Form

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand des Wissens.....</b>	<b>2</b>
2.1.    Aktivierung von p53 nach ionisierender Strahlung.....	2
2.2.    Regulation des Zellzykluses durch p53.....	3
2.2.1.    Der Zellzyklus und seine Kontrollmechanismen .....	3
2.2.2.    Der Einfluss von p53 auf die Regulation des Zellzykluses.....	5
2.3.    p53 und die Apoptose.....	9
2.4.    p53 und DNA-Reparatur .....	11
2.5.    Einfluss von p53 und seiner Funktionen auf die Strahlensensibilität .....	12
2.6.    Das Modell-System mit dem temperatursensitivem Vektor p53val <sup>135</sup> .....	14
2.6.1.    Charakterisierung der Mutante p53val <sup>135</sup> .....	14
2.6.2.    Untersuchungen mit p53val <sup>135</sup> an verschiedenen Zellsystemen .....	14
2.6.3.    Untersuchungen an mit p53val <sup>135</sup> transfizierten LN229-Zellen.....	16
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1.    Reagenzien und ihre Bezugsquellen .....	19
3.2.    Geräte und Labormaterialien.....	20

---

3.3.	Verwendete Lösungen.....	22
3.4.	Zellen und Zellkulturbedingungen.....	25
3.5.	Experimenteller Zellkulturansatz.....	26
3.6.	Röntgenbestrahlung.....	26
3.7.	Klonogenitätsassay.....	27
3.7.1.	Dosis - Effekt – Kurven.....	27
3.7.2.	Klonogenität bei 32.5°C.....	30
3.8.	Bestimmung von Verdoppelungszeit und Vitalität.....	30
3.8.1.	Zellwachstum.....	30
3.8.2.	Vitalitätsbestimmung.....	31
3.9.	Bestimmung der Apoptosefrequenz.....	33
3.9.1.	Prinzip.....	33
3.9.2.	Durchführung.....	34
3.9.3.	Auswertung.....	35
3.10.	Western Blot.....	36
3.10.1.	Prinzip.....	36
3.10.2.	Gewinnung der Zelllysate.....	36

---

3.10.3.	Proteinmengenbestimmung.....	37
3.10.4.	Gellauf, Blot-Vorgang und Detektion.....	38
3.11.	Bestimmung aktivierter Caspasen.....	41
3.11.1.	Prinzip.....	41
3.11.2.	Durchführung.....	41
3.11.3.	Auswertung.....	42
3.12.	Zellzykluskinetik.....	42
3.12.1.	Funktionsweise des Durchflusszytometers.....	42
3.12.2.	DNA-Doppelfluoreszenzmarkierung.....	43
3.12.3.	Auswertung der DNA-Markierung.....	45
3.13.	Proteinbestimmung mit Immunfluoreszenz auf Einzelzellebene.....	48
3.13.1.	Versuchsansatz und Präparation.....	48
3.13.2.	Färbung.....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
4.1.	Vitalität.....	50
4.2.	Zellwachstum.....	51
4.3.	Klonogenität und Dosis-Effekt-Kurven.....	54

---

4.3.1.	Klonogenität ohne Bestrahlung .....	54
4.3.2.	Dosis-Effekt-Kurven .....	55
4.4.	Strahleninduzierte Apoptose .....	57
4.4.1.	Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis.....	57
4.4.2.	Strahleninduzierte Apoptose im Zeitverlauf .....	58
4.4.3.	Expression Apoptose-regulierender Proteine nach Bestrahlung.....	62
4.4.4.	Caspaseaktivität.....	71
4.5.	Beeinflussung des Zellzykluses durch Bestrahlung .....	74
4.5.1.	Expression von p21 .....	74
4.5.2.	Verteilung der LN229- und LN229-p53(mt)- Zellen in den Zellzyklusphasen nach 2 Gy .....	78
4.5.3.	Verteilung der LN229-p53(wt)-Zellen in den Zellzyklusphasen nach 2Gy ....	86
4.5.4.	Einfluss verschiedener Strahlendosen auf die Zellzyklusphasen.....	87
4.6.	Expression von p53 und p21 bei 33,5 °C in LN229- und LN229- p53-Zellen....	90
4.7.	Nachweis von p21 in LN229- und LN229-p53-Zellen bei 37 °C und 33,5 °C mit Immunfluoreszenz .....	93
4.8.	Tabellarische Ergebnisübersicht .....	94

---

<b>5. Diskussion .....</b>	<b>97</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>107</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>116</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>117</b>

## 1. Einleitung

Wird eine Zelle ionisierender Strahlung ausgesetzt, so kann sie geschädigt werden, was zu einer Vielzahl von Reaktionen führt. Es handelt sich insbesondere um Blockierungen im Ablauf des Zellzyklus, die der Zelle Zeit zur Reparatur des DNA-Schadens geben sollen. Darüber hinaus kann die Zelle Apoptose, also eine aktiv gesteuerte Art des Zelltodes, einleiten. Durch diesen Mechanismus können Zellen, deren genetisches Material irreparabel geschädigt ist, aus dem Organismus entfernt werden. Einer Entartung kann somit entgegengewirkt werden. Diese Vorgänge können sich in strahlenbiologischer Hinsicht auf das Langzeitüberleben der Zellen und somit auf deren Klonogenität auswirken.

Eine wichtige Schlüsselfunktion bei diesen Vorgängen wird dem Protein p53 zugeschrieben, das an der Steuerung des Zellzyklus und der Apoptose ebenso beteiligt ist wie an der Reparatur der DNA. Da es über diese Funktionen maßgeblich zur Stabilisierung des Genoms beiträgt, wird es auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Mutationen von p53 finden sich in vielen menschlichen Tumoren. Patienten mit LiFraumeni-Syndrom, die eine Keimbahnmutation des p53-Gens aufweisen, entwickeln beispielsweise bereits in jungen Jahren eine Vielzahl von Krebserkrankungen (May et al., 1999, S. 7621 – 7633; Schwartz et al., 1998, S.325 – 326).

Mit der Frage, welche Rolle der p53-Status von Zellen für die strahleninduzierten Vorgänge der Zellzyklusblockierung und der Apoptose spielt, sowie deren Auswirkung auf die Strahlensensibilität gemessen anhand der Klonogenität als Parameter für das Langzeitüberleben, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Als Modellsystem diente eine humane Glioblastomzelllinie, LN229, die mit dem temperatursensitiven Vektor p53val<sup>135</sup> transfiziert wurde. Dieser führte bei 32,5 °C zur Überexpression des Proteins in funktionell aktiver Wildtyp-Konfiguration, bei 38,5 °C wurde das Protein zur nicht mehr funktionierenden Mutante. Ein Vergleich erfolgte zusätzlich mit unveränderten LN229-Zellen, denen p53 in funktioneller Form, aber ohne Überexpression, immanent war.

## 2. Stand des Wissens

### 2.1. Aktivierung von p53 nach ionisierender Strahlung

Wird eine Zelle ionisierender Strahlung ausgesetzt, so werden durch diese Schäden in der Zelle bedingt, die verschiedene Strukturen betreffen. Unter anderem kommt es zu Schäden an der DNA. Da die entstandenen Schäden als Stimulus für die Signaltransduktion durch p53 angesehen wird, stellt sich die Frage, wie diese Aktivierung zustande kommt.

p53 ist ein Protein, das in der Zelle ohne entsprechenden Stimulus nur in geringer Menge vorliegt, was auf die kurze Halbwertszeit von nur 20–30 min zurückgeführt wird. In normalen Zellen, auf die keine Noxen eingewirkt haben, ist es daher in der Regel nicht detektierbar (El-Deiry, 1998, S.230). Man geht davon aus, dass für die Aktivierung vor allen Dingen eine Stabilisierung des Proteins wichtig ist, weniger eine Zunahme der Translation. Diese Stabilisierung soll auf posttranskriptioneller Modifikation an verschiedenen Stellen des Proteins beruhen (Dahm-Daphi, 2000, S.279; Abraham et al., 1999, S. 854-858). Zur Aktivierung von p53 nach ionisierender Strahlung sind also Mechanismen notwendig, die zum einen die entsprechenden Schäden an der DNA zu erkennen vermögen, und zum anderen zur Modifikation des Proteins führen können. Für Phosphorylierungsvorgänge am N-terminalen Ende von p53 wird zum einen die DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase), deren Aktivierung von der Gegenwart doppelsträngiger DNA-Enden abhängig ist, als Mediator diskutiert (Salles-Passador et al., 1999, S.113-118). Zum anderen soll es nach Aktivierung von ATM-Protein (Ataxia teleangiectasia, mutiert) durch Strahlenschäden an der DNA zur p53-Phosphorylierung über das Enzym Chk-2 (Checkpoint Kinase-2) kommen (Caspari, 2000, S. 315-316; Atsushi et al., 2000, S. 1824 - 1827). Zellen, in denen diese beiden Wege defekt sind, sind weniger gut dazu in der Lage, p53 zu stabilisieren, was dessen Funktion beeinträchtigt (El-Deiry, 1998, S. 231-232). Die Phosphorylierungsvorgänge am N-Terminus sollen zu einer verringerten Bindung von p53 an MDM-2 führen (Caspari, 2000, S. 315; Dumaz, 1999, S. 7006-7007), einem Protein, das p53 bindet, zu dessen Export aus dem Kern und zur raschen Degradation führt. p53 wirkt durch transkriptionelle Induktion von MDM-2 negativ-regulierend auf sich selbst zurück (Geyer et al., 2000, S.572-573; Juven-Gershon et al., 1999, S. 71-74). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung am N-Terminus zu einer Zunahme der Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor führen kann (Jabbur et al., 2000, S. 6204-6207). Wie wichtig diese Phosphorylierungsvorgänge aber wirklich sind und ob noch andere Faktoren und Vorgänge Einfluss haben, bleibt noch zu

klären, da ein Verlust von Stabilität oder Funktion von p53 nach Entfernung aller Phosphorylierungen nicht obligat ist (Ashcroft et al., 1999, S. 1753-1758) und Einfügen von Phosphatgruppen an bestimmten Orten nicht alle Funktionen von p53 in gleichem Maße beeinflusst (Jack et al., 2002, S. 9826-9828). Als weiterer Effekt der posttranslationalen Modifikation wird eine Beeinflussung der Affinität von p53 zu bestimmten Promotorsequenzen der DNA angesehen. Für erhöhte Bindungsaffinität zu diesen Regionen werden Veränderungen am C-terminalen Ende des Proteins verantwortlich gemacht, zu denen Dephosphorylierungen und Acetylierungen gehören (Dumaz et al., 1999, S.7002). Auch hier soll ein Einfluss von ATM bestehen (Caspari, 2000, S. 317; Salles-Passador et al., 1999, S. 114).

Ist also die DNA einer Zelle durch ionisierende Strahlung beschädigt, kommt es zu einer Reihe von Modifikationen von p53, die sowohl zu einer verlängerten Halbwertszeit des Proteins und somit zu einer Zunahme der Proteinmenge in der Zelle führen, als auch dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor beeinflussen.

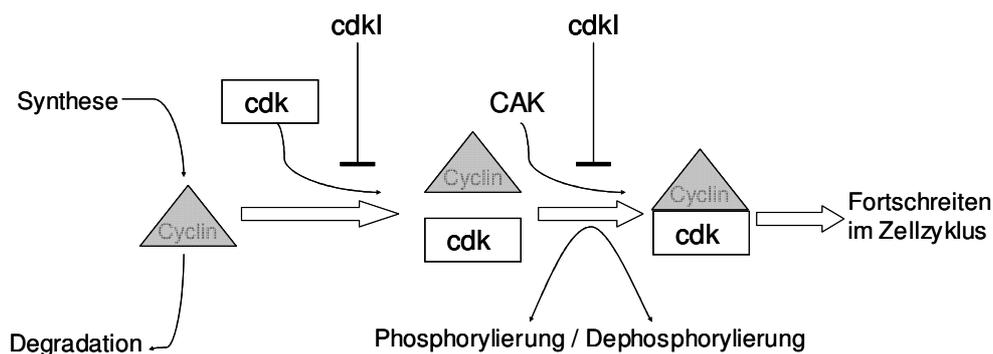
## **2.2. Regulation des Zellzykluses durch p53**

### **2.2.1. Der Zellzyklus und seine Kontrollmechanismen**

Spricht man vom Zellzyklus, so meint man damit den regelhaften Ablauf von verschiedenen Vorgängen, die zwischen einer Zellteilung und der nächsten liegen. Man teilt sie in vier Phasen ein, während derer die identische Duplikation des genetischen Materials und dessen gleichmäßige Verteilung auf zwei Tochterzellen erfolgt. Nach abgelaufener Mitose befindet sich die Zelle zunächst in der G1-Phase, in der Wachstumsvorgänge, Proteinsynthese und Vorbereitung der DNA - Synthese erfolgen. In der sich anschließenden S-Phase wird das genetische Material verdoppelt, danach befindet sich die Zelle in der G2-Phase, in der sie sich auf die eigentliche Zellteilung, die Mitose vorbereitet. Diese ist nur von kurzer Dauer, die entstandenen Tochterzellen befinden sich danach erneut in der G1-Phase. Zellen, die nicht den Zellzyklus durchlaufen und im Ruhezustand sind, befinden sich in der G0-Phase. Aus dieser können sie durch mitogene Stimuli, also Wachstumsfaktoren, wieder in den Zellzyklus eintreten. In der G0-Phase befinden sich auch hochdifferenzierte Zellen des Organismus, die spezielle Funktionen wahrzunehmen haben. Ein Beispiel hierfür sind die nicht mehr teilungsfähigen Zellen des Nervensystems (gesamter Abschnitt siehe: Buddecke, 1994, S.

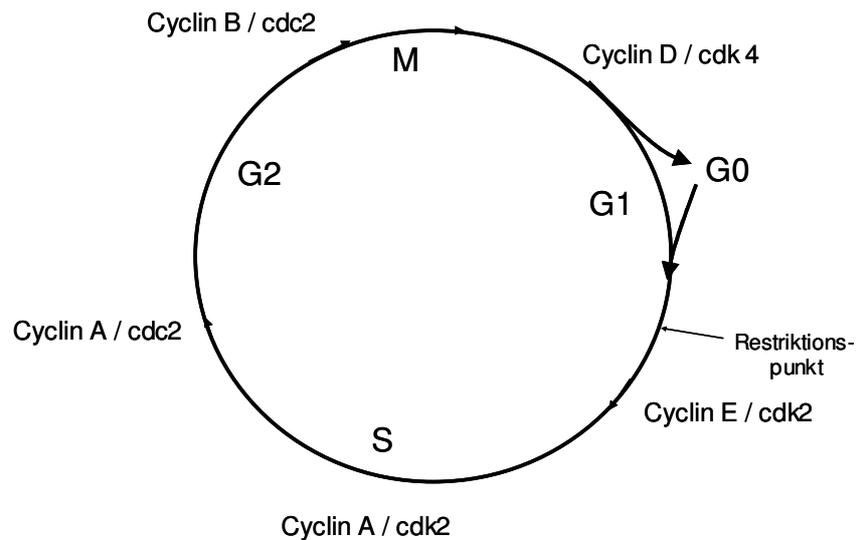
525). Dieser regelhafte Ablauf wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Grundsätzlich wird der Ablauf des Zellzykluses durch 4 verschiedene Molekülklassen reguliert. Das sind zum einen die so genannten Cycline, von denen mehr als 10 verschiedene bekannt sind. Da die Synthese sowie Degradation der Cycline in engem Zusammenhang mit dem Ablauf des Zellzykluses stehen, sind hohe Spiegel spezifischer Cycline kennzeichnend für die verschiedenen Zyklusphasen. Die Cycline bilden Komplexe mit den cdk's (Cyclin abhängigen Kinasen) aus, die in immer gleicher Menge in der Zelle enthalten sind. Mit Hilfe von CAKs (cdk aktivierender Kinasen) wird dieser Komplex über Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge aktiviert und führt zur Zellzyklustransition. Durch cdkIs (cdk inhibierende Proteine) ist eine negative Regulation / Blockade des Zellzykluses möglich. cdkIs können sowohl die Assoziation von Cyclin und cdk verhindern, als auch der Aktivierung des Komplexes mittels CAK entgegenwirken.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der an der Zellzyklusregulation beteiligten Mechanismen.

Die Regulation erfolgt jeweils an bestimmten Kontrollpunkten, die am Übergang von der G1- zur S-Phase, in der späten S-Phase, zwischen der G2- Phase und der Mitose sowie zwischen Mitose und G1-Phase liegen. Sie werden durch verschiedene Ursachen und daraus resultierende Mechanismen aktiviert, zu denen unter anderem auch Schäden an der DNA und den Chromosomen zählen. Durch die folgende Blockade soll die Zelle Zeit gewinnen, um entdeckte Schäden am Erbmateriale zu beheben und die Stabilität des Genoms zu gewährleisten (Pavletich, 1999, S. 822; McDonald et al., 2000, S. 872 – 879; Shackelford et al., 1999, S. 6-11). Wie die über p53 vermittelte Beeinflussung der Zellzyklustransition zustande kommt, soll im Weiteren genauer dargelegt werden. Einen Überblick über die in den verschiedenen Phasen wichtigen Cycline und cdk's bietet Abb.2.2.



**Abb. 2.2:** Schematische Übersicht über die verschiedenen Zellzyklusphasen und die entsprechenden Cycline / cdk – Komplexe (frei nach Shackelford et al., 1999, S. 6)

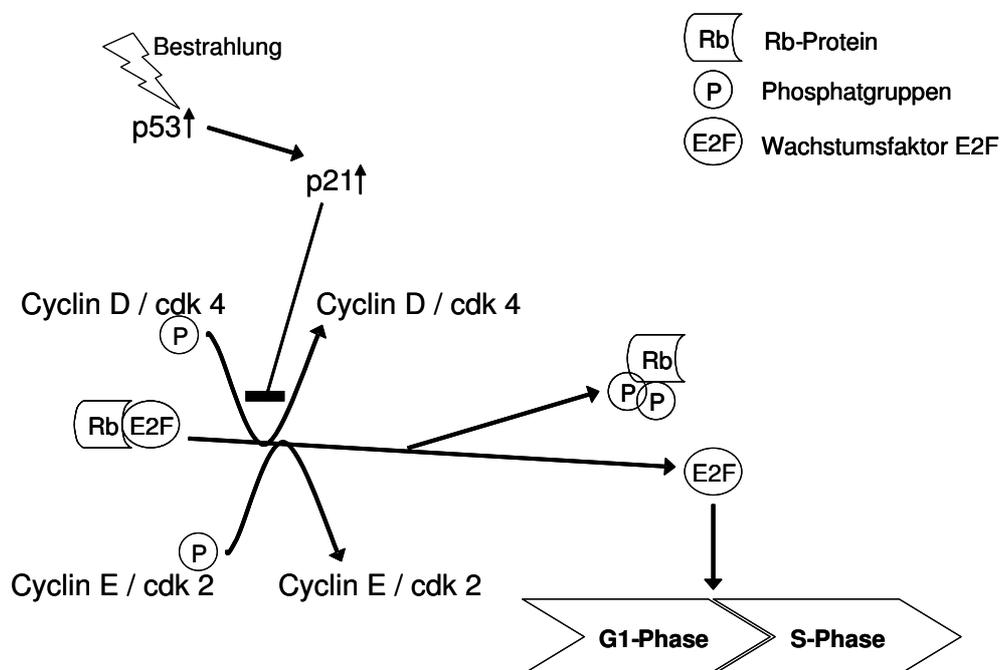
## 2.2.2. Der Einfluss von p53 auf die Regulation des Zellzykluses

### 2.2.2.1. G1- zu S-Phase-Übergang und der Einfluss von p53

Der Übergang von der G1- zur S-Phase wird durch spezifische Mechanismen kontrolliert. Nur bis zu einem bestimmten Punkt benötigt die Zelle Stimulation durch Mitogene. Ist dieser Restriktionspunkt erreicht, lässt sich die Progression in die S-Phase nicht mehr aufhalten. Wichtig in diesem Zusammenhang sind bestimmte Cycline und cdk's, die diese Vorgänge kontrollieren. Der wichtigste Schritt ist hierbei die mehrfache Phosphorylierung von Rb (Retinoblastom-Genprodukt) durch den Cyclin D / cdk4 – sowie den Cyclin E / cdk2 - Komplex. Rb-Protein liegt im nicht phosphorylierten Zustand als Komplex mit dem Wachstumsfaktor E2F vor. Durch die Modifikation kommt es jedoch zur Dissoziation dieses Komplexes. E2F ist nun in der Lage, seine transkriptionellen Eigenschaften wahrzunehmen. Es kommt zur vermehrten Transkription vieler für die S-Phase wichtiger Genprodukte. Ab einer bestimmten Menge von E2F scheint der Restriktionspunkt überschritten zu sein, die Zelle tritt unweigerlich in die S-Phase über (Shackelford et al., 1999, S. 6 – 8; McDonald et al., 2000, S. 879). Außer den bereits beschriebenen Mechanismen scheinen an der Steuerung des Überganges von der G1- in die S-Phase noch weitere Faktoren beteiligt zu sein. Man nimmt an, dass es über positives Feedback zu einer Art Schalterfunktion kommt, die den Weg

in die S-Phase freigibt. Ein wichtiger daran beteiligter Faktor scheint Cdc25A zu sein (Aguda et al., 1999, S. 324).

Kommt es infolge von DNA- Schäden nach ionisierender Strahlung zur Zunahme von p53 in der betroffenen Zelle, so erfolgt ein konsekutiver Anstieg seines Transkriptionsproduktes p21, welches zur Familie der CIP / KIP cdks gehört (Nakayama et al, 1998, S. 1020; Kirsch et al, 1998, S. 3159). p21 blockiert cdk4 im Komplex aus Cyclin D / cdk 4 und verhindert auf diese Weise die Phosphorylierung des Rb-Proteins, so dass es nicht zur Freisetzung von E2F kommt. Die Cyclin E – Menge in der Zelle steigt nicht genügend an, eine Progression in die S-Phase findet nicht statt. Es kommt zum G1-Block (Shackelford et al., 1999, S. 8). Einen Überblick gibt Abb. 2. 3.



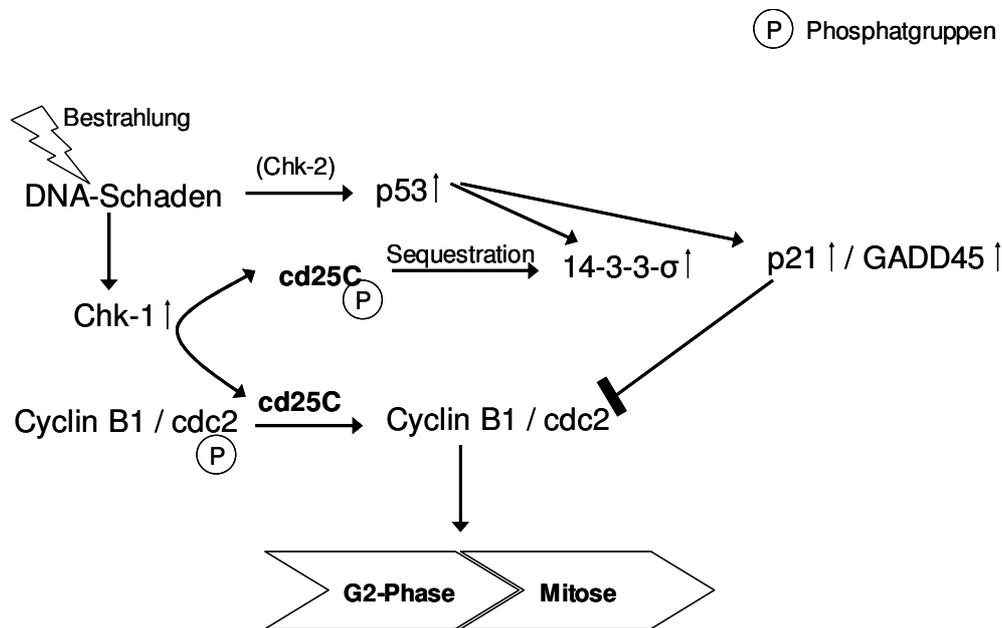
**Abb. 2.3:** Überblick über die hauptsächlich an der Transition von der G1- zur S-Phase beteiligten Mechanismen und den Einfluss von p53 am entsprechenden Kontrollpunkt

### 2.2.2.2. G2-Phase -Übergang zur Mitose und der Einfluss von p53

Bisher weniger gut untersucht sind die einzelnen Mechanismen, die einen Beitrag zur G2/M-Transition leisten. Die entscheidende Rolle beim Übergang zur Mitose schreibt man dem MPF (Mitose promovierender Faktor) zu. Dieser setzt sich zusammen aus dem G2-Phase Cyclin B1 und der cdk cdc2. Da dieser Komplex zunächst aufgrund von Phosphorylierungen an cdc2 in inaktiver Form vorliegt, ist ein Aktivierungsschritt notwendig. Das hierfür zuständige Enzym / CAK ist cdc25C, welches Phosphataseaktivität hinsichtlich cdc2 besitzt und die blockierenden Phosphatgruppen zu entfernen vermag. Cdc25C soll hier auch über einen positiven Feedback-Mechanismus zur Verstärkung des Signals in der Zelle führen. Der Komplex aus Cyclin B1 und cdc2 ist nun aktiviert und übt Kinasefunktion auf eine Vielzahl von Proteinen aus, darunter auch das Histon H1. Die Veränderungen bringen die Zelle dazu, aus der G2-Phase auszutreten und die Mitose zu beginnen (McDonald et al., 2000, S. 879; Shackelford et al., 1999, S. 8).

Eine Verzögerung des Zellzykluses in der G2-Phase ist eine universelle Reaktion von Zellen auf ionisierende Strahlung. Dies trifft sowohl auf Zellen mit positivem p53-Status zu, als auch auf solche, denen keine p53-Aktivität inne ist (Hwang et al., 1998, S. 56). Als die Haupteffektoren des G2 - Blockes werden verminderte Expression von Cyclin B1 (Kao et al., 1997, S. 757) und Phosphorylierungen an cdc2 angenommen, die zu einer verringerten Aktivität des entsprechenden Komplexes führen. Letztere kommt unter anderem durch das nach Strahlenschädigung der DNA aktivierte Enzym Chk-1 zustande, welches cdc25C phosphoryliert und somit die Entfernung von Phosphatresten an cdc2 verhindert (Hwang et al., 1998, S. 52 - 55). p53 scheint in Zusammenhang mit der Blockierung in der G2-Phase nach Bestrahlung durchaus eine Funktion wahrzunehmen. Als Mediator dient hier das über p53 transkriptionell kontrollierte Protein 14-3-3- $\sigma$ . Dieses ist in der Lage, über Chk-1 phosphoryliertes cdc25C zu binden und somit eine Aktivierung des Komplexes Cyclin B1 / cdc2 zu verhindern, wodurch die Progression in die Mitose unterbunden wird (Adams et al., 1998, S. 794 – 794; Amundson et al., 1998, S. 3291). Auch ein anderes p53-reguliertes Protein scheint an der Prolongation der G2-Phase beteiligt zu sein, nämlich GADD45. Als Mechanismus konnte zumindest in vitro eine Spaltung des Komplexes Cyclin B1 / cdc2 gezeigt werden (Amundson et al., 1998, S. 3291). Auch ein gewisser Einfluss von p21 über Blockierung entsprechender cdk sowie ein direkter Einfluss von p53 auf die zelluläre Lokalisation von cdc2 scheinen Einfluss auf die G2-Phase nach Bestrahlung zu haben (Hwang et al., 1998, S. 55; Winters et al., 1998, S. 673). Insgesamt besteht in diesem

Zusammenhang noch Forschungsbedarf, um die zu Grunde liegenden Mechanismen weiter zu erhellen. Einen Überblick über die beschriebenen Funktionen bietet Abb. 2.4.



**Abb. 2.4:** Überblick über die hauptsächlich an der Transition von der G2-Phase zur Mitose beteiligten Mechanismen und den Einfluss von p53

### 2.2.2.3. Weitere Kontrollpunkte im Zellzyklus

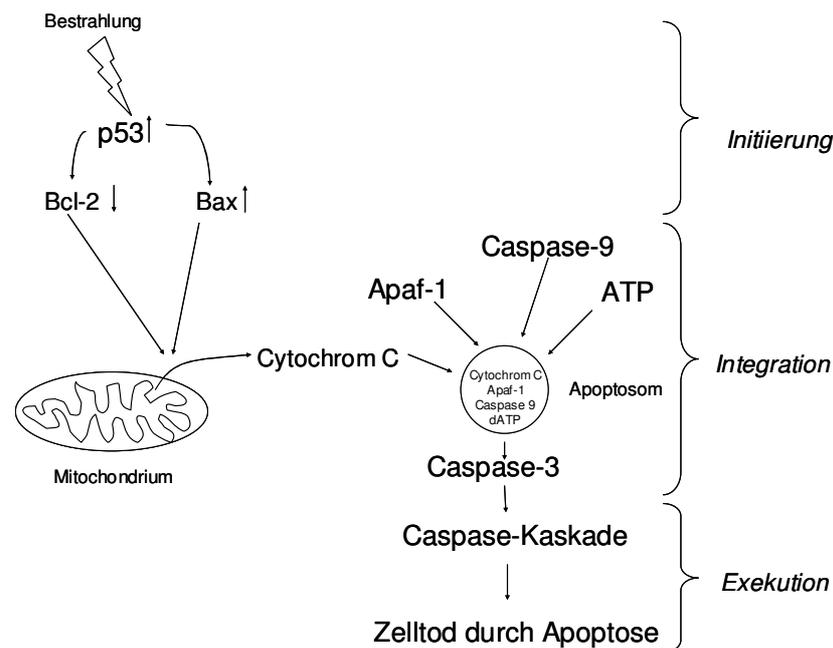
Neben den bereits beschriebenen Kontrollpunkten im Zellzyklus existieren noch weitere, an denen man keinen wesentlichen Einfluss von p53 vermutet, die aber der Vollständigkeit halber kurz erwähnt werden sollen. Zum einen wird der Übergang von der S- zur G2-Phase reguliert, wobei 3 Mechanismen wichtig erscheinen: die Zunahme des aktiven Komplexes aus Cyclin A und cdk2, die Eliminierung der für die G1-Phase-Progression wichtigen Typ E - Cycline sowie die Verminderung der Bindung von E2F an die DNA. Über den Checkpoint-Mechanismus ist wenig bekannt. Nach Zellschädigung durch ionisierende Strahlung kommt es aber zur vorübergehenden Supprimierung der DNA-Synthese. Hierfür scheint am ehesten ATM direkt verantwortlich zu sein (Shackelford et al., 1999, S. 7 - 9; McDonald et al., 2000, S. 879). Zum anderen existiert außerdem ein Spindel-Kontrollpunkt in der Mitose, der die ordnungsgemäße Verteilung der Schwester-Chromosomen gewährleistet und Poly- sowie Aneuploidie verhindern soll. Ein Einfluss von p53 an dieser Stelle scheint möglich, wird aber kontrovers gesehen (Shackelford et al., 1999, S. 10 – 11; May et al., 1999, S. 7628; Schwartz et al., 1999, S. 329; Amundson et al., 1998, S. 3292).

### 2.3. p53 und die Apoptose

Der Begriff Apoptose bezeichnet eine von der Zelle aktiv gesteuerte Form des Zelltodes, währenddessen es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle kommt. Man kann bei den betroffenen Zellen eine Schrumpfung beobachten, die von einer Kondensation des Chromatins und einer Blasenbildung der Zellmembran begleitet wird. Es kommt zur Kernfragmentation und schließlich zum Zerfall der Zelle in membrangebundene apoptotische Körperchen, welche *in vivo* rasch durch Phagozytose abgeräumt werden (Wang, 1999, S. 4759; Schmitt et al., 1999, S. 127). Der Ablauf der Apoptose wird schematisch in drei Phasen gegliedert, welche sich in ihren biochemischen Schritten teilweise überschneiden (Rudner et al., 2001, S. 6; Salvesen et al., 1997, S. 444). Zu Beginn steht die Effektorphase, in welcher es zur Initiation des pro-apoptotischen Signals kommt. An diese schließt sich die Integrationsphase an, in welcher pro- und anti-apoptotische Signale in der Zelle zusammenwirken und schließlich zur Entscheidung über das weitere Schicksal der Zelle führen. Die letzte Phase ist die der Exekution, in der es zur Aktivierung der biochemischen Prozesse kommt, welche zur Ausprägung der für die Apoptose typischen Veränderungen führen.

Bei der Auslösung von Apoptose durch ionisierende Strahlung wird p53 eine wichtige Rolle zugeschrieben (Abend et al., 1998, S. 164-165). Ein als wichtig eingestuft, über p53 transkriptionell aktivierter Effektor ist das proapoptotische Protein Bax. Zur Auslösung der Apoptose scheint hierbei das Verhältnis von Bax zu seinem antiapoptotisch wirkendem Gegenspieler Bcl-2, der ebenfalls der Kontrolle durch p53 unterliegt, ausschlaggebend zu sein. Da Bcl-2 p53-abhängig nach unten reguliert wird, führt eine Zunahme von p53 in der Zelle zu einem Überwiegen des proapoptotischen Signals von Bax und somit zur Apoptose (Sheikh et al., 2000, S. 172; Benchimol, 2001, S. 1049). Die beiden Gegenspieler Bax und Bcl-2 gehören zur selben Proteinfamilie (Tsujimoto et al., 2000, S. 6). Auf zellulärer Ebene greift Bax am Mitochondrium an, in dessen Membran es dadurch zu einer Veränderung der Membranpermeabilität kommt. Als ein möglicher Angriffspunkt wird hier der PTP-Komplex (permeability transition pore) betrachtet (Marzo et al., 1998, S. 1266-1269). Über die Wirkung an der mitochondrialen Membran gelangt Apoptose-auslösendes Cytochrom C (Brustugun et al., 1998, S. 661), welches sich eigentlich innerhalb des Mitochondriums befindet, in das Zytoplasma der Zelle (Kirsch et al., 1998, S. 3159; Jürgensmeier et al., 1998, S. 4998-4999; Antonsson et al., 2000, S. 54). Cytochrom C ist in der Lage, mit dem zytoplasmatischen Apaf-1, der Caspase-9 sowie ATP einen Komplex auszubilden, den man als Apoptosom bezeichnet.

Dieses Apoptosom ist im Stande, über Aktivierung von Caspase-3 zu einer hintereinander geschalteten Aktivierung weiterer Caspasen zu führen, was man als die Caspase-Kaskade bezeichnet (Porter, 1999, S. 398-399; Schuler et al., 2001, S. 684). Bei den Caspasen, von denen bisher zumindest 13 bekannt sind, handelt es sich um Proteasen, welche ihr Substrat in vielen verschiedenen Zellstrukturen finden. Die Degradation dieser Strukturen durch die Caspasen führt schließlich zu den morphologischen Veränderungen der Zelle, die als Charakteristikum der Apoptose dienen. Es existiert eine Vielzahl von Proteinen, die von Caspasen gespalten werden. Dabei handelt es sich um stabilisierende Faktoren von Zytoplasma und Kern ebenso wie um Moleküle, die an der Signaltransduktion beteiligt sind oder regulierend auf die Transkription einwirken. Auch Zellzyklusregulatoren und an Reparaturmechanismen beteiligte Proteine werden von Caspasen zerlegt. Man geht nicht davon aus, dass es ein einziges Substrat der Caspasen gibt, welches zum Zelltod führt. Vielmehr nimmt man an, dass es durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade zu einer Beeinflussung vieler Proteine der Zelle kommt, was im Zusammenspiel schließlich zur Apoptose mit ihren typischen strukturellen Veränderungen führt (Stroh et al., 1998, S. 997 - 999). Eine Übersicht über die eben beschriebenen von p53 aus zur Apoptose führenden Vorgänge soll Abb. 2.5 bieten. Daneben existieren weitere durch p53 kontrollierte Effektoren der Apoptose. Zu ihnen gehören die Rezeptoren DR5 und Fas, von welchen man annimmt, dass sie ebenfalls zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führen, sowie etliche andere Proteine (Moll et al., 2001, S. 65). Desweiteren existiert eine Gruppe von PIG's, sogenannten p53-induzierbaren Genen. Man geht davon aus, dass diese zu einer Zunahme der zellulären Oxidation führen und über diese zur Auslösung der Apoptose führen (Benchimol, 2001, S. 1049).



**Abb. 2.5:** Schematischer Überblick über den Ablauf des durch Bestrahlung induzierten apoptotischen Signals. Die geschweiften Klammern zeigen in etwa den Umfang der drei verschiedenen Phasen, die unterschieden werden.

## 2.4. p53 und DNA-Reparatur

Eine weitere Funktion von p53 beim Erhalt der Stabilität des Genoms und der Reaktion auf genotoxischen Stress ist seine Rolle bei der DNA-Reparatur. Man nimmt an, dass p53 über verschiedene Mechanismen an der Reparatur von Schäden an der DNA, wie sie unter anderem durch ionisierende Strahlung entstehen, beteiligt ist. Eine Rolle schreibt man p53 bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur zu, da es über Bindung auf die Aktivität an ihr beteiligter Enzyme, den Helikasen, Einfluss nimmt (López-Sáez et al., 1998, S. 1205; Levine, 1997, S. 328). Auch das über p53 transaktivierte GADD45 erhöht die DNA-Exzisionsreparatur in vitro, so dass über diesen Mechanismus eine Beteiligung an der Wiederherstellung des geschädigten Genoms möglich ist (Eckardt-Schupp et al., 1999, S. 167). Eine Interaktion von p53 konnte auch mit Rad51 nachgewiesen werden, einem Protein, welches eine zentrale Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination spielt, wobei hierbei keine Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor nötig ist (Khanna et al., 2001, S. 248 – 249). An anderer Stelle konnte allerdings eine Inhibition der homologen Rekombination durch p53 nach DNA-Schäden gezeigt werden, was seine Rolle der Fehlerkontrolle bei der

Reparatur nahe legt (Akyüz et al., 2002, S. 6313). Desweiteren konnte ein zellzyklusspezifischer Zusammenhang zwischen p53 und der Basen-Exzisions-Reparatur gezeigt werden. So führte die Zunahme von p53 nach Bestrahlung zu einer Erhöhung dieses Reparaturmechanismus in der G1-Phase unabhängig von transkriptioneller p53-Aktivität, verringerte ihn aber zugunsten der Apoptose in der G2-Phase (Offer et al., 2001, S. 6313). p53 scheint also auch hinsichtlich der DNA-Reparatur seine universelle Funktion als „Wächter des Genoms“ wahrzunehmen.

## **2.5. Einfluss von p53 und seiner Funktionen auf die Strahlensensibilität**

Aufgrund der im Vorhergehenden beschriebenen, über p53 vermittelten Vorgänge nach Bestrahlung stellt sich die Frage, welchen Einfluss der p53-Status auf die Strahlensensibilität der Zellen und ihr Langzeitüberleben hat. Dieses wird in vitro mittels Klonogenitätsassay, also Dosis-Effekt-Kurve, bestimmt. Aufgrund der heute bestehenden, widersprüchlichen Datenlage lassen sich bisher keine sicheren Aussagen hierüber treffen (Cohen-Jonathan et al., 1999, S. 81; Olive et al., 1997, S.700 - 701; Rupnow et al., 1999, S. 121 - 127). Der Beweis, dass eine Mutation von p53 generell zu erhöhter Strahlenresistenz führt, steht aus. p53-vermittelte Apoptose scheint eine große Rolle bei der Empfindlichkeit von hämatologischen Zellen auf Bestrahlung zu spielen, während sie auf das Überleben / Klonogenität von Zellen solider Tumoren keinen Effekt zu haben scheint. In diesem Zusammenhang wird der Funktion von p53 als Zellzyklusregulator größere Bedeutung zugemessen (Dahm-Daphi, 2000, S.281 – 283). So konnte gezeigt werden, dass ein durch Mutation von p53 bedingter Verlust des G1-Arrestes in Zellen aus soliden Tumoren zu erhöhter Strahlenresistenz gemessen in Klonogenitätsassays führte. Eine Korrelation des G2-Blockes mit der Strahlensensibilität konnte nicht gezeigt werden (McIlwrath et al., 1994, S. 3718 – 3722; Bristow et al., 1996, S. 208). Die Gründe, warum die Untersuchung der Rolle der p53-abhängigen Apoptose in soliden Tumoren widersprüchliche Ergebnisse lieferte, könnten damit zusammenhängen, dass sich ihr Effekt stark zelltypspezifisch auswirkt oder dass die Effekte der Apoptose von Mitose-assoziiertem Tod durch Nekrose überdeckt werden (Weber et al., 2002, S. 138). Auch spielt wahrscheinlich die zeitliche Koordination der strahleninduzierten Apoptose eine erhebliche Rolle: so scheint in den bereits erwähnten hämatologischen Zelllinien die direkt nach Bestrahlung induzierte, rapide Apoptose Bedeutung für deren Strahlensensibilität zu

haben. Die Apoptose vom verzögertem Typ nach einer oder mehrerer Mitosen beobachtet man eher bei soliden Tumoren. Ihre Rolle bei der Empfindlichkeit gegenüber Strahlung ist nicht sicher beurteilbar (Olive et al., 1997, S. 704). Strahleninduzierte Apoptose beeinflusst jedenfalls nicht gezwungenermaßen die Klonogenität der Zellen (Cohen- Jonathan et al., 1999, S. 81, Rudner et al., 2001, S. 5 - 6). Überzeugende Daten, dass apoptotische Prozesse die Strahlenempfindlichkeit von Zellen beeinflussen, stehen noch aus. Außerdem nimmt man an, dass hinsichtlich des Ausmaßes dieser Prozesse ein sehr großer Unterschied bestehen muss, um sich auf das klonogene Überleben der Zellen auszuwirken. Zusammenfassend muss man davon ausgehen, dass der Zelltyp, der genetische Kontext sowie die Umgebungsbedingungen der entsprechenden Zellen Faktoren sind, die beeinflussen, in welchem Maße p53 einen Beitrag zum Ausmaß des klonogenen Überlebens liefert (Rupnow et al., 1999, S. 125). Brown et al. werteten die vorhandenen Studien über den Einfluß des p53-Status in soliden Tumoren hinsichtlich des klonogenen Überlebens nach ionisierender Bestrahlung aus. Sie fanden widersprüchliche Daten und zogen letztendlich den Schluß, dass weder p53 noch die Fähigkeit zur Apoptose das Ausmaß der Koloniebildungsfähigkeit nach genotoxischen Noxen beeinflusst (Brown et al., 1999, S. 1397 – 1398). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchliche Datenlage liefert Abend: demzufolge ist Apoptose nicht die einzige Art des Zelltodes nach Bestrahlung. Je nach Zelltyp, Stressor und Intensität des Stressors käme es zu verschiedenen Formen des Zelltodes und einem Wechsel zwischen diesen. Apoptose ist demnach nur eine von vielen Möglichkeiten für den Untergang von Zellen nach Irradiation. Möchte man den Strahleneffekt auf die Klonogenität untersuchen, scheint es demnach notwendig zu sein, neben der Apoptose auch den Zellverlust durch Nekrose, Mikrokernbildung, und andere Arten des aktiven Zelltodes zu betrachten (Abend, 2003, S.937). Entsprechend den genannten Einflussfaktoren nähme die Apoptose All diese Überlegung sind vor allem für ein Ziel wichtig: die Entwicklung neuer Strategien bei der klinischen Therapie von Tumorpatienten unter Einbeziehung von p53 beispielsweise mittels Genterapie bei der Strahlentherapie, und der Entwicklung neuer prognostischer Kriterien, wie sie durch die Analyse des p53-Status möglich sein könnten (Bristow et al., 1996, S. 210 - 215; Lane et al., 2002, S. 38 - 42; Kim et al., 2001, S.1041 - 1046).

## 2.6. Das Modell-System mit dem temperatursensitivem Vektor

### p53val<sup>135</sup>

#### 2.6.1. Charakterisierung der Mutante p53val<sup>135</sup>

Bei der temperatursensitiven Mutante p53val<sup>135</sup>, welche ursprünglich von der Maus stammt, handelt es sich um eine Mutante mit einer Missense-Mutation der Aminosäurekette an Position 135. An dieser Stelle ist die Aminosäure Alanin durch Valin ersetzt. Diese Veränderung liegt in der Region des Proteins, die für die Bindung an die DNA verantwortlich ist (Michalovitz et al., 1990, S. 671; Guillouf et al., 1998, S. 107–108). p53val<sup>135</sup> liegt bei einer Temperatur von 39 °C komplett als mutante Form vor, die immer im Zytoplasma der Zelle zu finden ist und somit keine Transkriptions-Funktion wahrnehmen kann. Bei 37 °C findet sich eine Mischung von Wildtyp-Form und mutanter Form. Es wird davon ausgegangen, dass durch Ausbildung eines tetrameren Komplexes aus Wildtyp, Mutante und Heatshock-70-Protein p53 nicht in den Zellkern gelangen kann. Die mutante Form hält also die Wildtyp-Form im Zytoplasma fest, so dass diese nicht als Transkriptionsfaktor wirken kann. Man spricht von einem negativen transdominanten Phänotyp. Bei 32,5 °C liegt p53val<sup>135</sup> als Wildtyp vor und ist im Kern lokalisiert, wo die Transkriptionsfunktion zum tragen kommen kann (Martinez et al., 1991, S. 152 und S. 156, Milner et al., 1990, S.481 - 483; Rama et al., 1998, S. 159). p53val<sup>135</sup> wird deshalb als temperatursensitive Mutante angesehen (Michalovitz et al., 1990, S. 677).

#### 2.6.2. Untersuchungen mit p53val<sup>135</sup> an verschiedenen Zellsystemen

Bei der permissiven Temperatur von 32,5 °C konnte in verschiedenen Zelllinien eine Wachstums-supprimierende Wirkung des p53val<sup>135</sup> festgestellt werden. Dabei handelte es sich um eine Einschränkung des Wachstums gegenüber der ursprünglichen Zelllinie oder einen totalen Wachstumsstillstand. Beide Effekte konnten in verschiedenen Brustkrebszelllinien gezeigt werden, wobei der totale Wachstumsstillstand dann mit der Ausbildung eines Blockes in der G1-Phase des Zellzyklus einherging (Eliyahu et al., 1994, S.171–173). Auch in Zelllinien aus embryonalen Rattenfibroblasten, die mit p53val<sup>135</sup> transfiziert worden waren, fand sich ein Wachstumsstillstand bei 32,5 °C, der bei Überführung in eine 37 °C-Umgebung wieder reversibel war. Die Vitalität dieser Zellen war

bei 32,5 °C nicht eingeschränkt. Deswegen wurde ein Zellzyklus-Block an verschiedenen Stellen, also sowohl am Übergang G0/G1 – S-Phase als auch beim Übergang G2-Phase zur Mitose in den mit p53val<sup>135</sup> - transfizierten bei 32,5 °C Zellen postuliert (Michalovitz et al., 1990, S. S.674). An der embryonalen Rattenfibroblasten – Zelllinie A 1-5 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Zellen nach Transfektion mit p53val<sup>135</sup> bei der permissiven Temperatur nicht mehr teilten. Die Zellen zeigten aber weiterhin Proteinsynthese, wobei die DNA – Synthese herabgesetzt war. Die Zellen waren hier in der G1-Phase des Zellzyklus blockiert (Martinez et al., 1991, S. 154–156). Auch in verschiedenen Glioblastom - Zelllinien wurde ein arretierender Effekt auf das Wachstum von p53val<sup>135</sup> bei 32,5 °C gezeigt, der sich auch hier bei Überführung nach 38,5 °C reversibel zeigte. Eine Einschränkung der Vitalität zeigte sich nicht, so dass es sich hierbei um keinen letalen Effekt handelte. Es zeigte sich eine starke Expression von p21, worauf der Wachstumsstillstand zurückgeführt wurde. In den entsprechenden Zelllinien konnte bei 38,5 °C kein p21 detektiert werden, was auf die mangelnde Fähigkeit zur Transkription des mutanten p53val<sup>135</sup> zurückgeführt wurde. In der betreffenden Arbeit zeigten die transfizierten Zellen bei 32,5 °C eine erhöhte Chemoresistenz gegen viele Chemotherapeutika verglichen mit Kultivierung bei 38,5 °C und auch der untransfizierten Zelllinien. Diese wurde auf eine „Pseudoresistenz“ durch den Wachstumsstillstand zurückgeführt, wobei p21 als Transkriptionsprodukt von p53 der Haupteffektor zu sein schien (Trepel et al., 1998, S. 21–29). Der Effekt von p53val<sup>135</sup> auf das Wachstum von Glioblastom-Zellen wurde in gleicher Form auch an anderer Stelle festgestellt (Rieger et al., 1998, S. 2329–2330). In den beiden letzten erwähnten Studien wurden die Versuche jeweils an gepoolten transfizierten Zellen sowie an Zelllinien, die aus entsprechenden Einzelzellen hervorgegangen waren, gemacht. Für beide Fälle wurden gleiche Ergebnisse erzielt. Somit konnte ein Artefakt durch die Generierung aus einem Einzelzellklon ausgeschlossen werden (Trepel et al., 1998, S. 22; Rieger et al., 1998, S. 2327). In der Shep-1 Neuroblastomzelllinie konnte durch p53val<sup>135</sup> bedingte Überexpression von p53-Wildtypform bei 32,5 °C die Fähigkeit zur strahleninduzierten Apoptose wiederhergestellt werden, die in den Originalzellen trotz endogenem p53 in Wildtypform nicht nachgewiesen werden konnte. p53val<sup>135</sup> ohne Bestrahlung führte nicht zur Apoptose. Die Überexpression des transfizierten p53val<sup>135</sup> in Wildtypform bei 32,5 °C konnte die den Zellen immanenten Faktoren, die die strahleninduzierte Apoptose verhinderten, überwinden (Jasty et al., 1998, S. 158 – 161). In lymphatischen Leukämie-Zellen wurden die Zellen durch die permissive Temperatur empfindlicher gegen strahleninduzierte Apoptose. Transfizierte Zellen bei 37 °C zeigten hier ein geringeres Ausmaß der Apoptose nach Bestrahlung (Strasser-Wozak et al., 1998, S. 689).

In p53-defizienten K562 myeloischen Leukämie-Zellen führte p53val<sup>135</sup> in Wildtyp-Konfiguration bei 32,5 °C zu Wachstumsstillstand, Akkumulation von den p53-Zielgenprodukten p21 und Bax sowie verzögertem Zelltod. Die Zellen akkumulierten vor allem in der G0/G1-Phase des Zellzykluses, in geringerem Ausmaß auch in der G2/M-Phase. Im Vergleich zeigte die mutante Form (38,5 °C) hier eine stärkere Sensitivierung gegen Chemotherapeutika, wobei es aber nicht zu einer Induzierung von Bax oder p21 kam und auch keine Effekte auf den Zellzyklus ersichtlich waren. Auch hier wurde angenommen, dass die Chemoresistenz bei der permissiven Temperatur durch den Wachstumsstillstand bedingt war (Trepel et al., 1997, S. 1842-1846). In myeloischen Leukämiezellen der Linie M1, die ebenfalls mit p53val<sup>135</sup> transfiziert waren, ergab sich bei der nicht-permissiven Temperatur eine Beschleunigung der strahleninduzierten Apoptose und ein beschleunigtes Verlassen der G2-Phase. Die Strahlensensibilität war hier im Vergleich zur ursprünglichen M1-Zelllinie heraufgesetzt. Diese Funktion konnte als unabhängig von transkriptionaler Aktivierung von p53-Zielgenen eingeordnet werden. Man ging davon aus, dass die mutante Form von p53val<sup>135</sup> einen proapoptotischen Anteil enthält, welcher unabhängig von der Transkription zu agieren vermag. Zur Apoptoseinduktion kam es allerdings nur in Kombination mit ionisierender Strahlung (Guillouf et al., 1998, S. 112–113).

Als kleiner Ausblick soll auf eine andere temperatursensitive Mutante von p53 verwiesen werden: p53ala<sup>143</sup>. Für diese wurde bei der permissiven Temperatur von 32,5 °C ein Wachstumsstopp, bedingt durch p53-Überexpression in Wildtyp – Konfiguration festgestellt, was wiederum zur vermehrten Ansammlung des p53-Zielgenproduktes p21 führte. Die Zellen akkumulierten auch hier vor allem in der G1-Phase, aber auch in der G2/M-Phase, was auf die festgestellte Überexprimierung von p21 zurückgeführt wurde (Pollock et al., 1998, S. 1989–1990).

### **2.6.3. Untersuchungen an mit p53val<sup>135</sup> transfizierten LN229-Zellen**

Auch an der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinie LN229, die aus einem humanen Glioblastom gewonnen wurde, wurden bereits Versuche an mit p53val<sup>135</sup> transfizierten Zellen durchgeführt.

Trepel et al. zeigten für LN229-p53val<sup>135</sup>-Zellen bei 32,5 °C einen Wachstumsstillstand, während nicht-transfizierte Zellen nur eine Verlangsamung ihres Wachstums zeigten. Beide gewannen ihre volle Wachstumsfähigkeit bei Rückführung in eine 38,5 °C-Umgebung

zurück. Bei den nicht-transfizierten Zellen war die ursprüngliche Generationszeit sofort wieder hergestellt, bei Zellen mit p53val<sup>135</sup> dauerte das 3-4 Tage. Bei 38,5 °C war insgesamt das Wachstum durch p53val<sup>135</sup> leicht eingeschränkt. Die LN229-p53val<sup>135</sup>-Zellen zeigten bei 32,5 °C keinen Vitalitätsverlust, die Überexpression von p53 in Wildtyp-Konfiguration führte nicht zur Apoptose. In der genannten Arbeit wurde die Veränderung der durch p53 induzierten Zielgenprodukte durch den alleinigen Einfluss von p53val<sup>135</sup> untersucht. Weder in den nicht-transfizierten LN229- noch in LN229-p53val<sup>135</sup> fand sich bei 38,5 °C eine nachweisbare Expression von p21. Dieses Protein wurde in großer Menge in LN229-p53val<sup>135</sup>-Zellen bei 32,5 °C gefunden, was auf die Transkriptionsfähigkeit von p53val<sup>135</sup> in Wildtyp-Konfiguration zurückgeführt wurde. Es kam ebenso zu einer Induktion von Bax, welche in beiden anderen Fällen bei 38,5 °C nicht zu finden war. Die Bcl-2-Menge war immer konstitutionell bedingt gleich hoch. Auf diesen Umstand wurde die Tatsache zurückgeführt, dass p53val<sup>135</sup> bei 32,5 °C nicht zur Apoptose führte: das Verhältnis Bax/Bcl-2, welches für die Apoptoseinduktion verantwortlich gemacht wird, wurde durch mangelnde Abwärts-Regulierung von Bcl-2 nicht groß genug. In der Arbeit zeigten sich transfizierte Zellen bei 32,5 °C resistenter gegenüber Chemotherapeutika als bei 38,5 °C. Dies wird zum einen mit einer „Pseudoresistenz“ bei 32,5 °C erklärt, die durch p21-vermittelten Wachstumsstillstand bedingt wird. Zum anderen wird ein Funktionszugewinn der mutanten Form von p53val<sup>135</sup> von den Autoren angenommen. Durch deren hohe Expression soll es zur Sequestration von p53-bindenden Proteinen kommen, die eine Rolle bei der Chemosensibilisierung spielen. Es sei noch erwähnt, dass gleiche Ergebnisse für gepoolte transfizierte Zellen als auch für aus Einzelzellklonen hervorgegangene Zellen erzielt wurden, wodurch ein Klonierungsartefakt ausgeschlossen werden sollte (Trepel et al., 1998, S. 21-29; Weller, 1998, S. 441-442).

In einer Arbeit von Rieger et al. wurde der Einfluss von p53val<sup>135</sup> in beiden möglichen Konfigurationen auf die Synthese von NO (Stickstoffmonoxid) und dessen Zytotoxizität untersucht. Diesen Vorgängen wird eine Rolle bei der Immunabwehr zugeschrieben. Für p53val<sup>135</sup> wurde in beiden Konfigurationen ein inhibierender Effekt auf NO-Synthese und –Toxizität festgestellt. Dieser Effekt bei 32,5 °C wurde nicht auf den auch hier festgestellten Wachstumsstillstand der LN229-p53val<sup>135</sup>, den man hier vor allem in der G2/M-Phase sah, zurückgeführt, da er auch in Rattenglioblastom-Zellen der Linie C6 zu erkennen war, bei denen p53val<sup>135</sup> bei 32,5 °C nicht zu einem Stillstand des Wachstums führte. Stattdessen wurde für die mutante Form ein Funktionszugewinn durch Akkumulation angenommen. Der supprimierende Einfluss von p53 auf die NO-Synthese soll demnach unabhängig von dessen

Transkriptionsfunktion sein und über Domänen des Proteins erfolgen, die nicht in dessen DNA-Bindungsregion liegen. Auch in dieser Studie wurden gleiche Ergebnisse bei Untersuchung von transfizierten Einzelzellklonen und eines transfizierten Zell-Pools erzielt (Rieger et al., 1998, S. 2327-2330).

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Reagenzien und ihre Bezugsquellen

- Acrylamid-Lösung (rotiphorese®Gel 30), Art. Nr. 3029.1, Fa. Roth, Karlsruhe, D
- Albumin, Art. Nr. A-9647, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Ammoniumpersulfat (APS), Art. Nr. 17-1311-01, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Anti-Bax monoklonaler Antikörper, Art. Nr. AM32, Fa. Oncogene, Bad Soden, D
- Anti-Bcl-2 monoklonaler Antikörper, Art. Nr. OP60, Fa. Oncogene, Bad Soden, D
- Anti-Aktin monoklonaler Antikörper, Art. Nr. SP01, Fa. Oncogene, Bad Soden, D
- Anti-Maus-HRP Sekundärantikörper, Art. Nr. sc-2016, Fa. SantaCruz, Heidelberg, D
- Anti-p21 monoklonaler Antikörper, Art. Nr. 556430, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg, D
- Anti-p53 monoklonaler Antikörper, Art. Nr. OP43, Fa. Oncogene, Bad Soden, D
- Aprotinin, Art. Nr. A-6279, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- BCA-Assay: protein quantation kit, Art. Nr. UP 40840A, Fa. Uptima (Interchim), Montlucon Cedex, F
- Bench Mark™ Protein Ladder (Molekulargewichtsmarker), Art. Nr. 10747-012, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
- BrdU (5'-Brom-2'-desoxyuridin), Art. Nr. 15240.02, Fa. Serva, Heidelberg, D
- Bromphenolblau, Art. Nr. 15375, Fa. Serva, Heidelberg, D
- Caspase Detection Kit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) -VAD-FMK, Art. NR. QIA90, Fa. Oncogene, Bad Soden, D
- Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup>, Art. Nr. 1774425, Fa. Roche, Mannheim, D
- Cellwash, Art. Nr. 349524, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Complete™ Proteasen-Inhibitor-Cocktail-Tabletten, Art. Nr. 1.697.498, Fa. Roche, Mannheim, D
- D-MEM-Medium, Art. Nr. E 15-843, Fa. PAA Laboratories, Linz, A
- ECL™ Western Blot Detektionsreagenzien , Art. Nr. RPN 2106, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Ethanol (pro analysi , Art. Nr. 1.00974.2511, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Filmentwickler (GBX Entwickler), Art. Nr. P-7042, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Filmfixierer (GBX Fixierer), Art. Nr. P-7167, Fa. Sigma, Deisenhofen, D

- Fötales Kälberserum, Art. Nr. A 15-649, Fa. PAA Laboratories, Linz, A
- Glycin, Art. Nr. 1.04169, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Kaninchen-Anti-Maus Sekundärantikörper (FITC-konjugiert), Art. Nr. F 0313, Fa. Dako, Hamburg, D
- Kristallviolett, Art. Nr. 1.15940.0025, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Live / Dead<sup>®</sup> Viability / Cytotoxicity Kit, Art. Nr. L-3224, Molecular Probes, Leiden, NL
- Magermilchpulver, Art. Nr. 1.15363, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Maus-Anti-BrdU Antikörper, Art. Nr. 347580, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Methanol (pro analysi), Art. Nr. 1.06009.2511, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Natriumdesoxycholat, Art. Nr. 18330, Fa. Serva, Heidelberg, D
- Natrium-Fluorid, Art. Nr. S-6521, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Natriumhydroxid-Plätzchen (reinst), Art. Nr. 1.06482.5000, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Natrium-Orthovanadat, Art. Nr. S-6508, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Nonidet P-40, Art. Nr. 1754599, Fa. Roche, Mannheim, D
- PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), Art. Nr. 1000-3, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Pepsin (70 FIB-U / g), Art. Nr. 7180, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Ponceau S-Lösung, Art. Nr. 33427, Fa. Serva, Heidelberg, D
- Poly-L-Lysin, Art. Nr. 33225, Fa. Serva, Heidelberg, D
- Propidiumjodid (PJ), Art. Nr. P-4170, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Proteinauftragpuffer (4x, reduzierend), Art. Nr. K 929.1, Fa. Roth, Karlsruhe, D
- RNase, Art. Nr. 109134, Fa. Boehringer, Mannheim, D
- Salzsäure (rauchend), Art. Nr. 1.13386.2500, Fa. Merck, Darmstadt, D
- SDS (sodium dodecyl sulphate), Art. Nr. US 75819, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Temed, Art. Nr. 17-1312-01, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- TRIZMA Base, Art. Nr. T-1503, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Trypsin-EDTA (1x), Art. Nr. 25300-054, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
- Tween 20, Art. Nr. 8.22184.0500, Fa. Merck, Darmstadt, D

### 3.2. Geräte und Labormaterialien

- Abstandhalter 1,5 mm, Art. Nr. 80-6138-33, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB

- Coulter Counter, Fa. Coulter Electronics, Krefeld, D
- Coulter Messröhrchen, Fa. Coulter Electronics, Krefeld, D
- CoulterSampling Stand II A, Fa. Coulter Electronics, Krefeld, D
- Zytozentrifuge Cytospin 3, Fa. Shandon, Pittsburgh, USA
- Dosimeter PTW-SN4, Fa. PTW, Freiburg, D
- Durchflusszytometer FacScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Elektrophoresekammer Hoefer Mighty Small II SE250 /SE 260, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Eppendorfgefäße 1,5 ml, Art. Nr. 0030 120.167, Fa. Eppendorf, Hamburg, D
- Falcon<sup>®</sup> Blue Max junior 15 ml konisches Röhrchen, Art. Nr. 352096, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Blue Max junior 50 ml konisches Röhrchen, Art. Nr. 352070, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Einweg-Zellschaber, Art. Nr. 353086, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Microtest<sup>™</sup> 96 Zellkulturplatte, Art. Nr. 352052, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> 5 ml Rundbodenröhrchen (FacScan-Röhrchen), Art. Nr. 352052, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Zellkulturflasche 25 cm<sup>2</sup>, Art. Nr. 353108, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup>, Art. Nr. 353110, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Zellkulturflasche 175 cm<sup>2</sup>, Art. Nr. 353112, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Falcon<sup>®</sup> Zellkulturschalen 60 x 15mm, Art. Nr. 353004, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Hyperfilm<sup>™</sup> ECL<sup>™</sup>, Art. Nr. RPN 3103 K, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Gelgießkammer Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Glasplatten 10 x 10,5 mm, Art. Nr. 80-6150-87, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Kämmen 1,5 mm, Art. Nr. 80-6139-09, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Kapillar-Pipettenspitzen, Art. Nr. 729011, Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, D
- Lichtmikroskop CK2-TR, Fa. Olympus, J
- Metallplatten 10 x 10,5 mm, Art. Nr. 80-6150-68, Fa. Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, GB

- Multiphor II Nova Blot Unit, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- pH-Meter, Fa. WTW, Weilheim, D
- Protran<sup>®</sup> Nitrozellulose Transfermembran, Art. Nr. 10 401396, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel, D
- Röntgenröhre Isovolt 320 / 10, Fa. Seifert, Ahrensburg, D
- Schlauchfolie, Art. Nr. 129 G2132, Fa. Merck, Darmstadt, D
- SpectraMax 190 Microplate Spectrometer, Fa. Molecular Devices, Ismaning, D
- Stereomikroskop Stemi SV8, Zeiss, Jena, D
- Stromquelle Power Supply 2301 Macrodrive1, Fa. LKB, Bromma, Sw
- Whatman Chromatographie-Papier, Art. Nr. 3030704, Fa. Whatman, Maidstone, GB

### 3.3. Verwendete Lösungen

#### Allgemein verwendet

##### **PBS**

1 Beutel gelöst in 1 l Aqua dest.

##### **Kulturmedium**

500 ml D-MEM-Fertigmedium mit 50 ml hitzeinaktivierten fötalem Kälberserum

#### Klonogenitäts-Assay

##### **Kristallviolettlösung**

2,5 g Kristallviolett in 1 l Aqua dest. (destilliertes Wasser)

#### Vitalitätsbestimmung

##### **Färbelösung**

Lösung mit 8  $\mu\text{M}$  Ethidium Homodimer-1 und 0,25  $\mu\text{M}$  CalceinAM; 5  $\mu\text{l}$  der im Kit enthaltenen Ethidium Homodimer-1-Stammlösung in 1,25 ml PBS, 1:1 verdünnt mit einer Lösung von 1  $\mu\text{l}$  der CalceinAm-Stammlösung in 8 ml PBS

### **Apoptose-Frequenz-Bestimmung**

#### ***Immunreagenz***

*Reagenzien im Kit enthalten*

3600 µl Inkubationspuffer

200 µl Anti-Histon-Antikörper

200 µl Anti-DNA-Antikörper

#### ***Substratlösung***

*Im Kit enthalten*

1 ABTS-Substrat-Tablette in 5 ml Substratpuffer gelöst

### **Western Blot**

#### ***SDS-Lösung***

10 g SDS in 100 ml Aqua dest.

#### ***Tris-Puffer***

12,114 g TRIZMA Base in 100 ml Aqua dest., eingestellt auf pH 8,8 oder pH 6,8

#### ***Zellysepuffer = RIPA***

1 ml Nonidet P-40

0,5 g Natriumdesoxycholat

1 ml SDS- Lösung

mit PBS auf 100 ml auffüllen

*Vor Gebrauch unmittelbar hinzugefügt:*

30 µl / ml Aprotinin

40 µl / ml Boehringer Inhibition Cocktail (1 Tablette gelöst in 2 ml Aqua dest.)

10 µl / ml einer 100 mM Natrium-Orthovanadat-Lösung (0,18939 g in 10 ml Aqua dest.)

5 µl / ml einer 0,2 M Natrium-Fluorid-Lösung (0,084 g / 10 ml Aqua dest.)

#### ***APS-Lösung***

0,1 g Ammoniumpersulfat / ml Aqua dest.

***Laufpuffer***

15,2 g TRIZMA Base  
 72,1 g Glycin  
 5 g SDS in 5 l Aqua dest. gelöst

***Blot-Puffer***

11,62 g TRIZMA Base  
 5,86 g Glycin  
 0,75 g SDS  
 400 ml Methanol auf 2 l mit Aqua dest. aufgefüllt

***Trenngel-Lösung, 12,5 % Polyacrylamid***

4,16 ml Acrylamid-Lösung  
 3,21 ml Tris-Puffer pH 8,8  
 2,36 ml Aqua dest.  
 90 µl SDS-Lösung  
 143 µl APS-Lösung  
 5 µl Temed

***Sammelgel-Lösung, 3,45 % Polyacrylamid***

343 µl Acrylamid-Lösung  
 357 µl Tris-Puffer pH 6,8  
 2115 µl Aqua dest.  
 28,5 µl SDS-Lösung  
 57 µl APS-Lösung  
 2,6 µl Temed

***Blockpuffer***

5 g Magermilchpulver gelöst in 1 l PBS

***PBS-T***

0,5 ml Tween 20 in 1 l PBS

***Detektionslösung***

Die beiden Komponenten der ECL Western Blot Detektionreagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt

***Entwickler***

250 ml GBX Entwickler mit 750 ml Aqua dest., bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln gelagert

***Fixierer***

250 ml GBX Fixierer mit 750 ml Aqua dest., bei RT im Dunkeln gelagert

**Zellzykluskinetik*****BrdU-Lösung***

1 mg BrdU in 1 ml PBS, steril filtriert

***PBS-A***

10 g Albumin gelöst in 1 l PBS

***RNase-Lösung***

RNase-Stammlösung aus 1 mg RNase in 1 ml PBS (20 min bei 90°C im Wasserbad behandelt), nochmals im Verhältnis 1:10 verdünnt mit PBS

***Salzsäure***

2 N Salzsäure: 84,6 ml konzentrierte Salzsäure gemischt mit 915,4 ml Aqua dest.

1 N Salzsäure: 1:1 mit Aqua dest. verdünnte 2 N Salzsäure

***Pepsinlösung***

0,5 g Pepsin in 5,5 ml 1 N Salzsäure mit 94,5 ml Aqua dest. aufgefüllt

***PJ-Lösung***

Propidiumjodid-Stammlösung aus 50 µg / ml Propidiumjodid in PBS;

vor Gebrauch nochmals 1:2 mit PBS verdünnt und Zugabe von 0,02 % RNase-Stammlösung (1 mg / ml PBS)

**3.4. Zellen und Zellkulturbedingungen**

Für die Versuche wurden humane Glioblastomzellen der Linie LN229 verwendet. Verglichen wurden die ursprünglichen Zellen und solche, die mit einem Vektor, der das temperatursensitive p53val<sup>135</sup> enthielt, transfiziert worden waren (LN229-p53). Diese exprimierten bei 37°C eine mutante Form des p53-Proteins (LN229-p53(mt)). Bei 32,5 °C kam es zu einer Überexpression des funktionellen Proteins in Wildtypkonfiguration (LN229-

p53 (wt)). Es ist zu beachten, dass auch nicht-transfizierte LN229-Zellen über p53 in Wildtypform verfügen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in Kulturmedium kultiviert. Antibiotika wurden nicht zugesetzt. Ein Passagieren erfolgte je nach Dichte des Zellrasens etwa zweimal pro Woche. Der Zellrasen wurde nach Absaugen des Überstandes einmal mit Trypsin gespült, welches wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurde mit Trypsin überschichtet und so lange bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vom Untergrund lösten. Das Trypsin wurde mit einer äquivalenten Menge Kulturmedium inaktiviert und die Zellen etwa im Verhältnis 1:10 im Bezug auf die ursprüngliche Zellzahl in Subkulturen überführt. Es wurde höchstens bis zur 50. Passage umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen von 37 °C oder 32,5 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxid-Gehalt. Für die Experimente erfolgte der Ansatz jeweils 24 h vor der Bestrahlung. Ab diesem Zeitpunkt wurden LN229-p53-Zellen bei 32,5 °C kultiviert, falls eine Überexprimierung eines funktionellen p53 - also als wt (Wildtyp) - erwünscht war.

### 3.5. Experimenteller Zellkulturansatz

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden nach Abtrypsinieren 0,5 ml der Zellsuspension mit 15 ml der Trägerflüssigkeit Cellwash vermischt und anschließend am Coulter Counter dreimalig gemessen. Aus den drei Messwerten wurde der MV (Mittelwert) gebildet und mit der Formel

$$\text{MV} \times 2 \times 31 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

die in einem Milliliter der ursprünglichen Lösung enthaltene Zellzahl bestimmt. Um im Versuchsansatz die gewünschte Zellmenge einzusetzen, wurde entsprechend mit Kulturmedium verdünnt.

### 3.6. Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit der Röntgenröhre bei RT. Die absorbierte Strahlendosis wurde mit einem Dosimeter gemessen. Die Dosisrate betrug 1 Gy pro Minute bei 13 mA. Die Betriebsspannung lag bei 240 kV.

## 3.7. Klonogenitätsassay

### 3.7.1. Dosis - Effekt – Kurven

#### 3.7.1.1. Prinzip

Eine Dosis-Effekt-Kurve beschreibt den Zusammenhang von applizierter Strahlendosis und überlebenden Zellen. Mit überlebenden Zellen sind hier diejenigen gemeint, die noch proliferieren und somit Klone ausbilden können. Diese Fähigkeit wird als Klonogenität bezeichnet. Die Dosis-Effektkurven verlaufen als Schulterkurven. Eine solche Schulterkurve verläuft im Bereich niedriger Dosen flacher, was man damit erklärt, dass in diesem Dosisbereich die Reparaturvorgänge der Zellen greifen. Die entstandenen Schäden können ausgebessert werden. Die Zelle kann sich danach weiterhin teilen und Klone bilden. Mit steigender Dosis und somit steigendem Schädigungsgrad wird die Fähigkeit, die größer werdenden Schäden noch auszubessern, immer geringer. Schließlich greifen die Reparaturmechanismen nicht mehr und die Kurve fällt geradlinig ab. In diesem Teil der Kurve wird die intrinsische Strahlenresistenz der Zellen deutlich. Misst man nun die Breite der Schulter, erhält man ein Maß für die Reparaturfähigkeit der Zellen. Diesen Wert bezeichnet man als  $D_q$ . Genauso ist die Steilheit des Abfalls im geradlinigen Kurventeil ein Maß für die Strahlenresistenz und wird  $D_0$  genannt. Diese beiden Parameter sind immer spezifisch für eine bestimmte Zelllinie, und erlauben somit einen Vergleich untereinander. Als zusätzlichen Wert kann man die  $SF_2$  heranziehen, welche die Klonogenität nach 2 Gy Bestrahlung angibt und somit die spezifische Empfindlichkeit bei dieser Strahlendosis beschreibt.

#### 3.7.1.2. Versuchsdurchführung

Der Ansatz erfolgte 24 h Stunden vor der Bestrahlung in Zellkulturschalen, wobei für die verschiedenen Strahlendosen unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt wurden. Das Schema hierzu, das für alle Zelllinien verwendet wurde, ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Dosis (Gy)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10
ausgesäte Zellzahl	125	125	250	500	1.000	1.500	5.000	7.500	15.000	15.000

**Tab. 3.1:** Übersicht über die für die verschiedenen Dosen eingesetzten Zellzahlen

Die Zellen wurden jeweils abtrypsiniert und das Trypsin mit Kulturmedium inaktiviert. Durch Verdünnung wurden Lösungen der gewünschten Zellzahl pro ml hergestellt. Von diesen Lösungen wurde jeweils 1 ml in Zellkulturschalen pipettiert und mit 4 ml Kulturmedium vermischt, so dass das Endvolumen immer 5 ml betrug. Für jede Dosis wurden jeweils drei Kulturschalen pro Zelllinie angesetzt, aus denen für den Einzelversuch ein Mittelwert errechnet wurde.

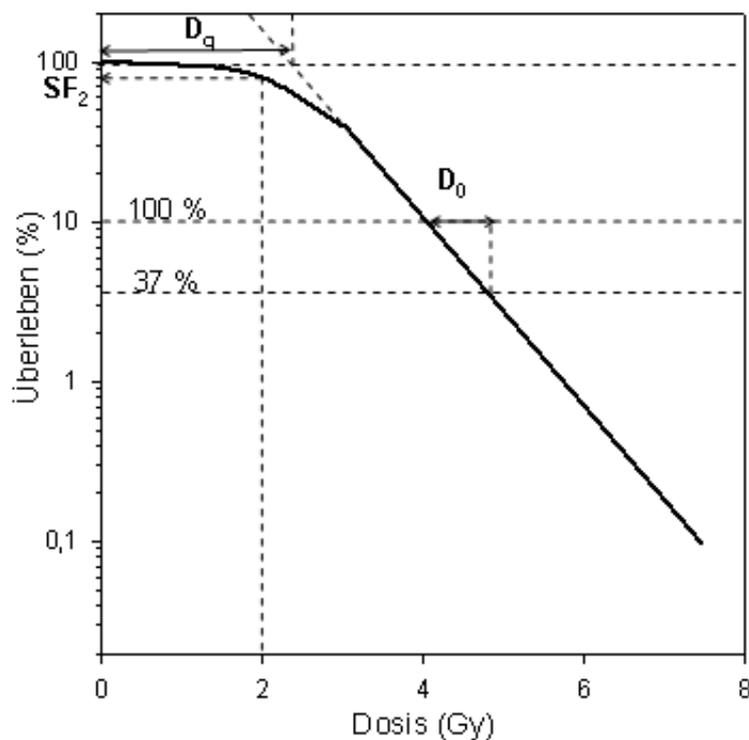
Am Tag darauf, der als Tag 1 festgelegt wurde, erfolgte die Bestrahlung. Um für alle Kulturen gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden sie während der Bestrahlungszeit unter der Sterilbank gelagert. Die Kultivierung erfolgte über 12 Tage (versuchsweise über 5 Wochen für LN229-p53-Zellen bei 32,5 °C). Am 12. Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturschalen mit Aqua dest. gespült und für mindestens 30 min an der Luft getrocknet. Die Klone wurden anschließend mit Kristallviolettlösung gefärbt, die wieder abgesaugt wurde. Es wurde erneut mit Aqua dest. gespült. Nachdem dieses abgetrocknet war, wurde mit der Auszählung der Klone unter dem Stereomikroskop begonnen. Als Klon wurden alle Zellhaufen mit mehr als 50 Zellen gewertet.

### 3.7.1.3. Auswertung

Zunächst erfolgte die Bestimmung der sogenannten Platierungs-Effizienz (PE). Sie beschreibt die Fähigkeit zur Klonbildung ohne Bestrahlung. Sie ergab sich aus dem Quotienten der gezählten Kolonien und der ausgesäten Zellzahl bei 0 Gy und wurde als Prozentzahl angegeben. Da für die Erstellung der Überlebenskurven der Wert bei 0 Gy Bestrahlung auf 100 % überlebende Zellen festgelegt wurde, erfolgte die Berechnung der Werte für alle anderen Dosen im Verhältnis zu diesem Wert. Die entsprechende Formel lautete dann

$$\text{Überleben} = \text{gezählte Kolonien} \times 100 / (\text{ausgesäte Zellzahl} \times \text{PE})$$

Dieser Wert wurde in Prozent umgerechnet. Indem man nun die Dosis auf der Abszisse und diese Prozentzahlen aus 3 Versuchen logarithmisch auf der Ordinate auftrug, entstand eine Dosis-Effekt-Kurve in Form einer Schulterkurve. Im Schulterbereich wurde eine Regression 2. Ordnung durch die Werte gelegt, im geradlinigen Kurventeil eine Regression 1. Ordnung. Die unter 3.7.1.1 genannten Parameter wurden nun graphisch aus der erhaltenen Kurve ermittelt (Abb. 3.1).  $D_q$ , also das Maß für Schulterbreite und somit Reparaturvermögen, ergab sich aus dem Schnittpunkt des extrapolierten geraden Kurvenanteils mit der nach 100 % parallel verschobenen x-Achse.  $D_0$  als Parameter für die intrinsische Strahlenempfindlichkeit ergab sich aus der Steigung der Dosis-Effekt-Kurve im geradlinig verlaufenden Teil.  $D_0$  ist die Dosis, die hier die Überlebensfraktion auf jeweils noch 37 % des Ausgangswertes senkt. Diese Werte sollten für LN229-Zellen bei 37 °C und LN229-p53-Zellen bei 37 °C und 32,5 °C verglichen werden. Diese Parameter wurden aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ermittelt und der MV mit Standardfehler (SEM) berechnet.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung einer Dosis-Effekt-Kurve und der aus ihr ermittelbaren Parameter.  $D_q$  steht als Maß der Schulterbreite für die Reparaturfähigkeit der betrachteten Zelllinie.  $D_0$  ist ein Maß für die Steigung im linearen Kurvenbereich und steht für die intrinsische Strahlenempfindlichkeit.  $SF_2$  gibt die überlebende Zellfraktion nach 2 Gy Bestrahlung an.

### **3.7.2. Klonogenität bei 32.5 °C**

Für LN229- und LN229-p53-Zellen wurde zusätzlich die Klonogenität bei 32,5 °C bestimmt, da LN229-p53-Zellen bei der niedrigeren Temperatur eine Wachstumshemmung gezeigt hatten und ein alleiniger Einfluss der Temperatur ausgeschlossen werden sollte. Es wurden für jede der beiden Zelllinien jeweils drei Kulturschalen mit 500 Zellen bestückt und über einen Zeitraum von 5 Wochen bei 32,5 °C kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Klone analog zum oben geschilderten Verfahren angefärbt und gezählt und die Klonogenität bestimmt.

Diese ergab sich wie folgt:

$$\text{Klonogenität (\%)} = (\text{gezählte Klone} / \text{eingesetzte Zellzahl}) \times 100$$

Es wurde der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gebildet und mit den Werten bei 37 °C aus den Versuchen zu den Dosis-Effekt-Kurven verglichen.

## **3.8. Bestimmung von Verdoppelungszeit und Vitalität**

Die Bestimmung von Zellwachstum und Vitalität erfolgte jeweils aus einem gemeinsamen Versuchsansatz, der sich über einen Zeitraum von 14 Tagen erstreckte.

### **3.8.1. Zellwachstum**

Am Tag 0 erfolgte der Ansatz in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen für LN229- und LN229-p53-Zellen bei 37 °C. Hier wurde für beide Zelllinien eine Gesamtzellzahl von 1,25 Millionen Zellen eingesetzt. Analog wurden für beide Fälle bei 32,5 °C 2,5 Millionen Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen angesetzt. Für jeden Tag des betrachteten Zeitraums wurde eine Kulturflasche angesetzt, aus der am entsprechenden Tag das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Trypsin abgelöst wurden. Das Trypsin wurde mit 3 ml Kulturmedium inaktiviert. Durch anschließende Zellzählung und Ermittlung der Gesamtzellzahl in der Probe wurde der Wachstumsverlauf verfolgt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gemittelt und mit dem jeweiligen Standardfehler graphisch durch Auftragung der Zeit auf der x-Achse gegen die logarithmische Funktion der

Gesamtzellzahl auf der y-Achse dargestellt. Die Verdoppelungszeit wurde graphisch für die Einzelversuche bestimmt, indem die Regressionsgerade durch die Tage 1-3 gelegt wurde. Die Verdoppelungszeit ergab sich durch Übertragung des entsprechenden Intervalls von der Ordinate auf die Abszisse.

### **3.8.2. Vitalitätsbestimmung**

#### 3.8.2.1. Prinzip

Es kam ein Kit zur Anwendung, dessen Prinzip auf einer Doppelfluoreszenzmarkierung beruht. Mit CalceinAM, das die intakte Zellmembran vitaler Zellen durchdringt und durch die dort allgemein vorhandene Esteraseaktivität in das intensiv grün fluoreszierende Calcein (Emission 515 nm) umgewandelt wird, werden ausschließlich die lebenden Zellen markiert. Damit eine exakte Abgrenzung von den avitalen Zellen möglich ist, werden auch diese spezifisch markiert mit Ethidium Homodimer-1. Aus vitalen Zellen wird es durch bestimmte Exozytoseprozesse unmittelbar wieder ausgeschleust. In avitalen Zellen erfährt es durch Interkalierung in die Doppelhelix der DNA eine 40-fache Verstärkung seiner Fluoreszenz, die hierdurch intensiv rot (Emission 635 nm) wird. Auf diese Weise werden selektiv die nicht mehr intakten Zellen gekennzeichnet. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer, dessen Arbeitsweise unter 3.12.1 erläutert wird.

#### 3.8.2.2. Optimierung der Farbstoffkonzentrationen

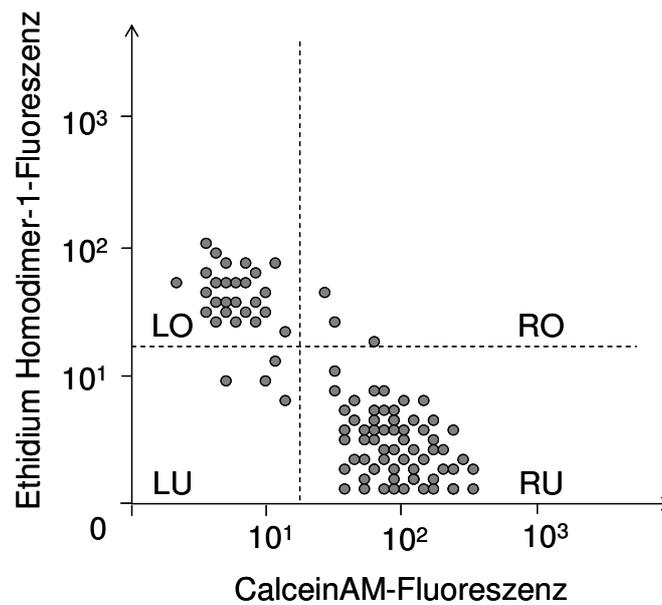
Wie in der mitgelieferten Beschreibung empfohlen, wurden zunächst die optimalen Farbstoffkonzentrationen für die untersuchte Zelllinie bestimmt. Untersucht wurden Proben von LN229-Zellen bei 37 °C und LN229-p53-Zellen bei 37 °C und 32,5 °C. Die Kulturen wurden mit Trypsin abgelöst und gezählt. Es wurden immer 1 Million Zellen markiert. Damit spezifisch auch tote Zellen untersucht werden konnten, wurden die entsprechenden Aliquote abzentrifugiert (5 min, 1.000 Umdrehungen / min, 4 °C, Werte gelten für alle Zentrifugationsschritte des Versuches), der Überstand abgenommen und das Pellet in 1,5 ml in 70 % Methanol resuspendiert. So wurden innerhalb von 30 min die Zellen abgetötet.

Mit den aus der Kühlung bei –20°C entnommenen und auf RT aufgewärmten Reagenzien des Kits wurden nun Fluoreszenzfarbstofflösungen verschiedener Konzentrationen in PBS hergestellt.

Mit Hilfe der abgetöteten Zellen wurde die niedrigste Ethidium Homodimer-1 Konzentration ermittelt, die diese Zellen noch gut anfärbt. Verwendet wurden Lösungen der Konzentrationen 2, 4, 8 und 10  $\mu\text{M}$ . Die toten Zellen wurden auch mit CalceinAM gefärbt, um die Konzentration zu ermitteln, die diese Zellen nicht markiert. Für CalceinAM wurden die Konzentrationen 0,25, 0,5, 1 und 2  $\mu\text{M}$  betrachtet. Mit diesen wurden Proben lebender Zellen gefärbt, um die Konzentration zu bestimmen, mit der die lebenden Zellen klar zu detektieren waren. Die Proben wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in jeweils 200  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Färbelösung resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Am Durchflusszytometer erfolgte anschließend eine Messung der Fluoreszenz des Calceins gegen die des Ethidium Homodimer-1. Als optimale Konzentrationen ergaben sich 8  $\mu\text{M}$  für Ethidium Homodimer-1 und 0,25  $\mu\text{M}$  für CalceinAM. Diese Färbelösung wurde für jeden Versuchstag neu hergestellt.

#### 3.8.2.3. Durchführung

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen erfolgte täglich gleichzeitig mit der Bestimmung der Gesamtzellzahl. Die Proben aus der Gesamtzellbestimmung wurden wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert. Die Vorgang wurde wiederholt und dann ein Volumen entsprechend 1 Million Zellen in ein FacScan-Röhrchen überführt. Diese Proben wurden erneut abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 200  $\mu\text{l}$  der zuvor hergestellten Färbelösung resuspendiert. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und danach am Durchflusszytometer mit der Einstellung Fluoreszenzkanal Fl-1 gegen Fl-2 gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der erhaltenen Punktverteilungs-Graphik, die in vier Quadranten unterteilt wurde, deren Grenzen anhand der sichtbaren Orientierung der Zellen zur x- beziehungsweise y-Achse vorgenommen wurde, wie es auch vom Hersteller vorgeschlagen ist (Abb. 3.2). Der prozentuale Anteil lebender Zellen ergab sich durch den prozentualen Anteil von Zellen im unteren rechten Quadranten.



**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung der Verteilung der lebenden und toten Zellen der Population (die Punkte stehen für die Einzelwerte). Auf der x-Achse ist die CalceinAM-Fluoreszenz, als Maß der lebenden Zellen aufgetragen. Die y-Achse spiegelt die Ethidium Homodimer-1-Fluoreszenz der toten Zellen wieder. Auf diese Weise findet sich der Anteil lebender Zellen im rechten unteren Quadranten (RU) wieder. (Quadranten sind folgendermaßen beschriftet: RO = rechts oben, LO = links oben, LU = links unten).

### 3.9. Bestimmung der Apoptosefrequenz

#### 3.9.1. Prinzip

Das Ausmaß der Apoptose in den untersuchten Zelllinien wurde mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup> Kit bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay. Nachgewiesen werden Histon-komplexierte DNA-Fragmente, wie sie bei der Apoptose entstehen.

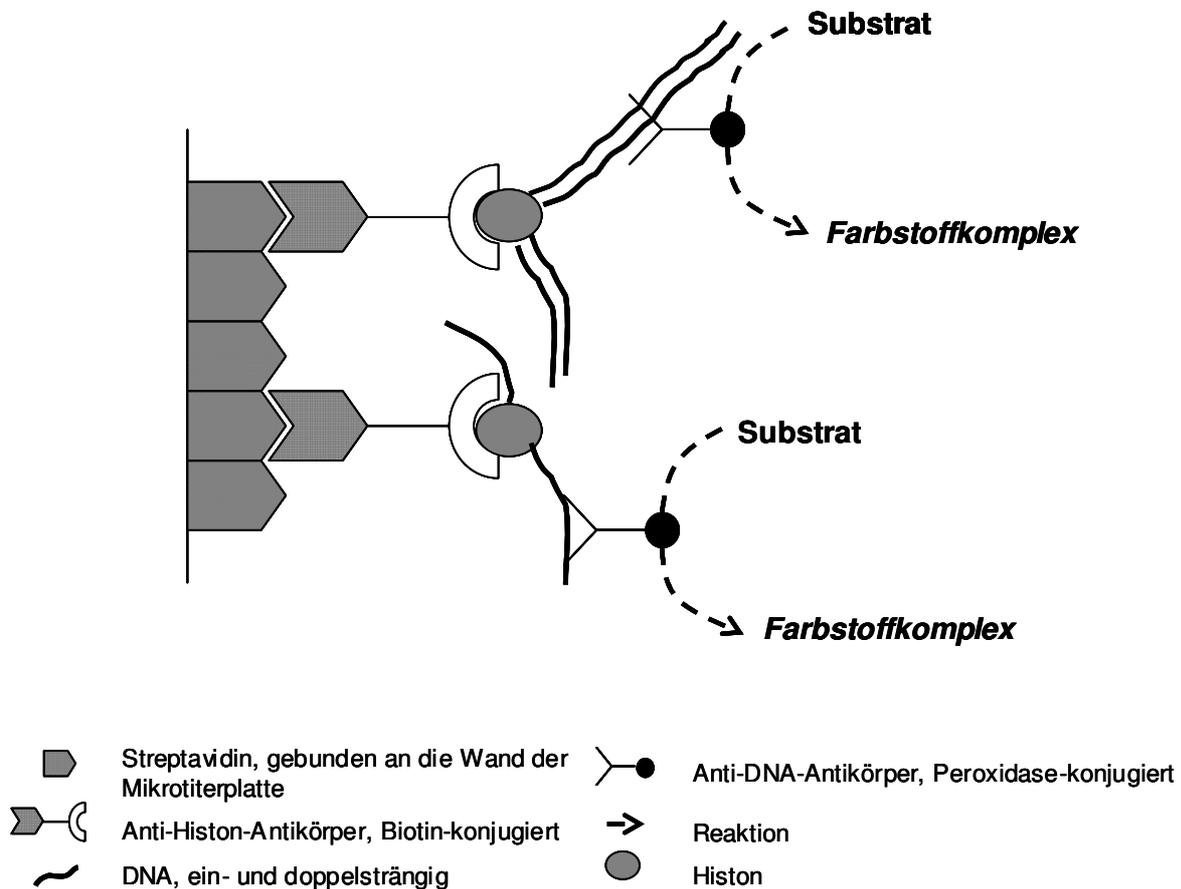
### 3.9.2. Durchführung

Es wurden nur die adhärennten Zellen untersucht. Das Kulturmedium wurde abgenommen und verworfen. Verwendet wurden monoklonale Maus-Antikörper gegen Histone und DNA. Im Kit enthalten waren fertiger Lyse- sowie Inkubationspuffer. Die Antikörper sowie die Positivkontrolle wurden in lyophilisierter Form geliefert und mussten in 450 µl Aqua dest. gelöst werden. Die ABTS-Substrat-Tabletten wurden in je 5 ml gebrauchsfertigem Substratpuffer aufgelöst, um die Substratlösung zu erhalten. Außerdem wurde die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte inklusive der selbsthaftenden Abdeckfolie mitgeliefert.

Der Versuchsansatz erfolgte 24 h vor Bestrahlung auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und flachen Böden. Pro Vertiefung wurden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 100 µl einer Zelllösung mit 100.000 Zellen / ml aufgetragen. Die Ansätze und Bestrahlungen der Proben erfolgten so, dass die Durchführung des Versuches gleichzeitig für alle Proben möglich war. Dazu wurde der Überstand über dem Zellrasen abgenommen und verworfen. In die einzelnen Vertiefungen wurden nun 200 µl des Lyse-Puffers gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten für 10 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl in die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, das Pellet nicht aufzuschütteln, da es unfragmentierte DNA von hohem Molekulargewicht enthielt, die die Messung verfälscht hätte. Aufgetragen wurde außerdem in jeweils doppelter Ausführung 20 µl Positivkontrolle und Lyse-Puffer als Hintergrundkontrolle. Es wurde darauf geachtet, diese sehr kleinen Volumina in die Mitte der Vertiefungen zu pipettieren, um Verluste zu vermeiden und somit gleiche Bedingungen für alle Proben zu gewährleisten. Nun wurde zu allen Proben mit der Mehrkanalpipette 80 µl des Immunoreagenz zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit Hilfe der im Kit enthaltenen selbsthaftenden Abdeckfolie verschlossen und 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit wurden zum einen die DNA-Fragmente, die nachgewiesen werden sollten, über die darin enthaltenen Histone an die Streptavidin-beschichteten Wände der Mikrotiterplatte gebunden. Dazu diente der gegen die Histone gerichtete biotinylierte Antikörper, der über das Biotin an Streptavidin gebunden wurde. Ein- und doppelsträngige DNA wurde mit dem entsprechenden Antikörper markiert, an den außerdem das Enzym Peroxidase gebunden war.

Nach 2 h wurde die Lösung aus den Vertiefungen entfernt und dreimal mit 300 µl Inkubationspuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es erfolgte eine Zugabe von 100 µl der Substratlösung. Dieses Substrat wurde durch die Aktivität der

Peroxidase an den Antikörpern in einen Farbstoff umgewandelt (zur Veranschaulichung siehe Abb. 3.3). Nach 15 min konnte eine photometrische Messung am Spektrometer erfolgen. Gemessen wurde mit einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Wellenlänge von 490 nm, die in etwa dem Wert der Substratlösung als Leerwert entsprach.



**Abb. 3.3:** Veranschaulichende Darstellung des Prinzips zur Messung der Apoptose. Mittels an einen entsprechenden Antikörper gebundenen Biotins wurden die Histon-DNA-Komplexe an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplattenwand gebunden. Die DNA wurde mit entsprechenden Antikörpern markiert. An diese war Peroxidase gebunden, welche das farblose Substrat in den farbigen Komplex umwandelte. Die Menge des Komplexes konnte mit einem Spektrometer bestimmt werden.

### 3.9.3. Auswertung

Für die Auswertung wurde das Ergebnis in rE (relative Einheiten) umgerechnet.

Dazu wurde zunächst der Wert der Proben in mU berechnet, der sich aus

$$\text{Probe (mU)} = \text{Probenwert} - \text{Wert der Hintergrundkontrolle} \times 1000$$

berechnet. Die Apoptosefrequenz in relativen Einheiten ergibt sich dann als:

$$\text{Freigesetzte DNA-Fragmente (rel. Einheiten)} = \text{Probe(mU)} / \text{Wert der Kontrolle (mU)}.$$

Als Kontrolle wurde ein unbestrahlter 0 h-Wert von LN229-Zellen für sämtliche Proben herangezogen. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt als deren Mittelwert mit Standardfehler. Verglichen wurde die jeweilige Apoptosefrequenz p.r. (post radiationem) mit der unbestrahlten Kontrolle.

## **3.10. Western Blot**

### **3.10.1. Prinzip**

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen und anschließendem spezifischem Nachweis von einzelnen Proteinfractionen, die von Interesse sind. Man macht sich hierbei das unterschiedliche Gewicht der verschiedenen Proteine und die Spezifität von Antikörpern zunutze, die das entsprechende Protein erkennen.

### **3.10.2. Gewinnung der Zelllysate**

Der Ansatz für die Versuche erfolgte jeweils 24 h vor Bestrahlung. Die eingesetzte Zellzahl wurde so gewählt, dass zum Zeitpunkt der Ernte ein dichter Zellrasen eine für den Versuch ausreichende Zellzahl garantierte. Das Medium wurde abgesaugt, verworfen und die Zellen einmalig mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers in 500 µl RIPA von der Kulturflasche abgekratzt und für 30 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden 20 min bei 14.000 Umdrehungen / min und 4 °C zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde für die Proteinbestimmung gesondert abgenommen und bei -120 °C

gelagert. Das restliche Volumen wurde mit dem dreifachen Volumen an Proteinauftragpuffer gemischt und ebenfalls bei  $-120\text{ °C}$  gelagert. Dem Auftragpuffer wurden aus Gründen der besseren Verfolgbarkeit des späteren Gellaufes etwas Bromphenolblau zur Anfärbung beigelegt.

### **3.10.3. Proteinmengenbestimmung**

#### 3.10.3.1. Prinzip

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Proben erfolgte mit dem BC-Assay. Das Prinzip bestand darin, dass die in den Proteinen enthaltenen peptidischen Bindungen  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen reduzierten. Diese  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen bildeten mit dem BC-Reagenz lilafarbene Komplexe aus. Je mehr Protein in den Proben enthalten war, umso mehr dieser Komplexe wurden gebildet und umso größer wurde die optische Dichte der Lösung. Diese wurde mit Licht der Wellenlänge 562 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer eigens ermittelten Standardkurve von Lösungen bekannter Proteinkonzentration ließ sich die entsprechende Menge an Protein in der Probe bestimmen.

#### 3.10.3.2. Durchführung

Zur Durchführung der Bestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des mitgelieferten Albuminstandards (2 mg / ml) hergestellt. Man erhielt dann Referenzlösungen der Konzentrationen 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 mg / ml. Zur Verdünnung wurde der verwendete Zelllyse-Puffer herangezogen. Er diente nach Zugabe des BC-Reagenz auch als Leerwert.

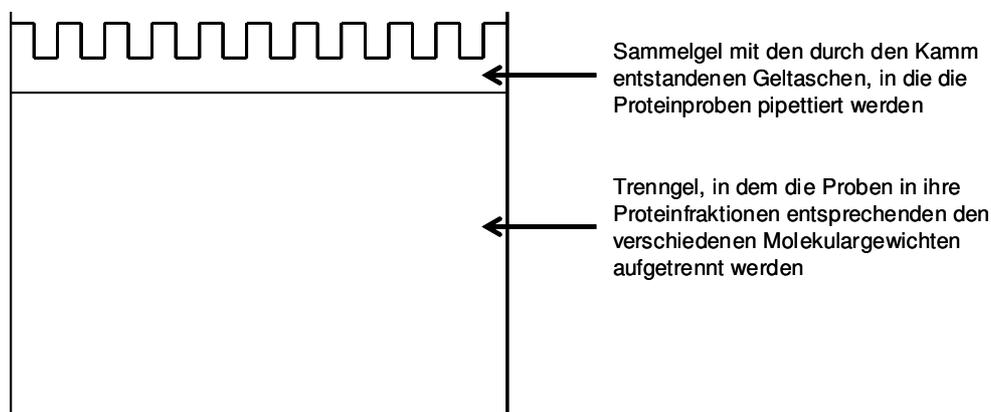
Auf eine Mikrotiterplatte wurden nun je 10  $\mu\text{l}$  / Vertiefung der Standardverdünnungsreihe sowie der Leerwert im Doppelansatz aufgetragen. Ebenso wurden die einzelnen Proben doppelt aufgetragen, hier allerdings nur ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$ . Dieser Konzentrationsfaktor wurde später wieder herausgerechnet. In alle bestückten Vertiefungen wurde nun 200  $\mu\text{l}$  der fertigen BC-Assay-Lösung gegeben. Nach 15 min erfolgte die Messung am Spektrometer. Es wurde das jeweilige Volumen der Proben berechnet, das man in die einzelnen Taschen der Gele pipettieren musste, um 50  $\mu\text{g}$  Proteingemisch aufzutrennen.

Dabei wurde zusätzlich der Verdünnungsfaktor durch den verwendeten Auftragpuffer berücksichtigt.

### 3.10.4. Gellauf, Blot-Vorgang und Detektion

#### 3.10.4.1. Herstellung der Gele

Die Herstellung der Gele (Schema siehe Abb. 3.4) erfolgte am Vortag der Proteinauftrennung. Die Gelgießkammern wurden nach Anweisung des Herstellers aufgebaut. Die Metall- und Glasplatten wurden mittels entsprechender Abstandhalter und Käme im Abstand 1,5 mm positioniert, was der späteren Dicke der Gele entsprach. Alle Teile wurden zuvor mit Ethanol gereinigt. Für alle Versuche kamen 12,5 %ige Polyacrylamid-Trenngele zum Einsatz. Die Trenngellösung wurde in die Kammer gefüllt und mit destilliertem Wasser überschichtet. Das Gel war fest, wenn eine Abscheidungsline sichtbar wurde. Das Wasser wurde abgesaugt und das Trenngel mit der Sammelgellösung, die einen Polyacrylamidgehalt von 3,54 % hatte, überschichtet. Nun wurden die Käme eingesetzt, um die Taschen für die Proben zu erhalten. Als auch die Sammelgele fest waren, wurden sie als Einheit mit der Metall- und der Glasplatte aus der Gießkammer entnommen. Die Käme wurden entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gefüllt. Aufrecht stehend und eingewickelt in Plastikfolie wurden die Gele bei 4°C im Kühlschrank gelagert.



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung eines Geles nach Entnahme des Kammes.

#### 3.10.4.2. Gellauf

Es wurden jeweils 2 Gele in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Taschen mit Laufpuffer überschichtet. In die Taschen wurden die der gewünschten Proteinmenge von 50 µg entsprechenden Probenvolumina mit kapillären Auftragspitzen pipettiert. Auf jedem Gel wurden in eine der Taschen 5 µl des Molekulargewichtsmarkers gegeben, um später die

Lokalisation der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes überprüfen zu können. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und an die Stromquelle angeschlossen. Es wurde ein konstanter Strom von 40 mA angelegt. Die Spannung lag bei 110 V. Die Auftrennung der Proben im Gel von oben nach unten konnte anhand der durch das Bromphenolblau angefärbten Proteine verfolgt werden. Der Vorgang wurde nach etwa 1,5 h beendet, wenn diese an der Unterkante des Geles angekommen waren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf diese Weise anhand ihres spezifischen Molekulargewichtes, da sie durch die in den Lösungen enthaltenen Stoffe denaturiert und komplett negativ geladen worden waren.

#### 3.10.4.3. Blotvorgang

Um die Proteine auf eine Membran zu überführen, schloss sich der Blot-Vorgang an. Die Gele wurden vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen und Glasplatte sowie die Abstandhalter entfernt. Das Sammelgel wurde mit einem Skalpell abgeschnitten. Es erfolgte der Aufbau des Blottes in der Blot-Einheit. Auf die untere Anodengraphitplatte wurden 8 entsprechend der Größe des Gels zugeschnittene und mit dem Blotpuffer getränkte Chromatographie-Papiere gelegt. Darüber kam eine passend zugeschnittene Nitrozellulose-Transfermembran, die mit Bleistift gekennzeichnet war. Das Gel wurde vorsichtig von der Metallplatte entfernt und auf diese Membran aufgelegt. Auf das Gel kamen wiederum 8 mit Blotpuffer getränkte Chromatographie-Papiere. Besonders wurde darauf geachtet, dass der gesamte Aufbau luftblasenfrei erfolgte. Die Kathodengraphitplatte wurde aufgesetzt und der Deckel geschlossen. Es wurde eine konstante Stromstärke von 33 mA pro Gel in der Einheit angelegt. Die Spannung lag bei etwa 5 V. So gelangten die Proteine innerhalb von 2 h vom Gel auf die Nitrozellulosemembran. Die Membranen wurden nach dieser Zeit vorsichtig entnommen und in Ponceau S-Lösung angefärbt. Dies geschah zum einen, um die Banden des Molekulargewichtsmarkers sichtbar zu machen und zu kennzeichnen. Zum anderen konnten so Auftrennung und Lauf der Proben beurteilt werden. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest. wurde die Membran in Blockpuffer unter Schütteln inkubiert, um alle unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

#### 3.10.4.4. Antikörpermarkierung und Detektion

Es erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper. Die verwendeten Antikörper wurden in Blockpuffer verdünnt. Um die mengenmäßig gleiche Auftragung der

Proben zu kontrollieren, wurde zusätzlich Aktin detektiert. Die Membranen wurden mit 5 ml der gewünschten Antikörperlösung in Schlauchfolie eingeschweißt und über Nacht im Kühlraum bei 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran aus der Plastikfolie entnommen und auf dem Waschschüttler 5 x 5 min mit PBS-T und 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP, an dem zur späteren Detektion Merrettichperoxidase (HRP) gebunden war. Die Membran wurde mit 5 ml der Sekundärantikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt und 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Membran analog zum ersten Waschvorgang von überschüssigem Antikörper befreit und so für die eigentliche Detektion vorbereitet. Dazu wurden die Membranen 1 min mit Detektionslösung überschichtet. Die Aktivität der Merrettichperoxidase an den Sekundärantikörpern setzte das Substrat in der Detektionslösung um. Dadurch kam es zu einer photochemischen Reaktion. Es entstanden Lichtblitze, was man als Chemolumineszenz bezeichnet. Zu deren Nachweis wurde ein Hyperfilm je nach Signalstärke 30 Sekunden bis 30 min in der Dunkelkammer mit der Membran exponiert. Die Expositionszeit wurde für einen bestimmten Antikörper für die unterschiedlichen Zelllinien immer gleich lang gewählt, um die Werte untereinander vergleichen zu können. Der Film wurde entwickelt, mit Leitungswasser abgespült und fixiert. Dann wurde er gründlich mit Wasser abgewaschen und zum Trocknen aufgehängt.

Sollte ein weiteres Protein mit anderem Molekulargewicht und folglich anderer Lokalisation auf derselben Membran nachgewiesen werden, etwa Aktin, erfolgte nun eine Waschung mit PBS-T für 30 min, anschließend für 5 min in PBS. Das Vorgehen im Anschluss entsprach dem oben geschilderten.

#### 3.10.4.5. Auswertung

Die Filme wurden am Computer eingescannt und der Schwärzungsgrad der einzelnen Banden ermittelt. Die erhaltene Menge an detektiertem Protein wurde jeweils in Relation zu der Menge an Aktin in der Probe gesetzt, um etwaige Schwankungen in der aufgetragenen Proteinmenge auszugleichen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Als Ergebnis erhielt man einen MV mit SEM.

## 3.11. Bestimmung aktivierter Caspasen

### 3.11.1. Prinzip

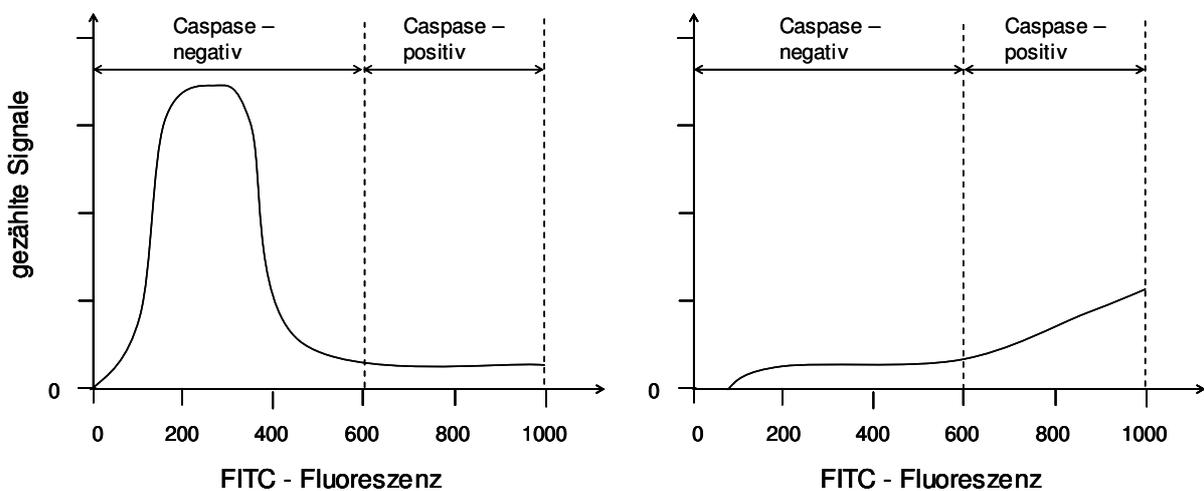
Zur Bestimmung der Menge der aktiven Caspasen in den Zellen der verschiedenen Zelllinien nach Bestrahlung wurde ein „Caspase Detection Kit“ verwendet. Es erfolgte die Bindung des mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugierten Caspase-Inhibitor VAD-FMK an aktivierte Caspasen. Dieser war in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen und im Zellinneren irreversibel an aktivierte Caspasen zu binden. Dabei war er nicht toxisch. Auf diese Weise wurde die Größe der Zellpopulation mit aktivierten Caspasen in den Zellen bestimmt.

### 3.11.2. Durchführung

Zu den Zeitpunkten 48 h und 0 h vor Versuchsdurchführung erfolgte die Bestrahlung mit 8 Gy. Für den 48 h-Wert waren jeweils 1,25 Millionen LN229- beziehungsweise LN229-p53-Zellen bei 37 °C Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen angesetzt worden. Für LN229-p53-Zellen bei 32,5 °C waren je 2 Millionen Zellen angesetzt worden. Entsprechend waren für den 0 h-Wert 2 Millionen beziehungsweise 3 Millionen Zellen eingesetzt worden. Die Zellen wurden zur Versuchsdurchführung abtrypsiniert, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und einmal mit frischem Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 3.000 Umdrehungen / min, 4 °C; für alle Zentrifugationsschritte des Versuches). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen erneut in Kulturmedium resuspendiert. Es erfolgte eine Zellzählung. Die Proben wurden zwischenzeitlich auf Eis gestellt. Ein Volumen entsprechend 1 Million Zellen wurde abgenommen, erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 300 µl Kulturmedium gelöst. Es wurde je 1 µl FITC-konjugierte VAD-FMK – Lösung zu den Proben gegeben. Zu einer bestrahlten 48 h-Probe von LN229-Zellen wurde stattdessen 1 µl Lösung des unmarkierten Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK hinzugefügt, um diese als Negativkontrolle zu verwenden. Es wurde eine Inkubation bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid-Bedampfung im Brutschrank über 45 min durchgeführt. Im Anschluss wurde zentrifugiert und die Zellen in 0,5 ml des im Kit enthaltenen Wasch-Puffers resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 300 µl Wasch-Puffer gelöst und die Proben auf Eis gestellt, bis die Messung am Durchflusszytometer erfolgte (Erläuterung zum Durchflusszytometer siehe 3.12.1).

### 3.11.3. Auswertung

Die Analyse der Proben erfolgte mittels des FL-1 Kanals am Durchflusszytometer. Es wurden 2 Intervalle festgelegt. Im ersten lagen die Zellen mit einer so geringen Signalgebung, dass sie nicht als spezifisch markiert gelten konnten. Das zweite enthielt die Zellen, in denen die Fluoreszenzstärke groß genug war, um sie als spezifisch markiert zu betrachten. Zur Bestimmung der Intervallgrenzen diente die Negativkontrolle (Abb. 3.5). Betrachtet wurden die prozentualen Anteile der Zellen in diesen beiden Intervallen, anhand derer die Interpretation erfolgte. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und MV sowie SEM aus den Einzelergebnissen berechnet.



**Abb.3.5:** Schematische Darstellung der Ermittlung des Zellanteils mit aktivierten Caspasen. In beiden Graphiken ist auf der x-Achse die FITC-Fluoreszenz als Maß für die Caspase-Menge gegen die gezählten Signale, welche den gezählten Zellen entsprachen, auf der y-Achse dargestellt. Die linke Graphik zeigt die Verteilung der Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit dem Inhibitor (Negativkontrolle). Anhand dieser Verteilung wurde die Grenze zwischen Caspase-negativen und Caspase-positiven Zellen gezogen (gestrichelte Linie). Diese Grenze wurde in die rechte Graphik übernommen, die die Zellverteilung nach Bestrahlung und ohne Inhibitor-Behandlung zeigt.

## 3.12. Zellzykluskinetik

### 3.12.1. Funktionsweise des Durchflusszytometers

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen oder Zellkerne einer Suspension durch Einsaugen über eine dünne Kapillare einzeln und im rechten Winkel zu einem Laserstrahl geführt (Referenzwellenlänge 488 nm). Dieser ist in der Lage, etwaige Fluoreszenzfarbstoffe

anzuregen. Diese Farbstoffe sind durch entsprechende Vorbehandlung entweder direkt an Zellstrukturen gebunden (etwa PJ interkalierend in die DNA) oder aber an spezifische Antikörper konjugiert sein. Durch die Anregung emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe wiederum Licht definierter Wellenlänge. Mit Hilfe von Detektoren werden dann die verschiedenen emittierten Signale bestimmt. Dazu stehen mehrere Kanäle zur Verfügung, wodurch die gleichzeitige Messung verschiedener Fluoreszenzen ermöglicht wird. Um die spezifischen Signale beziehungsweise Anteile der verschiedenen Fluoreszenzkanäle sicher zu detektieren und zu differenzieren, enthält das Durchflusszytometer ein System an hintereinander geschalteten Spiegeln, Filtern und Verstärkern, die sich je nach Bedarf modifizieren lassen. Neben diesen spezifischen Signalen entstehen auch Nebenphänomene durch die Größe und Granularität der Zellen, welche als Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gesondert aufgezeichnet werden. Die gemessenen Fluoreszenzsignale kann man auf verschiedene Arten darstellen. Zum einen in Histogrammen für den einzelnen Kanal gegen die gezählten Zellen. Zum anderen kann man aber auch verschiedene gleichzeitig gemessene Fluoreszenzen gegeneinander in einer Punktwolkendarstellung (Dot Plot) veranschaulichen. Zur statistischen Auswertung dieser Graphiken, die direkt am Durchflusszytometer erstellt werden, kann man manuell verschiedene Intervalle und Fenster festlegen, in denen jeweils verschiedene Subpopulationen des untersuchten Zellsystems liegen. Der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation wird berechnet und in einer Tabelle dargestellt. In allen Versuchen dieser Arbeit wurden jeweils 10.000 Signale, also gezählte Zellen, aufgezeichnet und dargestellt.

### **3.12.2. DNA-Doppelfluoreszenzmarkierung**

#### 3.12.2.1. Prinzip

Anhand ihres DNA-Gehaltes kann man die einzelne Zelle in der Population einer bestimmten Zellzyklusphase zuordnen (siehe 2.2.1). Da die Verdoppelung in der S-Phase geschieht, bewegt sich der DNA-Gehalt der Zellen in der S-Phase zwischen diploid und tetraploid. Zellen in der G1-Phase und solche in der G0-Phase lassen sich wegen ihres in beiden Fällen diploiden Chromosomensatzes nicht unterscheiden. Ebenso ist keine Differenzierung zwischen Zellen in der G2-Phase und solchen, die sich in der Mitose befinden, möglich, da in beiden Fällen ein tetraploider Chromosomensatz vorliegt. Der DNA-Gehalt wird durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PJ) bestimmt. Dieser interkaliert in die DNA. Die Stärke des erhaltenen Signals ist der Menge von DNA in der Zelle direkt

proportional. So lässt sich der Zellanteil in den einzelnen Zellzyklusphasen über einen bestimmten Zeitraum verfolgen, indem man Proben bestimmter Zeitwerte in diesem Zeitraum markiert und misst.

Um die Transition einer Subpopulation im Zellzyklus über diesen Zeitraum betrachten zu können, wird zusätzlich ein zweiter Parameter bestimmt. Hierzu benutzt man das Thymidinanalogon BrdU, das über spezifische Antikörper mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. Da BrdU direkt in die DNA eingebaut wird und nur über einen kurzen Zeitraum den Zellen zur Synthese angeboten wird, werden nur Zellen markiert, die sich währenddessen in der S-Phase befunden haben. Die BrdU-markierten Zellen sind also homogen hinsichtlich ihres Zellzyklusses, da sie sich zum Zeitpunkt der BrdU-Inkubation alle in der S-Phase befanden. Trägt man nun den durch PJ ermittelten DNA-Gehalt gegen das gleichzeitig für BrdU-Fluoreszenz bestimmte Signal auf, lässt sich die Transition dieser Subpopulation über die Zeit verfolgen.

#### 3.12.2.2. Versuchsansatz und Präparation

Der Ansatz erfolgte 24 h vor Bestrahlung in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, in die je 5 ml Zellsuspension mit 125.000 Zellen / ml gegeben wurden. Unmittelbar nach der Bestrahlung der Zellkulturen wurden sie mit BrdU inkubiert. Hierzu wurde jeweils eine Menge von 50 µl der BrdU-Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank für 15 min. In diesem Zeitraum war es den sich in der S-Phase befindlichen Zellen möglich, das angebotene Thymidinanalogon in ihre Erbsubstanz einzubauen. Im Anschluss wurde das überschüssige BrdU durch dreimaliges Überschichten mit frischem Kulturmedium und anschließendem Absaugen entfernt. Die weitere Kultivierung erfolgte in BrdU-freiem Kulturmedium. Alle 3 h über einen Zeitraum von 60 h erfolgte nun die Fixierung der entsprechenden Proben durch Abtrypsinieren, Zentrifugation (1.200 Umdrehungen / min bei 4 °C für 6 min; für alle Zentrifugationsschritte des Versuches) und Lagerung der Zellen in 80 % Ethanol bei -20 °C. Die weitere Präparation erfolgte nach Sammlung aller Proben eines Versuches. Für jede Zelllinie wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt.

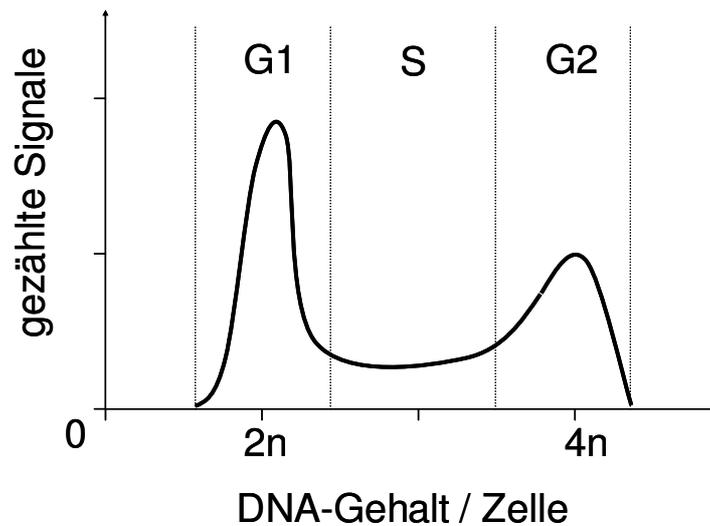
Zur Präparation wurden die eingefrorenen Proben auf RT erwärmt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es erfolgte eine Inkubation mit 2 ml RNase-Lösung für 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Nach Zentrifugation wurde den Proben zur Zellkernisolierung je 2 ml kalte Pepsin-Lösung zugegeben und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Es wurde abzentrifugiert und einmal mit 3 ml PBS-A gewaschen. Zur Denaturierung der DNA wurden die Pellets in 2 ml 2 N Salzsäure für 10 min bei RT belassen. Anschließend wurden die verbleibenden Zellkerne abzentrifugiert und dreimal mit 3 ml PBS-A gewaschen. Nun wurden den Zellpellets jeweils 200 µl Maus-anti-BrdU (1:10 verdünnt mit PBS) zugegeben, um das BrdU in der DNA zu markieren. Zur Antikörperbindung wurde 1 h bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS-A wurden 200 µl FITC-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-IgG (1:50 mit PBS verdünnt) als Sekundärantikörper zugegeben und 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben mit 350 µl PJ-Lösung gewaschen. Je nach Größe der erhaltenen Zellpellets wurden nun 200-500 µl PJ-Lösung zur Fluoreszenzmarkierung der gesamten DNA des einzelnen Zellkerns zugegeben. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte nach 15 min Inkubation bei 4°C, wobei die PJ- und FITC-Fluoreszenz detektiert wurden.

### **3.12.3. Auswertung der DNA-Markierung**

#### 3.12.3.1. Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen

Um die Entwicklung der Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen an der Gesamtpopulation zu ermitteln, wurde die Anzahl der gezählten Signale gegen die Stärke des PJ-Signales aufgetragen. Der jeweilige Anteil wurde mittels manuell festgelegter Intervalle direkt am Durchflusszytometer berechnet (Abb. 3.6).



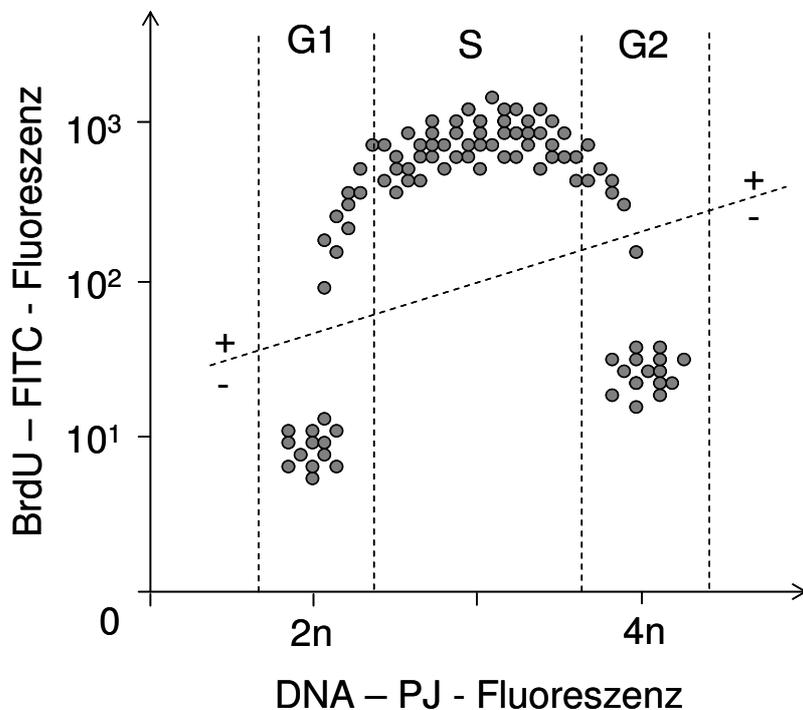
**Abb. 3.6:** Schematische Darstellung der Verteilung der Zellen über die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2-Phase) anhand ihres DNA-Gehaltes ( $2n$  = diploid,  $4n$  = tetraploid). Als Maß für den DNA-Gehalt diente die PJ-Fluoreszenz, die hier gegen die gezählten Signale (Zellen) aufgetragen wurde. Die Intervalle für die einzelnen Zellzyklusphasen wurden anhand der erhaltenen Verteilung manuell festgelegt (gestrichelte Linien).

Durch Auftragen dieser so ermittelten Anteile gegen die Zeit ließen sich nun die Zellanteile in den Zellzyklusphasen nach Bestrahlung über den betrachteten Zeitraum darstellen und mit der unbestrahlten Kontrolle vergleichen. Der Versuch wurde für LN229-Zellen bei  $37\text{ °C}$  und LN229-p53-Zellen bei  $37\text{ °C}$  bzw.  $32,5\text{ °C}$  durchgeführt.

### 3.12.3.2. Zellzykluskinetik

Um die Transition der BrdU-markierten Zellen im Zeitverlauf verfolgen zu können, wurde die dem BrdU entsprechende Stärke der FITC-Fluoreszenz gegen die dem DNA-Gehalt entsprechende Fluoreszenzstärke von PJ aufgetragen. So entstand eine Darstellung der Zellsubpopulationen als Punktwolken. Es wurden wiederum entsprechende Fenster manuell festgelegt, wobei die Grenzen für die Zuordnung zu den Zellzyklusphasen anhand der PJ-Fluoreszenz entsprechend der Analyse der Verteilung der Gesamtpopulation gewählt wurden (siehe Punkt 3.12.3.1). Außerdem erfolgte eine zusätzliche Abgrenzung der BrdU-markierten gegen die unmarkierten Zellen. Die Subpopulationen wurden so als Punktwolken dargestellt. Die Berechnung des jeweiligen relativen Anteils an der Gesamtpopulation erfolgt direkt am Durchflusszytometer anhand der entsprechenden Fenster (Abb. 3.7). Unmittelbar nach der Inkubation mit BrdU (0 h-Wert) ähnelt die erhaltene Graphik einem nach unten offenem Hörnchen. Die positiv markierten Zellen, also solche, die BrdU in ihre DNA eingebaut hatten,

fanden sich zu diesem Zeitpunkt im oberen mittleren Fenster, das der S-Phase dieser Zellen entsprach. Im Laufe ihres Zellzyklus, (also zu späteren Zeitpunkten) fanden sie sich entsprechend dem zunehmenden Gehalt an Erbsubstanz zunehmend im rechten oberen Fenster, dass die G2-Phase repräsentierte. Nach der Mitose erschienen die Zellen im linken oberen Fenster, das der G1-Phase entsprach. Auch hier konnte durch Betrachtung der Entwicklung der Anteile der einzelnen Phasen an der Gesamtpopulation ein Vergleich von bestrahlten und unbestrahlten Zellen erfolgen. Zellen ohne BrdU in ihrer Erbinformation befanden sich zum Zeitpunkt der Inkubation mit dem Thymidinanalogon nicht in der S-Phase und konnten deshalb nicht markiert werden. Entsprechend durchliefen sie ihren Zyklus in der unteren Fensterreihe. Es sollte der Zellzyklus von LN229-Zellen bei 37 °C und LN229-p53-Zellen bei 37 °C bzw. 32,5 °C vor und nach Bestrahlung verglichen werden.



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung einer Zweiparametermessung zum Zeitpunkt 0 h nach BrdU-Inkubation. Die Punkte stehen für die Einzelsignale. Die Zellen oberhalb der quer verlaufenden gestrichelten Linie hatten BrdU in ihre Erbsubstanz eingebaut und wurden entsprechend markiert (+). Alle anderen Zellen lagen unterhalb dieser Linie (-). Die Intervallgrenzen für G1-, S- und G2-Phase (senkrechte gestrichelte Linien) wurden aus der Verteilung des DNA-Gehaltes (2n = diploid, 4n = tetraploid) derselben Probe übernommen. Die Zellen, die sich hier als positiv markiert in der G1- oder G2-Phase darstellten, befanden sich in der frühen bzw. späten S-Phase.

### 3.13. Proteinbestimmung mit Immunfluoreszenz auf Einzelzellebene

Die Proteinbestimmung mittels Western Blot erlaubte nur eine Betrachtung eines Kollektivs von Zellen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie die einzelne Zelle von LN229- sowie LN229-p53-Zellen auf den Temperaturwechsel von 37 °C auf 32,5 °C hinsichtlich des Gehaltes an p21-Protein reagierte, wurden zusätzliche Versuche gemacht. Es erfolgte eine Immunfluoreszenz - Bestimmung am Zytopräparat. Hierbei wurde die Zelle zunächst mit einem Primärantikörper behandelt, der an das nachzuweisende Protein in-situ band. Um das Protein nachzuweisen, verwendete man nun einen mittels Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Unter dem Laserscanmikroskop wurde nun das Protein darstellbar.

#### 3.13.1. Versuchsansatz und Präparation

Pro Zelllinie wurden zunächst 2 Kulturflaschen angesetzt, in die jeweils 4 Millionen Zellen eingesetzt wurden. Nach 24 h wurde eine der beiden Kulturflaschen in das 32,5 °C Milieu überführt und weitere 24 h kultiviert. Dann erfolgte die Zellernte durch Abtrypsinieren und dreimaliges Waschen mit PBS (1000 rpm, 5 min, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in 3 ml eiskaltem, 80 %-igem Ethanol resuspendiert und bei -20 °C zwischengelagert.

#### 3.13.2. Färbung

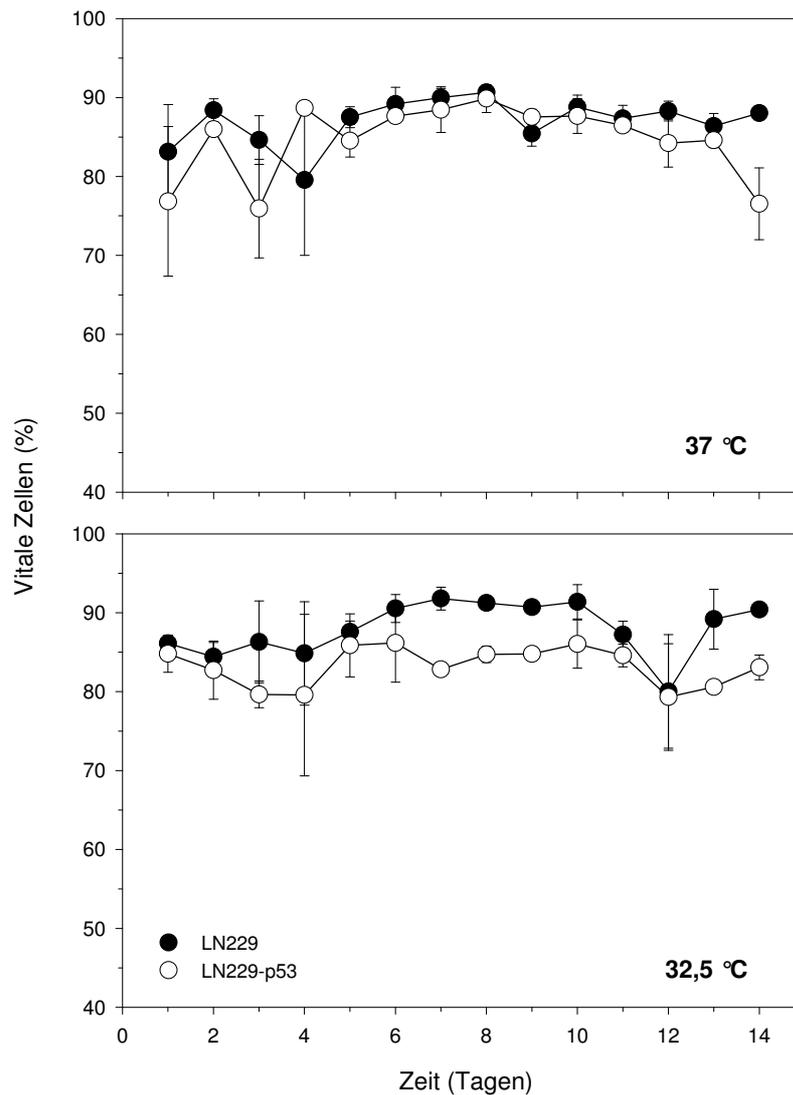
100 µl dieser Lösung wurden mittels Zytozentrifuge auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger überführt (400 rpm, 5 min), um einen einschichtigen Zellrasen zu erhalten. Das Präparat wurde anschließend über 30 min luftgetrocknet. Es erfolgte eine weitere Fixierung in 100 % Methanol bei - 20 °C für 10 min. Anschließend wurde das Präparat für weitere 10 min an der Luft getrocknet, um für wiederum 10 min mit PBS, welchem 0,02 % Tween-20 zugegeben waren, zu inkubieren. Nun erfolgte die Inkubation mit dem p21-Primärantikörper, der 1:25 mit der PBS / Tween20 (0,02 %) – Lösung verdünnt wurde. Es wurde eine Kontrolle mitgeführt, die lediglich mit der PBS / Tween-Lösung ohne Antikörper behandelt wurde. Die Inkubation erfolgte über 1 h bei RT. Der Primärantikörper wurde durch viermaliges Waschen mit PBS über 5 min entfernt. Der Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-AK, FITC konj.) wurde 1:50 mit PBS / Tween 20 (0,02 %) verdünnt und zur Inkubation wieder für 1 h auf die Präparate gegeben. Es wurde erneut viermal 5 min mit PBS gewaschen und

anschließend luftgetrocknet. Es erfolgte eine 5-minütige Gegenfärbung mit Ethidiumbromid, welches mit PBS ausgewaschen wurde. Der Anteil der Zellen, in denen p21 zur Darstellung kam, konnte nun im Laserscanmikroskop ausgezählt werden. Es wurden jeweils zwischen 200 und 500 Zellen, je nach vorhandener Zellzahl, ausgezählt. Um die Zellen zusätzlich durchflußzytometrisch zu untersuchen, wurden die durch Ethanol fixierten Zellen nicht mittels Zytozentrifuge auf Objektträger überführt, sondern in FacScan-Röhrchen gegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zum oben beschriebenen Vorgehen bei der Durchflußzytometrie.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vitalität

Der Anteil vitaler Zellen in der Kultur wurde für nicht-transfizierte LN229-Zellen und LN229-p53-Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen bestimmt. Beide Zelllinien wurden bei 37 °C und 32,5 °C untersucht. Für LN229-Zellen ergaben sich bei 37 °C über den gesamten Zeitraum des Versuches gemittelte Werte, die um 87 % schwankten. Der geringste Anteil im Zeitverlauf der MV lag bei 80 % und der höchste Anteil bei 91 %. Mit einem vitalen Anteil schwankend um 88 %, einem Maximalwert von 92 % sowie einem Minimalwert von 80 % verhielten sich diese Zellen bei 32,5 °C hinsichtlich ihrer Vitalität analog zur höheren Temperatur. Bei der statistischen Auswertung ergab sich ein p-Wert im paarigen t-Test von 0,411 beim Vergleich von 37 °C und 32,5 °C, dementsprechend findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Temperaturen für LN229-Zellen. Für die transfizierte Zelllinie LN229-p53(mt) bei 37 °C, entsprechend dem temperatursensitivem p53 in mt-Konfiguration, bewegte sich der Anteil vitaler Zellen um 85 %, der höchste Wert konnte mit 90 %, der niedrigste mit 76 % ermittelt werden. Auch hier bestand kaum ein Unterschied zum Verhalten der Zellen bei 32,5 °C (entsprechend p53 in wt-Konfiguration). Bei dieser Temperatur ergab sich ein Wert von etwa 83 %, um den die einzelnen Tageswerte schwankten. Der maximale MV lag bei 86 %, der minimale Wert bei 80 %. Mit einem p-Wert von 0,30 konnte auch hier kein statistisch signifikanter Einfluss der untersuchten Temperaturen auf LN229-p53-Zellen hinsichtlich der Auswirkung auf die Vitalität der Zellen gezeigt werden. Beim Vergleich der beiden Zelllinien ergab sich gleiches Verhalten bei 37 °C mit einem p-Wert von 0,097 im paarigen t-Test. Bei 32,5 °C zeigte sich eine geringfügig niedrigere Vitalität von LN229-p53(wt)-Zellen gegenüber LN229-Zellen (paariger t-Test mit einem p-Wert = 0,0004). Dieser Unterschied bewegte sich im Bereich von maximal 9 %. Wie oben dargelegt lässt sich aus Abb. 4.1 entnehmen, dass sich hinsichtlich der Vitalität der beiden Zelllinien bei 37 °C kein Unterschied ergab und sich diese über den betrachteten Zeitraum von 14 Tagen auf konstant hohem Niveau bewegte. Auch bei 32,5 °C war die Vitalität gleich bleibend hoch über den gesamten Versuchszeitraum, sowohl für LN229-Zellen als auch für LN229-p53(wt)-Zellen. Bei 32,5 °C lag die Vitalität für die transfizierte Zelllinie geringfügig niedriger als für nicht-transfizierte LN229-Zellen.



**Abb. 4.1:** Die Graphik zeigt den Anteil vitaler Zellen in Kulturen von LN229-Zellen (schwarze Kreise) und LN229-p53-Zellen (weiße Kreise). Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen SEM. Dargestellt ist der Verlauf über 14 Tage bei 37 °C und 32,5 °C. Während bei der höheren Temperatur beide Zelllinien gleiche Vitalität zeigten, lag bei 32,5 °C die Vitalität von LN229-p53-Zellen etwas niedriger als die von LN229-Zellen.

## 4.2. Zellwachstum

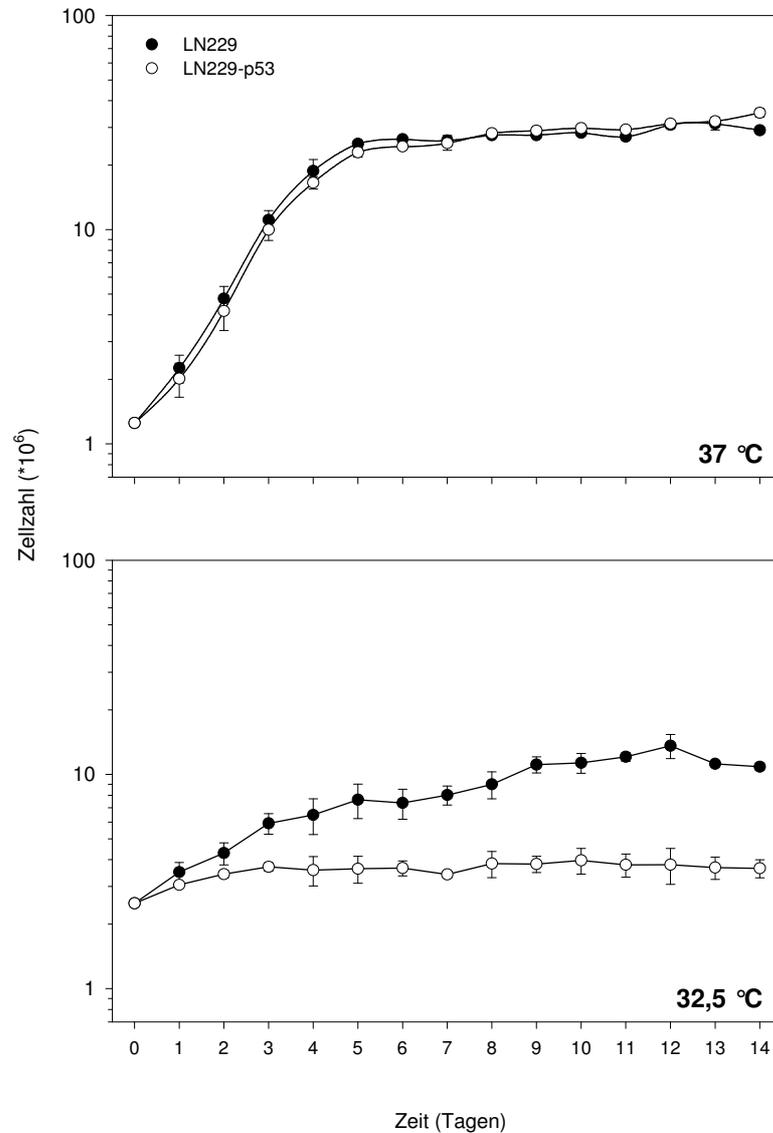
Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurden Zellkulturen beider Zelllinien bei 37 °C und 32,5 °C über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Das Ergebnis ist dargestellt in Abb. 4.2. Bei 37 °C erhielt man in beiden Fällen eine Kurve, die bis zum 5. Tag eine exponentiell ansteigende Zellzahl zeigte, um dann bis zum Versuchsende in einer stationären Phase zu bleiben, in der das Wachstum unverändert blieb. Die Zahl der LN229-Zellen nahm von 1,25 Millionen eingesetzten Zellen auf etwa 19 Millionen nach 5 Tagen zu. Wie dargestellt änderte sich im Bereich vom 5. bis 14. Tag dieser Wert nur noch in geringem

Umfang und stieg nicht weiter exponentiell an, so dass zu Versuchsende eine Zellzahl von etwa 30 Millionen Zellen gefunden wurde. Aus den einzelnen Versuchen ergab sich eine Verdoppelungszeit im exponentiellen Kurventeil im Bereich der ersten 3 Tage von durchschnittlich 22,3 h +/- 1,7. Bei den LN229-p53(mt)-Zellen (37 °C), war ein Anstieg der Zellzahl von 1,25 Millionen eingesetzten Zellen auf 17 Millionen Zellen nach 5 Tagen zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf schloss sich auch hier bis zum 14. Tag eine stationäre Phase an, in der sich die Zellzahl nur noch auf etwa 32 Millionen Zellen annähernd verdoppelte. Die Verdopplungszeit im exponentiellen Teil während der ersten 3 Tage wurde mit 24,0 h +/- 3,2 ermittelt. Bei 32,5 °C erfolgte das Wachstum der LN229-Zellen nicht in einer klassischen Wachstumskurve. So war der Übergang in eine stationäre Phase hier im untersuchten Zeitraum nicht eindeutig zu erkennen. Ein exponentieller Anstieg der Zellzahl erfolgte nur während der ersten 3 – 4 Tage. Wie für die anderen Zelllinien wurde auch hier die Verdoppelungszeit während der ersten 3 Tage bestimmt. Der erhaltene Wert betrug 61,7 h +/- 6,5. Die eingesetzte Zellzahl von 2,5 Millionen zeigte bis zum 5. Tag noch eine Zunahme auf 8 Millionen, was einer Vervierfachung der Zellzahl und somit auch der Verdoppelungszeit entsprach.

Bei den LN229-p53(wt)-Zellen, also 32,5 °C, zeigte sich kaum Wachstum. Nur bis zum dritten Tag nahm die eingesetzte Zellzahl von 2,5 Millionen geringfügig auf 3,6 Millionen zu, um im weiteren Verlauf des Versuches bis zum 14. Tag um diesen Wert zu schwanken. Bei der Bestimmung der Verdoppelungszeit während der ersten drei Tage hob sich einer der drei Werte mit 433 h deutlich von den anderen beiden ab, so dass er nicht zur Berechnung des MV herangezogen wurde. Es ergab sich somit basierend auf den Werten der ersten 3 Tage eine rechnerische Verdoppelungszeit von 190,5 h +/- 5,5.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich LN229- und LN229-p53(mt)-Zellen bei 37 °C in ihrem Wachstumsverhalten nicht unterschieden. Bei statistisch gleicher Verdoppelungszeit ( $p = 0,66$ ) verliefen ihre Wachstumskurven annähernd deckungsgleich (Abb. 4.2). Ein deutlicher Unterschied zum Verhalten bei 37 °C im Sinne einer Einschränkung zeigte sich bei LN229-Zellen bei 32,5 °C. Die ermittelte Verdopplungszeit zeigte sich signifikant um den Faktor 2,7 ( $p = 0,004$ ) erniedrigt. Es ist von einer deutlichen Wachstumseinschränkung bei 32,5 °C im Vergleich zu 37 °C bei LN229-Zellen auszugehen. Bei den LN229-p53(wt)-Zellen zeigte sich bei 32,5 °C ein noch stärker verringertes Wachstum gegenüber den transfizierten Zellen bei 37 °C (mt). Entsprechend war die Verdoppelungszeit für die ersten drei Tage um den Faktor 7,9 gegenüber der bei 37 °C

herabgesetzt. Auch hier war der Unterschied zwischen den beiden Temperaturen signifikant ( $p = 0,00009$ ). Ab dem 3. Tag zeigten die LN229-p53(wt)-Zellen kein weiteres Wachstum.

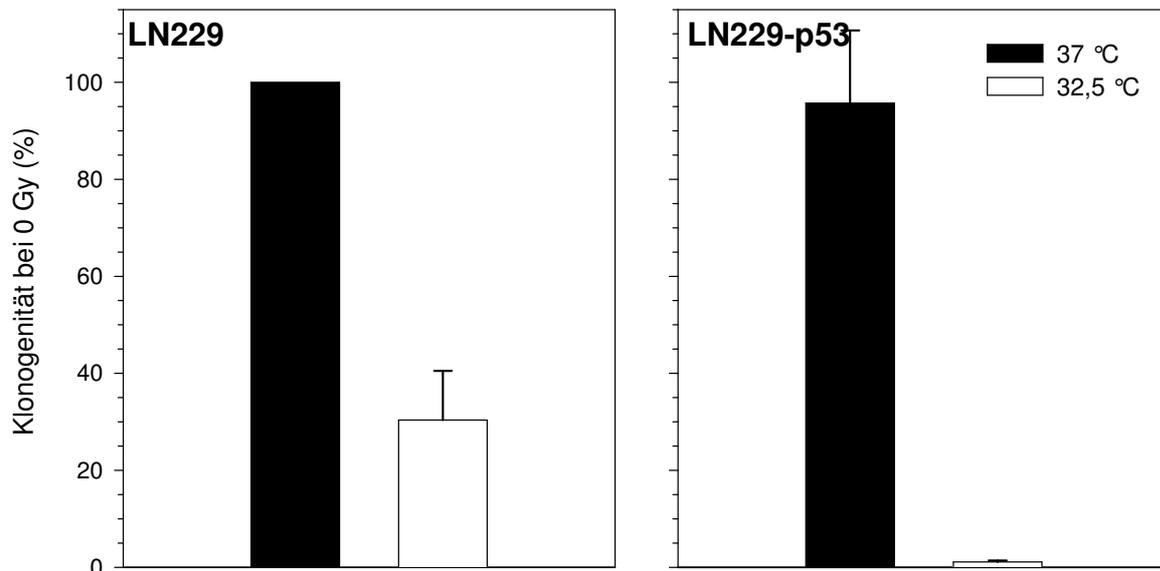


**Abb. 4.2:** Wachstumskurven für LN229-Zellen (schwarze Kreise) und LN229-p53-Zellen (weiße Kreise) bei 37 °C (oberes Diagramm) und 32,5 °C (unteres Diagramm) bei halblogarithmischer Darstellung über 14 Tage. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Bei 37 °C zeigten beide Zelllinien gleich gutes Wachstum. Dagegen war bei 32,5 °C in beiden Fällen das Wachstum bei der transfizierten Zelllinie in größerem Umfang als bei der nicht-transfizierten eingeschränkt.

### 4.3. Klonogenität und Dosis-Effekt-Kurven

#### 4.3.1. Klonogenität ohne Bestrahlung

Der Anteil klonogener Zellen ist für die beiden Zelllinien bei 37 °C und 32,5 °C in Abb. 4.3 dargestellt. Der Wert der LN229-Zellen bei 37 °C wurde auf 100 % festgelegt, die Werte der anderen Zelllinien relativ dazu berechnet. Bei 32,5 °C zeigten die LN229 - Zellen noch 30,37 % +/- 10,15 ihrer Klonogenität bei 37 °C. Die LN229-p53(mt)-Zellen, also bei 37 °C Umgebungstemperatur, zeigten 95,73 % +/- 14,99 des Wertes der untransfizierten Zellen. Nach dem Milieuwechsel zu 32,5 °C fand sich für die LN229-p53(wt)-Zellen nur noch ein Wert von 1,07 % +/- 0,32 klonogener Zellen.



**Abb. 4.3:** Die Graphik zeigt die Klonogenität bei 0 Gy von LN229-Zellen und LN229-p53-Zellen bei 37 °C (schwarze Balken) und 32,5 °C (weiße Balken). Der Wert der LN229 - Zellen bei 37 °C wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Werte relativ dazu berechnet. Gezeigt ist der MV zusammen mit dem SEM (Fehlerbalken) bei halblogarithmischer Darstellung. Bei 32,5 °C ist in beiden Zelllinien eine Einschränkung der Fähigkeit zur Klonbildung ersichtlich. Dieser Effekt ist bei den transfizierten Zellen deutlicher zu sehen als bei den ursprünglichen LN229-Zellen.

Die beiden Zelllinien unterschieden sich bei 37 °C hinsichtlich ihrer Klonogenität somit nicht voneinander ( $p = 0,79$ ). Bei 32,5 °C fiel die Fähigkeit zur Klonbildung bei LN229-Zellen um etwa 2/3 auf 30,37 % signifikant gegenüber 37 °C ab ( $p = 0,004$ ). Auch die transfizierte Zelllinie zeigte bei 32,5 °C gegenüber 37 °C eine signifikant eingeschränkte Klonbildungsfähigkeit ( $p = 0,003$ ). Die Ausprägung dieses Effektes war hier mit einer

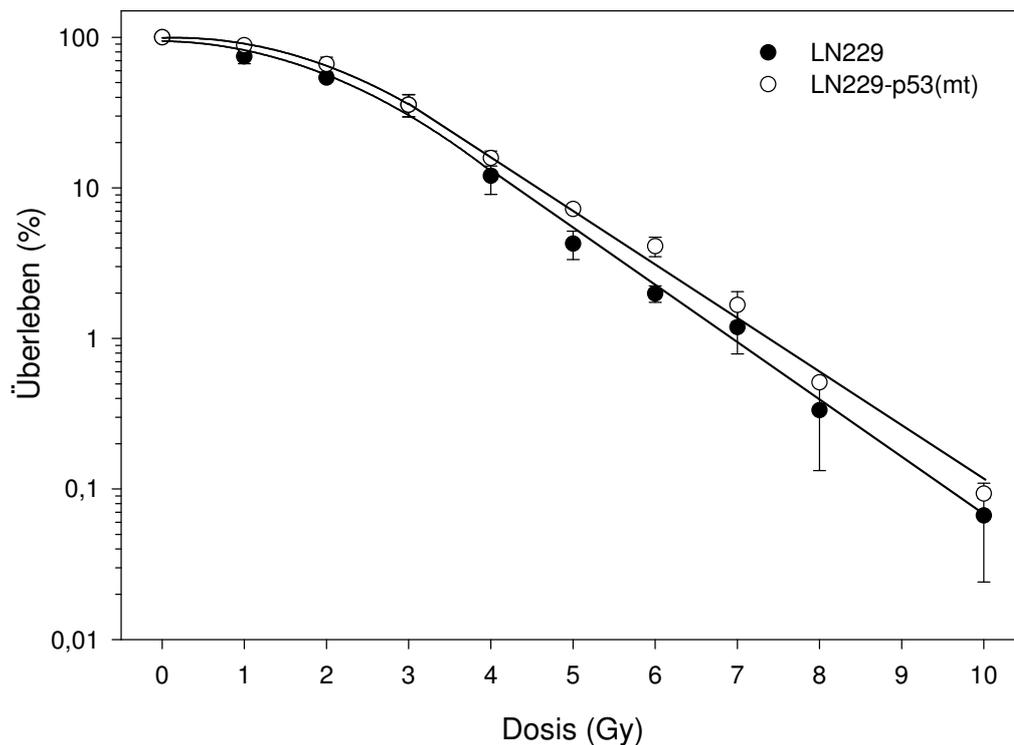
Einschränkung der Klonbildung um das 95-fache des Wertes der höheren Temperatur auf nur noch 1,07 % wesentlich stärker ausgeprägt als bei den LN229-Zellen.

#### 4.3.2. Dosis-Effekt-Kurven

Eine Dosis-Effekt-Kurve sollte ursprünglich für LN229-Zellen bei 37 °C und LN229-p53-Zellen bei 37 °C und 32,5 °C ermittelt werden. Bei den LN229-p53(wt)-Zellen erfolgte kaum Klonbildung. Auch eine verlängerte Kultivierungszeit von 5 Wochen für diese Zellen führte nicht zur Ausbildung von Klonen in für die Dosis-Effekt-Kurven verwertbarem Umfang. Deshalb konnten nur die Ergebnisse für LN229- und LN229-p53(mt)-Zellen bei 37 °C dargelegt werden.

Für die LN229-Zellen reichte der Schulterbereich der Kurve bis zu einer Dosis von 3 Gy. Danach erfolgte ein exponentieller Abfall der überlebenden Zellen mit steigender Dosis. Nach 1 Gy Bestrahlung nahm der durchschnittliche Anteil überlebender Zellen gegenüber 0 Gy auf 74,5 % ab. Nach 2 Gy fand sich noch eine überlebende Fraktion von 53,9 % der ursprünglich eingesetzten Zellzahl. Nach 3 Gy betrug dieser Wert noch 35,6 %.  $D_q$  als Parameter der Reparaturfähigkeit der Zellen (Schulterbreite) ergab sich mit 1,8 Gy  $\pm$  0,24. Mit zunehmender Dosis erfolgte im Weiteren eine kontinuierliche, geradlinige Abnahme der überlebenden Zellen. Für den aus diesem Kurventeil ermittelten Parameter für die intrinsische Strahlensensitivität,  $D_0$ , erhielt man einen Wert von 1,1 Gy  $\pm$  0,14. Der relative Anteil überlebender Zellen nach 2 Gy, also  $SF_2$ , lag bei 0,55  $\pm$  0,03.

Auch bei der für die LN229-p53(mt)-Zellen ermittelten Dosis-Effekt-Kurve reichte der Schulterbereich der Kurve bis zu einer applizierten Dosis von 3 Gy. Die zur Klonbildung befähigten Zellen hatten nach Bestrahlung mit 1 Gy einen Anteil von 88,6 %. Von 1 Gy auf 2 Gy erfolgte ein Abfall auf 66,3 %. Bei 3 Gy fand sich eine überlebende Zellfraktion von 35,6 %.  $D_q$  wurde bei dieser Zelllinie mit 1,9 Gy  $\pm$  0,17 bestimmt. Bei den höheren Dosen erfolgte auch hier ein exponentieller Abfall des überlebenden Anteils der Zellen. Für  $D_0$  konnte ein Wert von 1,2 Gy  $\pm$  0,03 bestimmt werden. Die  $SF_2$  ergab sich mit 0,63  $\pm$  0,03.



**Abb. 4.4:** Dosis-Effekt-Kurven für LN229-Zellen (schwarze Kreise) und LN229-p53(mt)-Zellen (weiße Kreise) bei 37°C. Dargestellt ist der MV aus drei unabhängigen Versuchen mit SEM (Fehlerbalken). Im Bereich der Schulter wurde eine Regression 2. Ordnung durch die Werte gelegt, im geradlinigen Kurventeil eine Regression 1. Ordnung. Die Kurve für LN229-Zellen verlief etwas unterhalb der der LN229-p53(mt)-Zellen, nahm aber denselben Verlauf, so dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten Parametern der Strahlenempfindlichkeit ergab.

Wie in Abb. 4.4 dargestellt, verlief die Kurve der LN229-Zellen annähernd parallel zu der der LN229-p53(mt)-Zellen. Die Werte für die LN229-Zellen lagen durchgehend niedriger. Dieses Verhalten konnte mit dem paarigen t-Test verifiziert werden ( $p = 0,02$ ). Bei der Betrachtung von  $D_q$  ( $p = 0,83$ ),  $D_0$  ( $p = 0,54$ ) und  $SF_2$  ( $p = 0,13$ ) ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen LN229-Zellen und LN229-p53(mt)-Zellen finden.  $D_q$  und  $D_0$  unterschieden sich zwischen LN229- und LN229-p53(mt)-Zellen durchschnittlich jeweils um 0,1 Gy. Auch bei der  $SF_2$  war der Unterschied mit 0,08 gering ausgeprägt.

Zusammenfassend betrachtet ergaben sich in den Parametern für Strahlensensitivität und Reparaturfähigkeit der beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede. Die LN229-p53(mt)-Zellen zeigten durchgehend eine etwas größere Überlebensrate, was sich aber statistisch nicht auf  $D_q$  und  $D_0$  auswirkte.

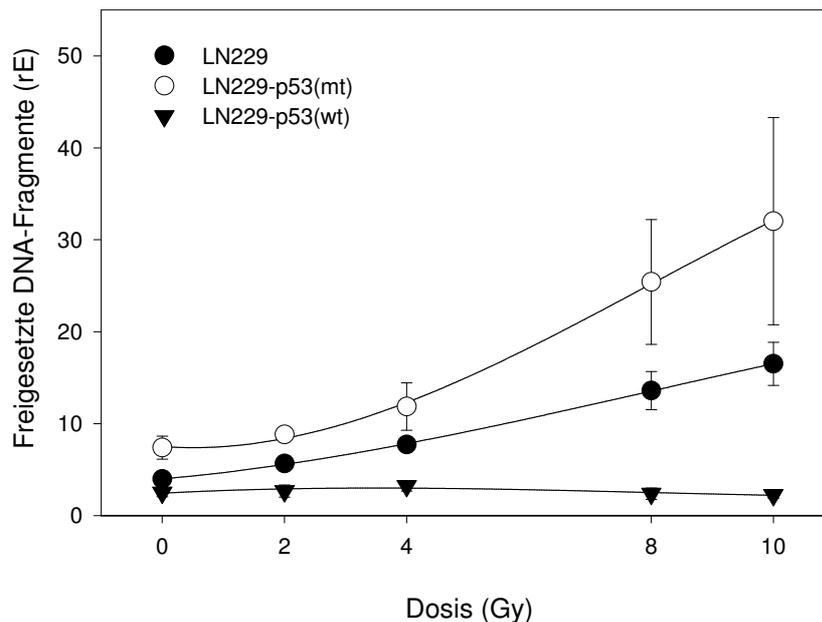
## 4.4. Strahleninduzierte Apoptose

### 4.4.1. Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis

Das Apoptoseverhalten der Zellen der verschiedenen Zelllinien (gemessen anhand der freigesetzten DNA-Fragmente mittels ELISA – Technik) wurde zunächst nach verschiedenen Strahlendosen betrachtet (Abb. 4.5). Hierzu wurden die Zellen mit 0 Gy - 10 Gy bestrahlt. Die Apoptosefrequenz wurde jeweils 0 h und 48 h p.r. bestimmt. In der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h p.r. fand sich kein Unterschied zwischen den Zelllinien und den verschiedenen Strahlendosen. Für die LN229-Zellen ergab sich 48 h p.r. eine Zunahme der Apoptosefrequenz mit steigender Strahlendosis. Fand sich in der unbestrahlten Kontrolle zu diesem Zeitpunkt ein Wert von 4,0 rE +/- 0,27, betrug dieser Wert nach Applikation von 2 Gy bereits 5,7 rE +/- 0,48. Die Apoptosefrequenz steigerte sich kontinuierlich mit steigender Dosis. Bei 10 Gy wurde schließlich ein Wert von 16,5 rE +/- 2,35 ermittelt. Das entsprach einer Zunahme gegenüber der unbestrahlten Kontrolle um den Faktor 4,1. Die Apoptosefrequenz der bestrahlten Zellen lag für alle applizierten Dosen signifikant über der unbestrahlten Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Auch bei den LN229-p53(mt)-Zellen kam es zu einer zunehmenden Induktion der Apoptose mit steigender Dosis. Ohne Bestrahlung konnte ein Wert von 7,4 rE +/- 1,25 nachgewiesen werden. Bei 2 Gy wurde ein Wert von 8,8 rE +/- 0,19 ermittelt. Bei mit steigender Dosis kontinuierlich zunehmender Apoptosefrequenz ergab sich bei 10 Gy schließlich ein Wert von 32,0 rE +/- 2,35. Dementsprechend hatte sich die Apoptose im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle um den Faktor 4,3 erhöht. Diese Zunahme konnte mit statistischen Mitteln nicht als signifikant eingestuft werden ( $p$ -Wert durchgehend  $> 0,05$ ). Wie in Abb. 4.5 zu erkennen, befand sich die Apoptosefrequenz in den LN229-p53(mt)-Zellen durchgehend auf etwa doppeltem Niveau der LN229-Zellen. Dieser Unterschied konnte statistisch als signifikant eingestuft werden ( $p = 0,05$  im paarigen t-Test).

Für LN229-p53(wt)-Zellen ließ sich kein Effekt der verschiedenen applizierten Strahlendosen auf die Apoptosefrequenz feststellen. Wie in Abb. 4.5 zu sehen, lagen die entsprechenden Werte 48 h p.r. alle in etwa auf einer annähernd waagrecht verlaufenden Linie. Die ermittelten Werte als Maß für die Apoptose bewegten sich um 2,6 rE. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ergab sich nicht.



**Abb. 4.5:** Die Graphik zeigt die Veränderung der Apoptosefrequenz nach verschiedenen Strahlendosen, gemessen anhand der freigesetzten DNA-Fragmente 48 h p.r. Verglichen wurden LN229-Zellen (schwarze Kreise) mit LN229-p53(mt)-Zellen (weiße Kreise), jeweils bei 37 °C, sowie LN229-p53(wt)-Zellen bei 32,5 °C (schwarze Dreiecke). Die Fehlerbalken beschreiben den SEM. Es wurde eine Regression 2. Ordnung durch die Werte gelegt. Man erkannte einen Anstieg der Apoptose für die LN229-Zellen mit der Dosis, sowie einen Anstieg in den LN229-p53(mt)-Zellen. In den LN229-p53(wt)-Zellen ließ sich eine erniedrigte Apoptosefrequenz relativ zu den LN229-Zellen erkennen, die durch die verschiedenen Strahlendosen nicht beeinflusst wurde.

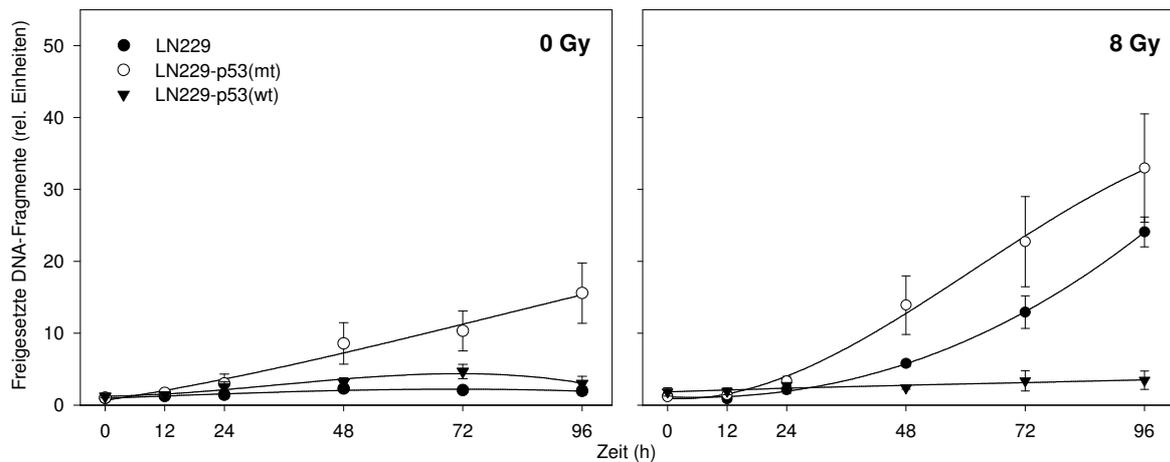
Zusammenfassend konnte eine Zunahme der Apoptosefrequenz mit der Dosis sowohl bei den LN229- als auch den LN229-p53(mt)-Zellen gezeigt werden, während eine von der Dosis unabhängige, konstant bleibende Apoptosefrequenz bei den LN229-p53(wt)-Zellen zu verzeichnen war. Diese war relativ zu den anderen beiden Zelllinien erniedrigt. Bei den LN229- und den LN229-p53(mt)-Zellen war der beobachtete Effekt gegenüber der unbestrahlten Kontrolle vergleichbar stark ausgeprägt. Die Apoptosefrequenz lag in den LN229-p53(mt)-Zellen insgesamt auf höherem Niveau als in den LN229-Zellen.

#### 4.4.2. Strahleninduzierte Apoptose im Zeitverlauf

Um die Apoptosefrequenz über die Zeit zu betrachten wurde die Apoptosefrequenz bis zu 96 h nach einer Strahlendosis von 8 Gy betrachtet (Abb. 4.6). Die Apoptosefrequenz wurde darüber hinaus nach 8 Gy Bestrahlung relativ zur unbestrahlten Kontrolle berechnet (Abb. 4.7). Für die LN229-Zellen (kultiviert bei 37 °C) zeigte sich ohne Bestrahlung keine Erhöhung der spontanen Apoptosefrequenz gegen die Zeit (Abb. 4.6). Die gefundenen

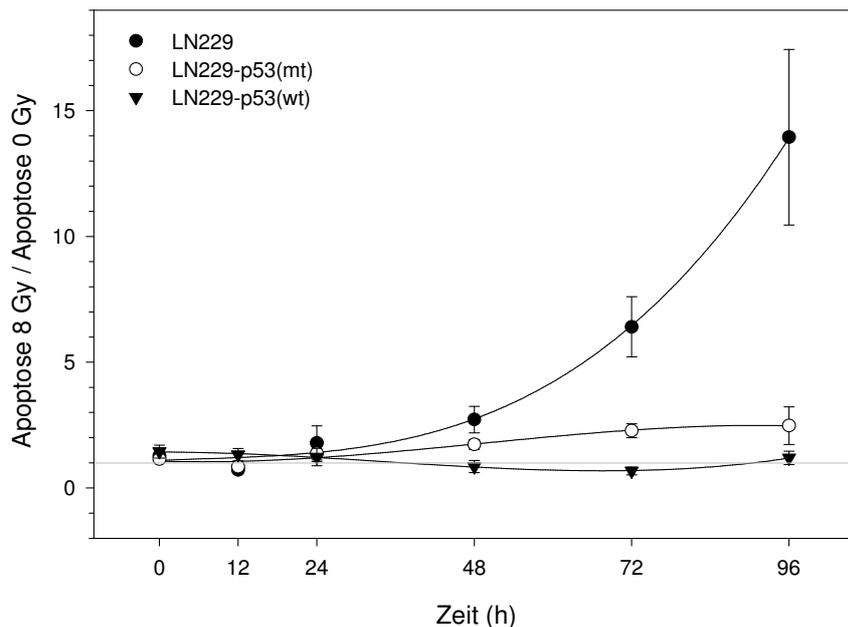
Mittelwerte unterschieden sich nur geringfügig vom Bezugswert für alle anderen Werte zum Zeitpunkt 0 h, der mit 1 rE festgelegt wurde. Der maximale Wert betrug 2,3 rE +/- 0,5. Ein statistisch relevanter Anstieg der Apoptose zwischen den einzelnen Zeitwerten erfolgte nicht. Die ermittelten p-Werte lagen immer über 0,3. Nach einer applizierten Dosis von 8 Gy stieg die Apoptosefrequenz der LN229-Zellen mit der Zeit an (Abb. 4.6). Während sich in den ersten 24 h die Apoptosefrequenz kaum gegenüber dem 0 h-Wert mit 1,3 rE +/- 0,2 veränderte, erfolgte danach ein kontinuierlicher Anstieg der Apoptosefrequenz bis zum Versuchsende bei 96 h p.r. Zu diesem Zeitpunkt konnte die Apoptose mit 24,1 rE +/- 2,1 quantifiziert werden. Die p-Werte gegen den jeweils vorangehenden Wert lagen alle im Bereich, um den Anstieg als signifikant zu betrachten ( $p < 0,04$ ). Zum Versuchsende schien der Anstieg noch nicht abgeschlossen zu sein. Betrachtete man die Quotienten, die den relativen Unterschied zwischen unbestrahlten und mit 8 Gy behandelten LN229-Zellen erfassten, so fand man auch hier eine Zunahme mit der Zeit (Abb. 4.7). Bis 24 h nach der Bestrahlung veränderten sich diese Quotienten und somit der durch die Bestrahlung bedingte Anteil der Apoptose nur in geringem Ausmaß. Der Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle betrug zum Zeitpunkt 24 h p.r. nur das 1,8 +/- 0,7-fache des Wertes der Kontrolle. Im weiteren Verlauf stieg dieser Wert immer mehr an, um bei 96 h das 13,9 +/- 3,5-fache des unbestrahlten Wertes zu erreichen. Ein signifikanter Unterschied von Zeitpunkt zu Zeitpunkt im Bereich des Anstieges konnte hier nicht immer gesichert werden.

Die LN229-p53(mt)-Zellen zeigten ohne Bestrahlung eine ansteigende, spontane Apoptosefrequenz mit der Zeit (siehe Abb. 4.6). Die Apoptose steigerte sich ohne durch Bestrahlung induziert zu sein von 1,0 rE +/- 0,0 bei 0 h kontinuierlich bis zu einem Wert von 15,6 rE +/- 4,2 zum Zeitpunkt 96 h. Das entsprach einem Unterschied um das 15,4 +/- 4,2-fache. Wegen der hohen Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert konnte ein statistischer Unterschied von Zeitpunkt zu Zeitpunkt nicht gesichert werden (p-Wert durchgehend  $> 0,07$ ). Gezeigt werden konnte aber, dass die Änderung der Apoptosefrequenz zwischen 0 h und 24 h noch nicht statistisch relevant war ( $p = 0,2$ ), während ab diesem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung bis 96 h p.r. ( $p = 0,046$ ) erfolgte.



**Abb. 4.6:** Zeitlicher Verlauf der Apoptosefrequenz nach 0 Gy und 8 Gy über 4 Tage. Links ist der Verlauf ohne Bestrahlung, rechts der nach Applikation von 8 Gy dargestellt. Die Fehlerbalken beschreiben den SEM. Es wurde eine Regression 3. Ordnung durch die Werte gelegt. Man erkannte eine spontane, mit der Zeit zunehmende Apoptose in unbestrahlten LN229-p53(mt)-Zellen (weiße Kreise), die weder in LN229- (schwarze Kreise) noch in LN229-p53(wt)-Zellen (schwarze Dreiecke) zu finden war. Nach 8 Gy nahm die Apoptose in LN229- und LN229-p53(mt)-Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle ab 48 h p.r. stetig über den gesamten Zeitverlauf stetig zu. In den LN229-p53(wt)-Zellen war keine Änderung des Apoptoseverhaltens nach 8 Gy zu erkennen.

Nach Bestrahlung mit 8 Gy zeigte sich in den LN229-p53(mt)-Zellen eine stärkere Zunahme der Apoptosefrequenz als ohne Bestrahlung. Der Anstieg im Bereich der ersten 24 h p.r. war von 1,2 rE +/- 0,2 zum Zeitpunkt der Bestrahlung auf 3,4 rE +/- 0,7 nach einem Tag gering. Er zeigte sich als nicht statistisch signifikant ( $p \geq 0,17$ ). Im weiteren Verlauf erfolgte ein steilerer Anstieg der Apoptosefrequenz. So lag der Wert nach 48 h bei 13,9 rE +/- 4,1, um nach 96 h 33,0 rE +/- 7,5 zu erreichen. Die Zunahme der Apoptosefrequenz erfolgte zwischen den einzelnen Zeitpunkten ab 48 h p.r. in signifikanter Weise ( $p \leq 0,04$ ). Aufgrund der hohen spontanen Apoptoserate fiel der relative Unterschied der Apoptosefrequenz zwischen mit 8 Gy bestrahlten gegenüber unbestrahlten Proben geringer aus als in den LN229-Zellen (Abb. 4.7). Die absolute ermittelte Apoptosefrequenz nach 8 Gy in den LN229-p53(mt)-Zellen lag aber höher als bei den LN229-Zellen (Unterschied nicht signifikant mit  $p = 0,23$  im paarigen t-Test). Beim Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle lag die Apoptosefrequenz bei den LN229-p53(mt)-Zellen nach Behandlung mit 8 Gy 24 h p.r. erst beim 1,4 +/- 0,3-fachen Wert der Kontrolle und nahm auch im weiteren Verlauf nur bis zu einem Wert des 2,5 +/- 0,7-fachen der Kontrolle bei 96 h p.r. zu.



**Abb. 4.7:** Verhältnis der Apoptosefrequenz nach 8 Gy relativ zu 0 Gy. Die Fehlerbalken beschreiben den SEM. Es wurde eine Regression 3. Ordnung durch die Werte gelegt. Der horizontale graue Strich markiert zur besseren Übersicht den Wert 1. Bei dieser Betrachtungsweise ließ sich die Zunahme der durch die Bestrahlung induzierten relativ zur spontanen Apoptosefrequenz erkennen. Für LN229-Zellen (schwarze Kreise) erkannte man deutlich die strahlenabhängige Zunahme der Apoptose bis zum 15-fachen 0 h-Wert. Im Vergleich dazu betrug die spontane Apoptosefrequenz bei den LN229-p53(mt)-Zellen nur etwa das Doppelte des Ausgangswertes. In LN229-p53(wt)-Zellen war kein Einfluß der Bestrahlung auf die Apoptosefrequenz ersichtlich.

Keine Veränderung der Apoptosefrequenz ohne und mit Bestrahlung über den gesamten Zeitverlauf ergab sich für die LN229-p53(wt)-Zellen. Zwar schwankten die durchschnittlichen Werte im Zeitverlauf ohne Bestrahlung zwischen 1,2 rE +/- 0,2 und 4,7 rE +/- 1,0. Eine gleichmäßige Zunahme war aber nicht zu erkennen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zum 0 h-Wert konnte nur für den 72 h-Wert ausgemacht werden ( $p = 0,02$ ). Der mit 4,7 rE +/- 1,0 etwas höher lag als die anderen Werte. Auch nach Bestrahlung mit 8 Gy war keine Zunahme der Apoptosefrequenz zu erkennen. Keiner der erhaltenen Mittelwerte der verschiedenen Zeitpunkte, die zwischen 1,8 rE +/- 0,6 und 3,5 rE +/- 1,3 lagen, unterschied sich signifikant vom 0 h-Wert ( $p$ -Wert durchgehend  $> 0,23$ ). Die Faktoren, um die sich die Werte für die Apoptose nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle veränderten, bewegten sich zwischen 0,7 +/- 0,2 und 1,4 +/- 0,3. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ließ sich nicht finden ( $p \geq 0,16$ ).

Zusammenfassend ergab sich, dass in den LN229-Zellen nur eine geringe spontane Apoptose im Zeitverlauf festgestellt werden konnte. Diese zeigte im Zeitverlauf keine Zunahme und blieb immer unter 3,1 rE. Nach der Bestrahlung mit 8 Gy erfolgte ab 24 h p.r. eine deutliche

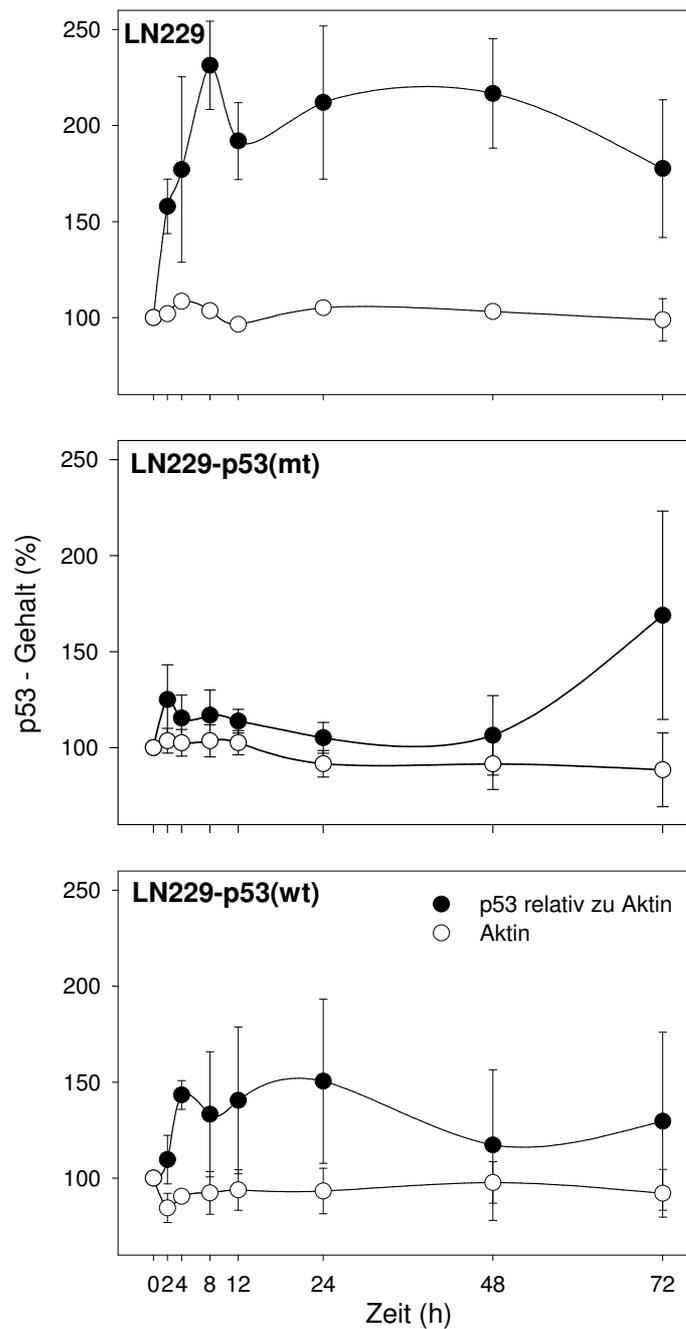
Zunahme der Apoptosefrequenz, die bis zum Versuchsende nach 96 h den 13,9-fachen Wert der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt erreichte. In den LN229-p53(mt)-Zellen stieg die spontane Apoptosefrequenz bis zum etwa 15-fachen des Ausgangswertes nach 96 h ohne Bestrahlung. Obwohl die gemessenen Werte nach 8 Gy höher waren als bei den LN229-Zellen, ergab sich deshalb eine nur geringe relative strahleninduzierte Zunahme ab 24 h p.r. im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf den 2,5-fachen Wert nach 96 h. Der Einfluss der Bestrahlung mit 8 Gy auf die Apoptosefrequenz zeigte sich also geringer ausgeprägt als in der LN229-Zelllinie. Die Apoptosefrequenz in LN229-p53(wt)-Zellen blieb über den gesamten Versuchszeitraum unverändert niedrig, sowohl bei unbestrahlten Zellen als auch bei mit 8 Gy behandelten Zellen.

#### **4.4.3. Expression Apoptose-regulierender Proteine nach Bestrahlung**

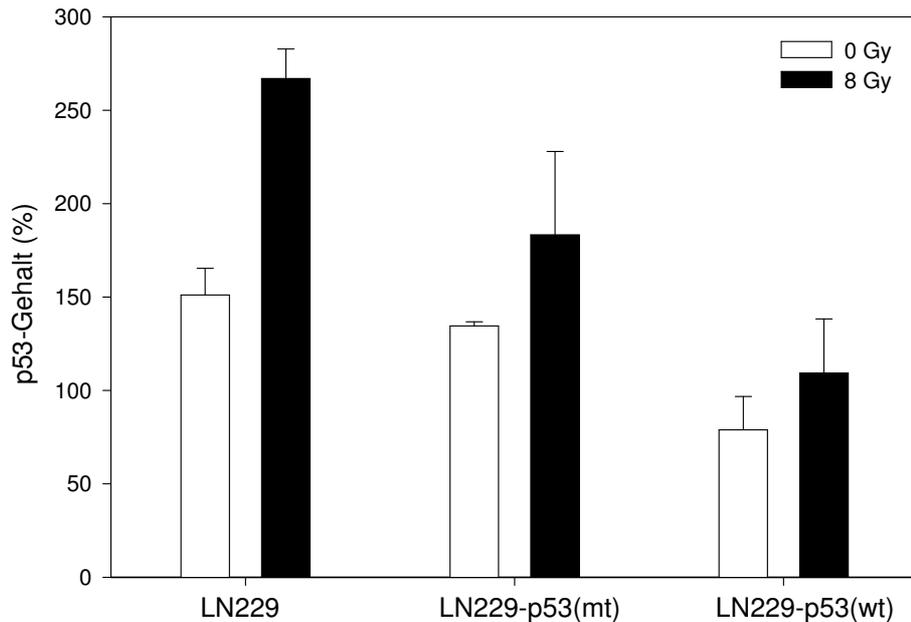
##### 4.4.3.1. Expression von p53

Bei allen Western Blot Versuchen zum Nachweis der entsprechenden Proteine wurde der Verlauf der Expression des entsprechenden Proteins nach 8 Gy Bestrahlung über einen Zeitraum von 72 h zu definierten Zeitpunkten ermittelt. Zusätzlich wurden eine unbestrahlte Probe und eine mit 8 Gy behandelte nach 24 h mit einem unbestrahlten 0 h-Wert verglichen. Der erste Versuch ist für p53 in Abb. 4.8 dargestellt, der zweite in Abb. 4.9. Durch den zweiten Versuch sollte ein alleiniger Einfluss der Zeit auf die Proteinexpression ausgeschlossen werden.

Für die LN229-Zellen im Zeitverlauf (Abb. 4.8) ergab sich eine signifikante Erhöhung der p53-Expression nach 8 Gy Bestrahlung gegenüber dem 0 h-Wert (immer auf 100 % gesetzt) bereits 2 h p.r. ( $p = 0,02$ ). Die Proteinmenge lag hier bei  $157,9 \% \pm 14,2$ . Bis 8 h p.r. erhöhte sich die p53-Menge weiter auf den Maximalwert von  $231,2 \% \pm 22,9$ , um bei 12 h auf  $191,9 \% \pm 20,0$  abzufallen. Im weiteren Verlauf veränderte sich die gefundene p53-Menge nur noch wenig und fiel erst zum Zeitpunkt 72 h p.r. wieder auf  $177,5 \% \pm 35,9$  ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Werten bestand nicht ( $p \geq 0,44$ ). Beim Vergleich einer unbestrahlten Kontrolle mit einer Probe, die mit 8 Gy behandelt worden war (siehe Abb. 4.9), zeigte sich, dass die p53-Menge ohne Bestrahlung für die LN229-Zellen nach 24 h mit  $151,1 \% \pm 14,3$  über dem 0 h - Wert lag. Der Wert der mit 8 Gy bestrahlten Probe betrug  $267,0 \% \pm 15,9$  und somit etwa das 1,8-fache der unbehandelten Kontrolle zu diesem Zeitpunkt ( $p = 0,005$ ) (Abb. 4.9).



**Abb. 4.8:** Übersicht über den Verlauf der p53-Expression nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die weißen Kreise zeigen als Zusatzinformation die durchschnittliche Menge an Aktin in den Proben, die immer etwa bei 100 % lag, was einer gleich bleibend großen Menge an aufgetragenem Protein entsprach. Die schwarzen Kreise zeigen den Verlauf des Gehalts an p53. Diese Werte wurden jeweils relativ zur Aktinmenge berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Für die LN229-Zellen zeigte sich ein Anstieg bis zum Zeitpunkt 8 h auf etwa die doppelte Menge des Ausgangswertes, dieser Wert blieb dann bis zum Versuchsende konstant. Bei den LN229-p53(mt)-Zellen war eine Zunahme des Proteins erst zum Zeitpunkt 72 h p.r. erkennbar. Bei den LN229-p53(wt)-Zellen sah man einen ähnlichen Verlauf wie bei den LN229-Zellen. Der Anstieg erfolgte allerdings in geringerem Ausmaß.



**Abb. 4.9:** p53-Expression nach 0 Gy (weiße Balken) und 8 Gy (schwarze Balken) 24 h p.r. in den verschiedenen Zelllinien. Die Werte beziehen sich jeweils auf eine unbestrahlte Probe zum Zeitpunkt 0 h, die mit 100 % Proteingehalt festgelegt wurde und hier nicht dargestellt ist. Eine strahleninduzierte Zunahme von p53 ergab sich in den LN229-Zellen. Der Anstieg bei den LN229-p53(mt)-Zellen war nicht signifikant. Keine Veränderung ergab sich bei den LN229-p53(wt)-Zellen.

Keine Veränderung im Zeitverlauf (Abb. 4.8) bis 48 h ergab sich bei den LN229-p53(mt)-Zellen. Die gefundenen Zeitwerte aus drei unabhängigen Versuchen erreichten bis 48 h p.r. maximal 125,1 % +/- 18,1. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p \geq 0,1$ ). Der Minimalwert lag mit 105,2 % +/- 8,0 bei 24 h p.r. Ein nicht signifikanter Anstieg erfolgte zum Zeitpunkt 72 h p.r. mit 169,0 % +/- 54,2 ( $p = 0,34$ ). Beim Vergleich 24 h p.r. (Abb. 4.9) war mit einem p53-Wert von 134,5 % +/- 2,3 ohne Bestrahlung und 183,3 % +/- 44,7 nach 8 Gy ein nicht signifikanter Anstieg um etwa den Faktor 1,4 zu verzeichnen ( $p = 0,34$ ).

Für die LN229-p53(wt)-Zellen zeigte sich eine leichte Zunahme des p53 nach 8 Gy Bestrahlung im Zeitverlauf (Abb. 4.8). Nach 4 h lag der Wert mit 143,3 % +/- 7,5 auf erhöhtem Niveau, nahm bei 8 h leicht ab (133,3 % +/- 32,6), um im weiteren Verlauf wieder zuzunehmen und bei 24 h p.r. einen maximalen Wert von 150,5 % +/- 42,7 zu erreichen. Zu den späteren Zeitpunkten fanden sich hingegen wieder niedrigere Werte für den p53-Gehalt. Im Zeitverlauf hatte sich die Menge an p53 in den LN229-p53(wt)-Zellen also bis zum maximal 1,5-fachen des Ausgangswertes gesteigert. Die Zunahme des Proteins war nicht signifikant ( $p \geq 0,08$ ). Beim Vergleich der mit 8 Gy bestrahlten Proben mit einer unbestrahlten, zeitlich korrespondierenden Kontrolle ergab sich ein geringer Unterschied 24 h p.r. (Abb. 4.9). Der Wert der Kontrolle lag nach 24 h bei 78,9 % +/- 17,9, so dass sich die

bestrahlte Kontrolle mit 109,4 % +/- 28,9 weder von dieser noch von der 0 h-Kontrolle (festgelegt mit 100 %) signifikant unterschied ( $p \geq 0,3$ ).

Zusammenfassend ergab sich bei den LN229-Zellen nach 8 Gy Bestrahlung eine Zunahme des Gehaltes an p53, der 8 h p.r. mit dem 2,3-fachen des Ausgangswertes seinen Maximalwert erreichte. Im Weiteren verblieb der Gehalt an p53 bis zum Versuchsende bei 72 h auf mindestens 1,7-fachem Niveau des Ausgangswertes. Es ist davon auszugehen, dass diese Zunahme abhängig von der applizierten Dosis von 8 Gy erfolgte. Dagegen konnte in den LN229-p53(mt)-Zellen zunächst keine Zunahme des Proteins nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Erst 72 h p.r. konnte ein nicht signifikanter Anstieg auf 1,7-faches Ausgangsniveau gesehen werden. Beim Vergleich mit einer unbestrahlten Kontrolle 24 h p.r konnte ein nicht signifikanter, durch die Bestrahlung bedingter Anstieg von p53 um etwa den Faktor 1,4 nachgewiesen werden. In der LN229-p53(wt)-Zelllinie erfolgte im Zeitverlauf nach 8 Gy Bestrahlung eine Zunahme von p53 auf den maximal 1,5-fachen Ausgangswert 24 h p.r. Eine Zunahme des Proteins 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy gegenüber einer unbestrahlten Kontrolle ließ sich nicht zeigen.

#### 4.4.3.2. Expression von Bax

Bei der Untersuchung der Expression von Bax wurde der gleiche Versuchsablauf gewählt wie bei der Untersuchung von p53. Einen Überblick über die Ergebnisse bieten Abb. 4.11 und Abb. 4.12.

Für die LN229-Zellen ergab sich im Zeitverlauf (Abb. 4.10) eine Zunahme von Bax nach 8 Gy bereits zum Zeitpunkt 2 h p.r. Mit einem Wert von 182,3 % +/- 9,5 unterschied er sich bereits signifikant vom 0 h-Wert ( $p = 0,001$ ). Bis 4 h p.r. erfolgte ein weiterer Anstieg auf 348,2 % +/- 68,2. Nicht signifikant niedriger lag der Bax-Gehalt bei 8 h p.r mit 257,0 % +/- 43,0 ( $p = 0,32$ ). Im weiteren Verlauf stieg die Menge an Bax der Zellen bis zum letzten ermittelten Wert nach 72 h kontinuierlich auf schließlich 899,6 % +/- 156,12 an. Bis zum Versuchsende erfolgte also ein Anstieg auf den 8,9-fachen Ausgangswert. Eine signifikante Zunahme von Zeitpunkt zu Zeitpunkt konnte nicht gezeigt werden. Gegenüber dem 0 h-Wert zeigten sich aber alle anderen Werte signifikant erhöht ( $p \leq 0,02$ ). Beim Vergleich der unbestrahlten mit der mit 8 Gy behandelten Probe nach 24 h (Abb. 4.11) ergab sich eine Erhöhung von Bax nach Bestrahlung. War bereits die unbestrahlte Kontrolle nach einem Tag gegenüber der Kontrolle (festgelegt als 100 % Bezugswert) mit 138,0 % +/- 93,43 erhöht, lag

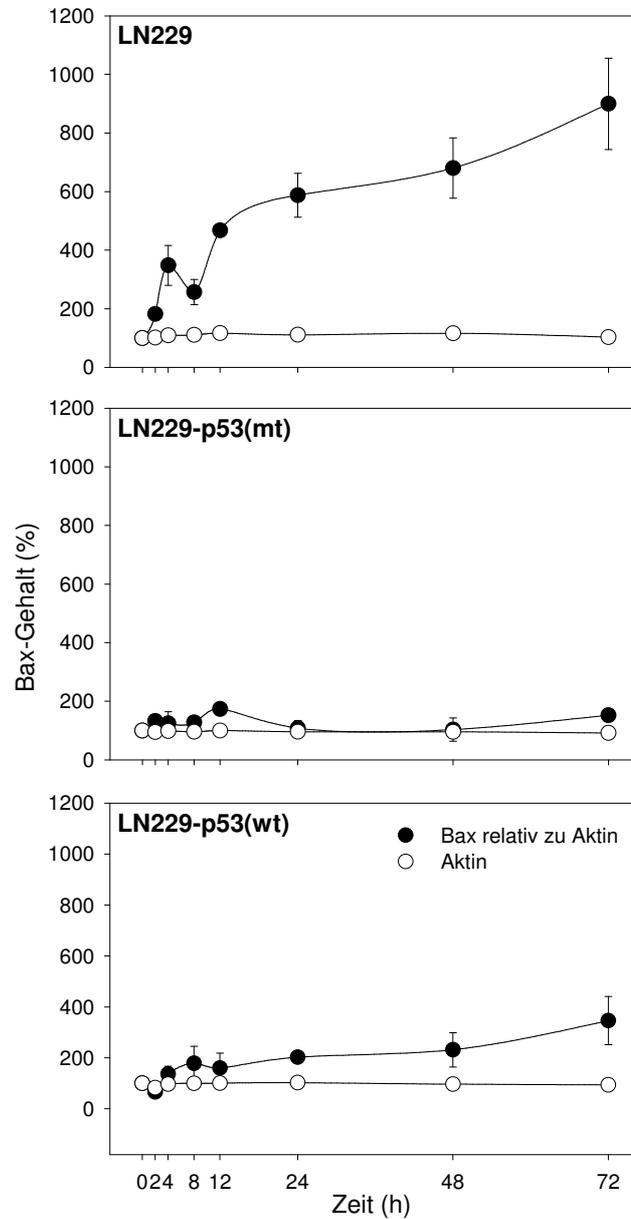
die bestrahlte Probe mit 293,4 % +/- 95,24 um das 2,1-fache darüber ( $p \geq 0,11$  in allen Fällen).

Bei den LN229-p53(mt)-Zellen zeigte sich nur ein geringer Anstieg von Bax im Zeitverlauf (Abb. 4.10). Eine leichte Zunahme war 2 h nach Bestrahlung auf einen Wert von 132,2 % +/- 12,4 zu erkennen. Im weiteren Verlauf fanden sich zwei Spitzen der Bax-Menge der Zellen. Bei 12 h fand sich ein Wert von 173,7 % +/- 15,5, danach fiel Bax wieder auf die ursprünglich enthaltene Menge ab. Bei 72 h zeigte sich ein weiterer Anstieg auf 152,1 % +/- 14,1. Diese beiden Maximalwerte zeigten sich als einzige signifikant verschieden vom 0 h-Wert ( $p = 0,009$  bzw.  $p = 0,02$ ). Im Vergleich unbestrahlte Probe vs. 8 Gy 24 h p.r. (Abb. 4.11) ergab sich ein Wert von 145,8 % +/- 68,02 24 h nach Versuchsbeginn für die unbestrahlte Kontrolle. Somit zeigte sich eine leichte Erhöhung gegenüber der Kontrolle (0 h unbestrahlt). Die Menge an Bax lag mit einem Wert von 126,5 % +/- 61,1 in den bestrahlten Proben nach 24 h sogar niedriger. Statistisch ließ sich aber weder ein Unterschied zum 0 h-Wert ( $p = 0,7$ ) noch zum 24 h-Wert ( $p = 0,8$ ) der unbestrahlten Kontrolle ausmachen. In den LN229-p53(mt)-Zellen nahm Bax somit zeitabhängig zu, eine Veränderung durch Bestrahlung mit 8 Gy konnte nicht gezeigt werden.

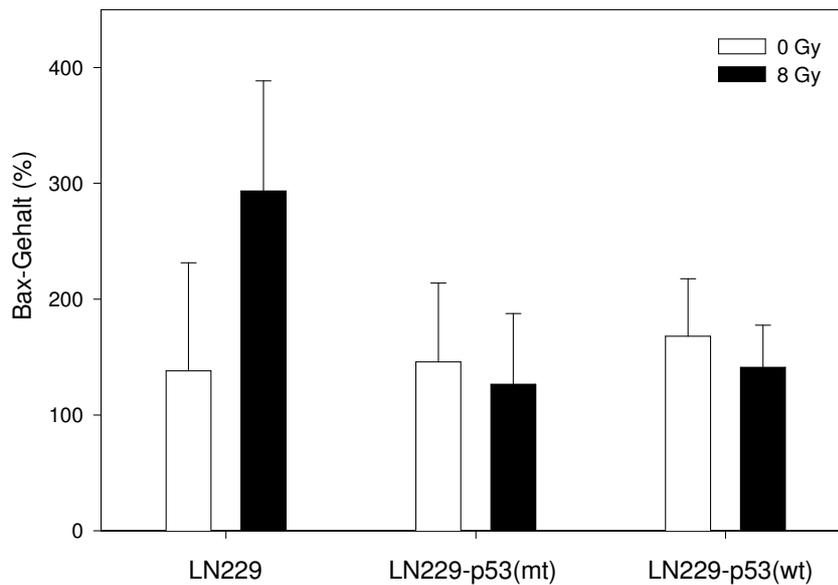
In den LN229-p53(wt)-Zellen zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg über die Zeit nach Bestrahlung mit 8 Gy (Abb. 4.10). Nach 72 h lag der ermittelte Wert bei 345,9 % +/- 94,6. Das entsprach einer nicht signifikanten Zunahme gegenüber dem Ausgangswert um den Faktor 3,5 ( $p \geq 0,06$ ). Beim Vergleich der unbestrahlten Kontrolle und der nach Applikation von 8 Gy nach 24 h (Abb. 4.11) ergab sich keine strahleninduzierte Zunahme von Bax. Nach 24 h lag diese mit 141,1 % +/- 36,4 etwas niedriger als die Kontrolle, die sich zu diesem Zeitpunkt mit 167,9 % +/- 49,6 ergab. Ein signifikanter Unterschied dieser Werte war nicht zu bestätigen ( $p = 0,32$ ). Beide Werte hatten sich statistisch gesehen auch nicht gegenüber dem Wert der Kontrolle bei 0 h verändert ( $p = 0,3$  bzw.  $p = 0,2$ ).

Zusammenfassend ergab sich bei der untransfizierten Zelllinie im Zeitverlauf über 72 h nach 8 Gy Bestrahlung eine Zunahme von Bax auf das 8,9-fache des Ausgangswertes. 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy lag der Wert im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle 2,1-fach höher. Bei den LN229-p53(mt)-Zellen konnte kein kontinuierlicher Anstieg mit der Zeit nach 8 Gy Bestrahlung festgestellt werden. Eine strahleninduzierte Veränderung des Proteins 24 h p.r. mit 8 Gy gegenüber einer unbestrahlten Kontrolle zeigte sich nicht. In der LN229-p53(wt)-Zelllinie nahm Bax kontinuierlich über den Zeitraum von 72 h nach Applikation von 8 Gy auf das 3,1-fache des ursprünglichen Wertes zu. Eine strahleninduzierte Zunahme konnte beim

Vergleich zwischen unbestrahlter Kontrolle und mit 8 Gy behandelter Probe nach 24 h nicht festgestellt werden.



**Abb. 4.10:** Übersicht über den Verlauf der Bax-Expression nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die weißen Kreise zeigen als Zusatzinformation die durchschnittliche Menge an Aktin in den Proben, die immer etwa bei 100 % lag, was einer gleich bleibend großen Menge an aufgetragenem Protein entspricht. Die schwarzen Kreise zeigen den Verlauf des Gehalts an Bax. Diese Werte wurden jeweils relativ zur Aktinmenge berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. In den LN229-Zellen stieg die ermittelte Menge an Bax bis zum Versuchsende kontinuierlich an. In den LN229-p53(mt)-Zellen erhöhte sie sich nicht. In den LN229-p53(wt)-Zellen ergab sich ein leichter Anstieg von Bax im Versuchszeitraum.

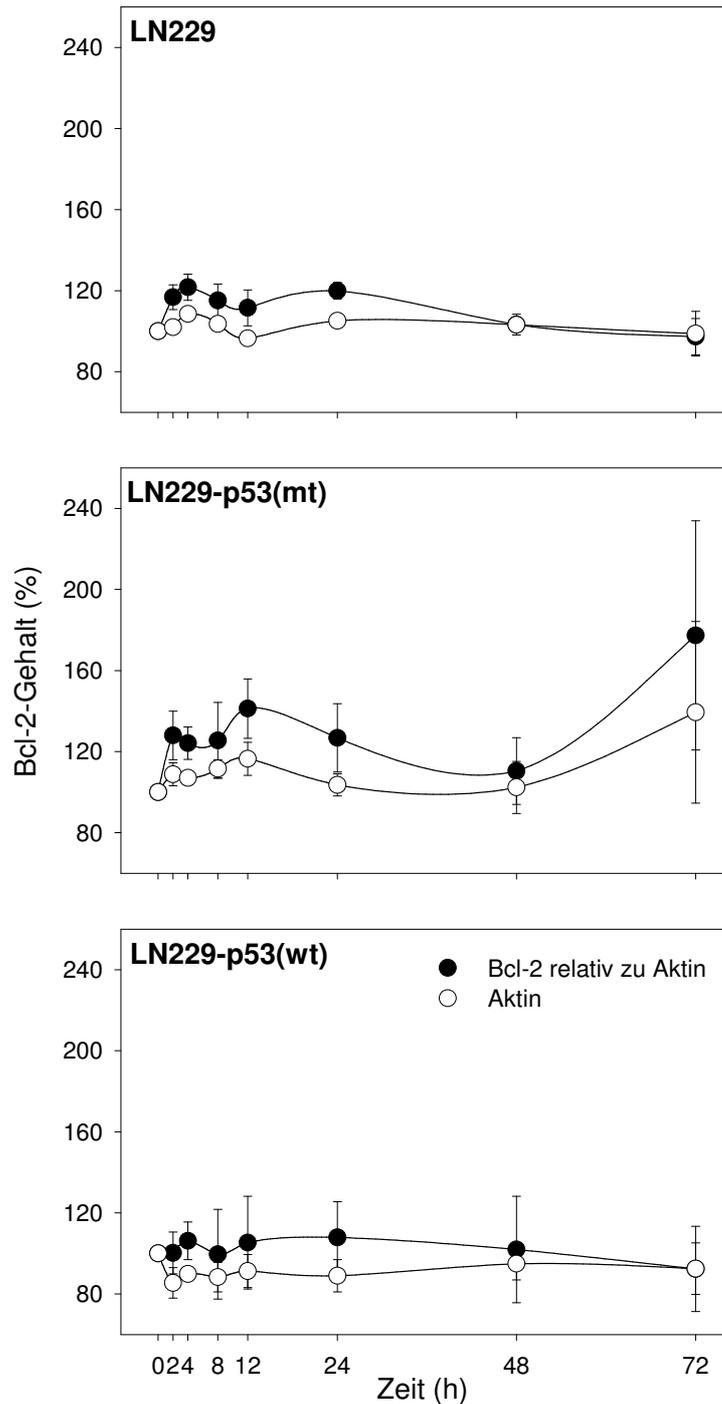


**Abb. 4.11:** Bax-Expression nach 0 Gy (weiße Balken) und 8 Gy (schwarze Balken) 24 h p.r.. Die Werte beziehen sich jeweils auf eine unbestrahlte Probe zum Zeitpunkt 0 h, die mit 100 % Proteingehalt festgelegt wurde und hier nicht dargestellt ist. Eine strahlenbedingte Erhöhung gegenüber der unbehandelten Probe der Proteinmenge war nur bei den LN229-Zellen erkennbar. In den anderen beiden Fällen war der Proteingehalt nach Bestrahlung nicht signifikant erniedrigt.

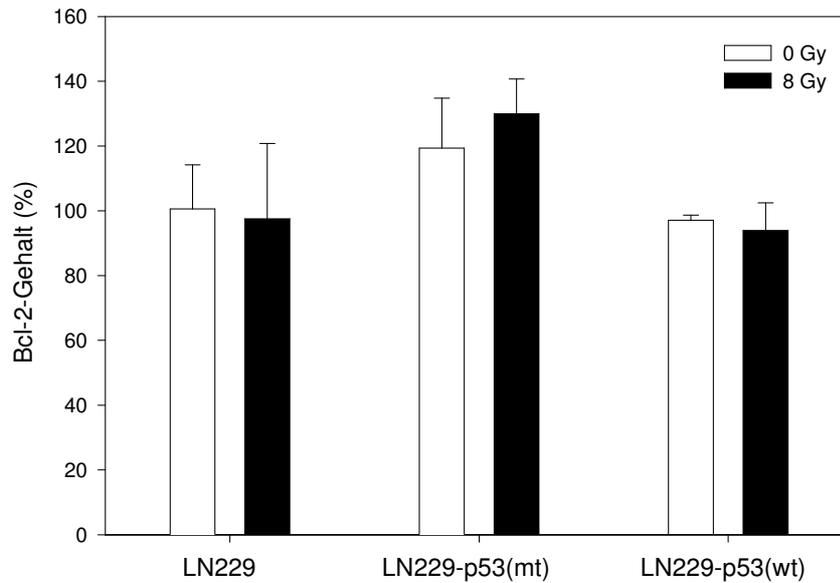
#### 4.4.3.3. Expression von Bcl-2

Auch bei der Untersuchung von Bcl-2 wurde einmal der Verlauf der Expression in den verschiedenen Zelllinien über 72 h nach Exposition mit 8 Gy bestimmt (Abb. 4.12), sowie ein Vergleich zwischen unbestrahlter Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h und 24 h mit einer entsprechend bestrahlten Probe 24 h p.r. (Abb.4.13) durchgeführt.

Bei den LN229-Zellen bewegten sich die ermittelten Werte für die Bcl-2-Menge im Verlauf über 72 h (Abb. 4.12) nach 8 Gy Bestrahlung zwischen einem Maximalwert von 121,7 % +/- 6,5 4 h p.r und einem Minimalwert von 97,3 % +/- 9,0 gemessen 72 h p.r. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Der Anteil von Bcl-2 in den LN229-Zellen über 72 h nach Bestrahlung mit 8 Gy veränderte sich somit nicht. Beim Vergleich der mit 8 Gy bestrahlten mit der unbestrahlten Probe nach 24 h ergab sich kein Unterschied (Abb. 4.13). Mit 100,6 % +/- 13,6 für die nicht exponierte Probe 24 h p.r. und 97,5 % +/- 23,3 bei der mit 8 Gy behandelten zum gleichen Zeitpunkt. ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben ( $p = 0,31$ ). Eine Veränderung gegenüber der unbestrahlten 0 h-Kontrolle war ebenfalls nicht ersichtlich ( $p \geq 0,11$ ). Die Menge an Bcl-2 veränderte sich in den LN229-Zellen unter keiner der betrachteten Voraussetzungen.



**Abb. 4.12:** Übersicht über den Verlauf der Bcl-2-Expression nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die weißen Kreise zeigen als Zusatzinformation die durchschnittliche Menge an Aktin in den Proben, die durchgehend bei 100 % lag, was einer gleich bleibend großen Menge an aufgetragenem Protein entspricht. Die schwarzen Kreise zeigen den Verlauf des Gehalts an Bcl-2. Diese Werte wurden jeweils relativ zur Aktinmenge berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Für alle drei Zelllinien zeigte sich über den betrachteten Zeitraum keine signifikante Veränderung des Gehalts an Bcl-2 nach Bestrahlung mit 8 Gy.



**Abb. 4.13:** Bcl-2-Expression nach 0 Gy (weiße Balken) und 8 Gy (schwarze Balken) 24 h p.r. Die Werte beziehen sich jeweils auf eine unbestrahlte Probe zum Zeitpunkt 0 h, die mit 100 % Proteingehalt festgelegt wurde und hier nicht dargestellt ist. Ein relevanter Unterschied der mit 8 Gy bestrahlter Probe im Vergleich zur Kontrolle war in keiner der Zelllinien ersichtlich.

Bei den LN229-p53(mt)-Zellen lag der gefundene Maximalwert im Verlauf über 72 h (Abb. 4.12) nach 8 Gy Bestrahlung bei 177,3 % +/- 56,6. Dieser Wert hob sich nicht signifikant vom 0 h-Wert ab ( $p = 0,24$ ). Der kleinste ermittelte Wert ergab sich für 48 h p.r mit 110,4 % +/- 16,4. Die anderen Werte zwischen diesen Extremwerten lagen im Bereich des Ausgangswertes bei 0 h und unterschieden sich statistisch nicht von diesem ( $p \geq 0,08$ ). Bcl-2 war in dieser Zelllinie zum Versuchsende bei 72 h nicht signifikant erhöht gegenüber dem Ausgangswert. Beim Vergleich der unbestrahlten Kontrolle mit der mit 8 Gy behandelten Probe nach 24 h (Abb. 4.13) ergab sich für die exponierten Proben ein Wert von 129,9 % +/- 10,7, der sich nicht signifikant von der Kontrolle mit 119,3 % +/- 15,4 unterschied ( $p = 0,6$ ). Keiner der beiden Fälle zeigte eine signifikante Veränderung gegenüber dem unbestrahlten 0 h-Wert ( $p = 0,06$  bzw.  $p = 0,28$ ). Der Bcl-2-Gehalt war also mit und ohne Applikation von 8 Gy immer gleich hoch.

In der LN229-p53(wt)-Zelllinie war über den Zeitverlauf (Abb. 4.12) keine Veränderung der Menge an Bcl-2 ersichtlich. Die Werte betragen maximal 107,9 % +/- 17,6 und minimal 92,3 % +/- 26,2. Diese beiden Extrema unterschieden sich genau wie alle anderen für die zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelten Werte nicht signifikant vom Gehalt an Bcl-2 in den Proben unmittelbar zu Versuchsbeginn ( $p$ -Wert immer  $\geq 0,54$ ). Die Unterschiede lagen in der Schwankungsbreite des Verfahrens. Auch beim Vergleich nach 24 h (Abb. 4.13) zeigte sich

die Menge des Proteins nicht verändert. Der mit 8 Gy behandelte Wert lag mit 93,9 % +/- 8,6 in gleicher Höhe wie der nicht bestrahlte mit 97,1 % +/- 1,6 ( $p = 0,7$ ). Entsprechend fand sich für beide Fälle auch keine Veränderung gegenüber dem Ausgangswert bei 0 h ( $p = 0,52$  bzw.  $p = 0,14$ ).

Es ergab sich also in keiner der drei Zelllinien eine Zunahme der Menge an Bcl-2 nach 8 Gy Bestrahlung gegenüber der unbestrahlten Kontrolle 24 h p.r. Eine Veränderung des Proteins konnte in LN229- und LN229-p53(wt)-Zellen im Verlauf über 72 h nach Bestrahlung nicht festgestellt werden. Bei den LN229-p53(mt)-Zellen zeigte sich hierbei eine nicht signifikante Zunahme des Proteins, allerdings erst 72 h p.r. und lediglich um den 1,7-fachen Ausgangswert.

#### 4.4.4. Caspaseaktivität

Eine Übersicht über die Ergebnisse bei den untersuchten Zelllinien gibt Abb. 4.14.

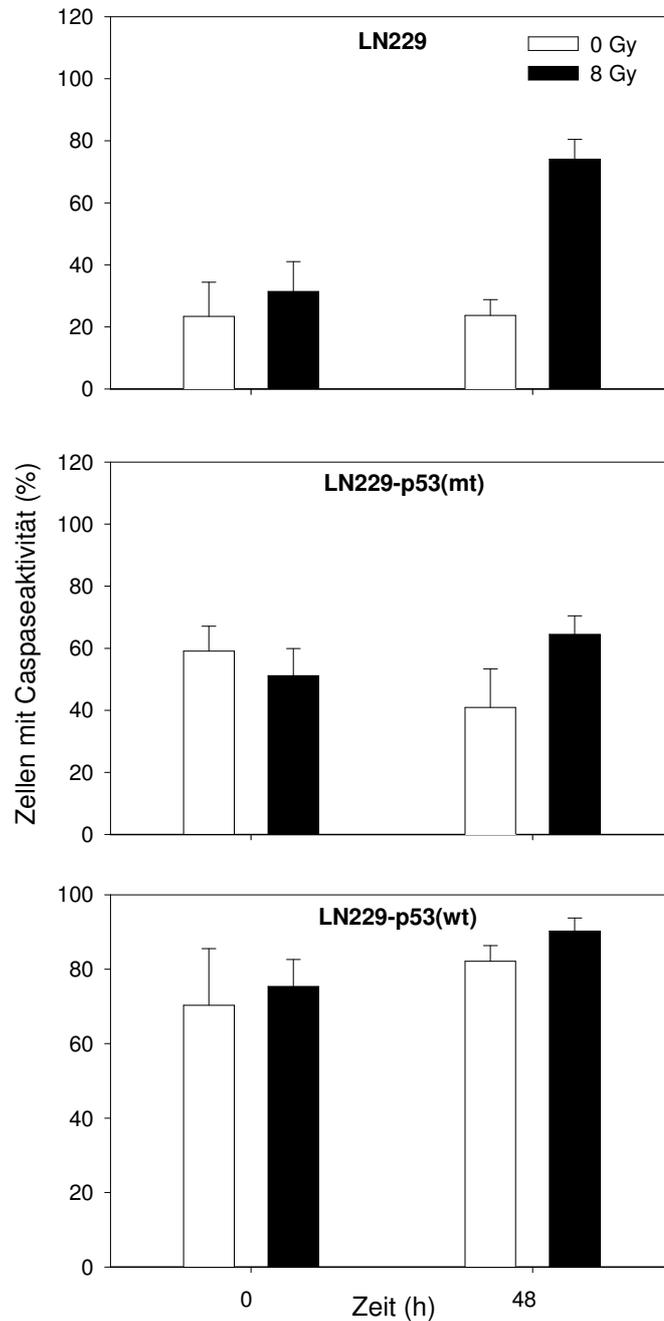
Für LN229-Zellen ergab sich hinsichtlich des prozentualen Anteils von Zellen, der als Caspase-positiv bewertet wurden, eine deutliche Zunahme nach Bestrahlung mit 8 Gy nach 48 h. Die Anteile dieser Zellen zum Zeitpunkt 0 h waren für mit 8 Gy bestrahlte und unbestrahlte Proben gleich hoch (23,4 % +/- 11,01 ohne Bestrahlung und 23,7 +/- 5,05 % nach 8 Gy). Auch die unbestrahlte Kontrolle nach 48 h unterschied sich nicht signifikant von diesen Werten (31,4 % +/- 9,63,  $p \geq 0,61$ ). Der Anteil Caspase-positiver Zellen lag in der mit 8 Gy behandelten Probe der nach 48 h mit 74,0 % +/- 6,41 deutlich höher als in den anderen Proben ( $p \leq 0,02$ ). Der Anteil Caspase-positiven Zellen war 48 h p.r. somit etwa 3,1-fach erhöht gegenüber den nicht bestrahlten Proben der LN229-Zellen zu diesem Zeitpunkt.

Bei den LN229-p53(mt)-Zellen unterschieden sich die Werte zum Zeitpunkt 0 h (59,1 % +/- 8,0 ohne Bestrahlung und 41,0 % +/- 12,4 nach 8 Gy) nicht signifikant voneinander ( $p = 0,29$ ). Auch die Werte nach 48 h lagen ähnlich hoch (51,2 % +/- 8,7 ohne Bestrahlung und 64,5 % +/- 10,3 nach 8 Gy). Nach 48 h unterschieden sich unbestrahlte und bestrahlte Probe nicht signifikant voneinander.

In der transfizierten Zelllinie bei 32,5 °C, also bei den LN229-p53(wt)-Zellen, bewegten sich die Werte mit und ohne Bestrahlung von 8 Gy sowohl unmittelbar nach der Bestrahlung als auch 48 h später auf etwa gleich hohem Niveau. 0 h-Wert und 48 h-Wert lagen sowohl ohne Bestrahlung (70,3 % +/- 15,2 0 h p.r. und 75,4 % +/- 7,3 48 h p.r.) als auch nach 8 Gy (82,2 % +/- 4,2 0 h p.r. und 90,2 % +/- 3,5 48 h p.r.) jeweils ungefähr gleich hoch. Die Werte unterschieden sich somit alle nicht signifikant voneinander. Eine strahlenabhängige Zunahme

des Anteils Caspase-positiver ergab sich folglich bei diesen Zellen nicht. Es fiel auf, dass der Anteil Caspase-positiver Zellen mit durchgehend über 70 % sehr hoch war.

Zusammenfassend konnte ein signifikanter Anstieg der Zellen mit Caspaseaktivität nach Behandlung mit 8 Gy 48 h nach der Bestrahlung nur in den untransfizierten LN229-Zellen gefunden werden. Bei den LN229-p53(mt)-Zellen war kein solcher strahleninduzierter Anstieg zu erkennen. Bei der transfizierten Zelllinie bei 32,5 °C, entsprechend dem p53 des Vektors in wt-Konfiguration, ergab sich kein Einfluss der Bestrahlung nach 48 h. Die Aktivität der Caspasen lag in diesen Zellen im Vergleich mit den anderen Zelllinien aber insgesamt deutlich höher.



**Abb. 4.14:** Darstellung des Zellanteils, der hinsichtlich des Gehalts an aktiven Caspasen als positiv gewertet wurde ohne Bestrahlung und nach 8 Gy 0 h und 48 h p.r. Eine signifikante strahleninduzierte Zunahme sah man bei den LN229-Zellen, wohingegen in LN229-p53(mt)- und den LN229-p53(wt)-Zellen kein statistisch relevanter Unterschied zwischen Kontrolle und bestrahlten Proben festzustellen war. Man sieht, dass der Anteil Caspase-positiver Zellen bei LN229-p53(wt)-Zellen insgesamt am größten war.

## 4.5. Beeinflussung des Zellzykluses durch Bestrahlung

### 4.5.1. Expression von p21

Im folgendem sind nur Ausführungen für LN229- und LN229p53(wt)-Zellen gemacht, da das Protein in LN229p53(mt)-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Auch hier wurde wie bereits bei den anderen Western Blot Versuchen einmal der Verlauf über den Zeitraum von 72 h nach 8 Gy Bestrahlung betrachtet. Außerdem wurde in einem gesonderten Versuch der Vergleich zwischen einer mit 8 Gy bestrahlten Probe mit einer unbestrahlten Kontrolle zum Zeitpunkt 24 h p.r. sowie mit der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h betrachtet. Bei der Betrachtung der einzelnen Versuche zum Zeitverlauf fiel nach der Auswertung auf, dass der erste Versuch deutlich von den anderen beiden abwich (Abb. 4.15). Da es aus zeitlichen und materialtechnischen Gründen nicht möglich war, den Versuch nochmals durchzuführen, wurde der Mittelwert nur aus den beiden anderen Versuchen berechnet. Den Verlauf dieser Mittelwerte der Zelllinien zeigen Abb. 4.15 und 4.16.

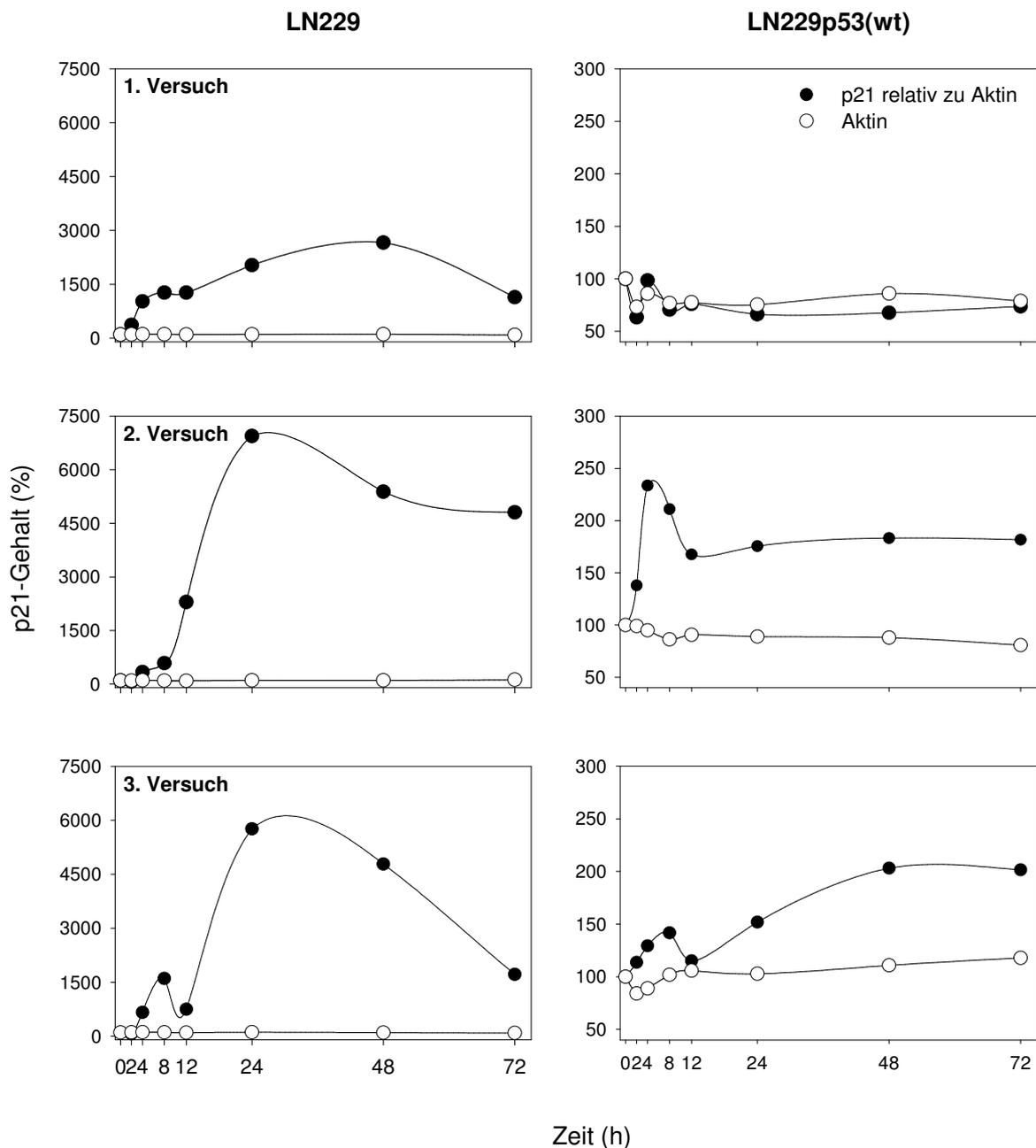
Bei den LN229-Zellen zeigte sich eine Erhöhung des p21-Gehaltes bei 4 h p.r. auf 500,4 % +/- 161,4. Es erfolgte nun ein kontinuierlicher Anstieg des Wertes auf 6.351,3 +/- 589,0 % 24 h nach der Bestrahlung. Gegenüber dem Zeitpunkt 0 h lag der Wert bei 24 h also etwa 63-mal höher ( $p = 0,03$ ). Im weiteren Verlauf nahm die Menge an p21 wieder leicht ab, um nach 72 h 3.261,0 % +/- 1.545,2 zu betragen. Beim Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle 24 h p.r. zeigte sich ein deutlicher Strahleneffekt auf die Expression von p21 (Abb. 4.17). Bereits in der Kontrolle hatte nach 24 h die Menge an p21 deutlich auf 308,6 % +/- 60,7 zugenommen. Der Wert der mit 8 Gy behandelten Proben lag mit 7.275,8 % +/- 2.254,6 aber signifikant über diesem Wert ( $p = 0,04$ ).

Bei den LN229-p53(wt)-Zellen zeigte sich im Zeitverlauf nach Bestrahlung mit 8 Gy kein signifikanter Anstieg der p21-Proteinmenge (Abb. 4.16). Unmittelbar nach der Bestrahlung stieg die p21-Menge in den Zellen bis zu einem Wert von 181,3 % +/- 52,1 nach 4 h an und sank anschließend ab auf 141,4 % +/- 26,3 nach 12 h. Bis zum Versuchsende nach 72 h erfolgte wieder ein leichter Anstieg der Menge des Proteins auf 191,6 % +/- 10,0. Da die Unterschiede aber relativ gering waren, war dieser Anstieg auf das 1,9-fache des Ausgangswertes nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied zum 0 h-Wert konnte lediglich für die letzten drei Zeitpunkte gezeigt werden ( $p \leq 0,03$ ). Beim Vergleich zwischen bestrahlter Probe und Kontrolle 24 h p.r. (Abb. 4.17) zeigte sich bei den LN229-p53(wt)-

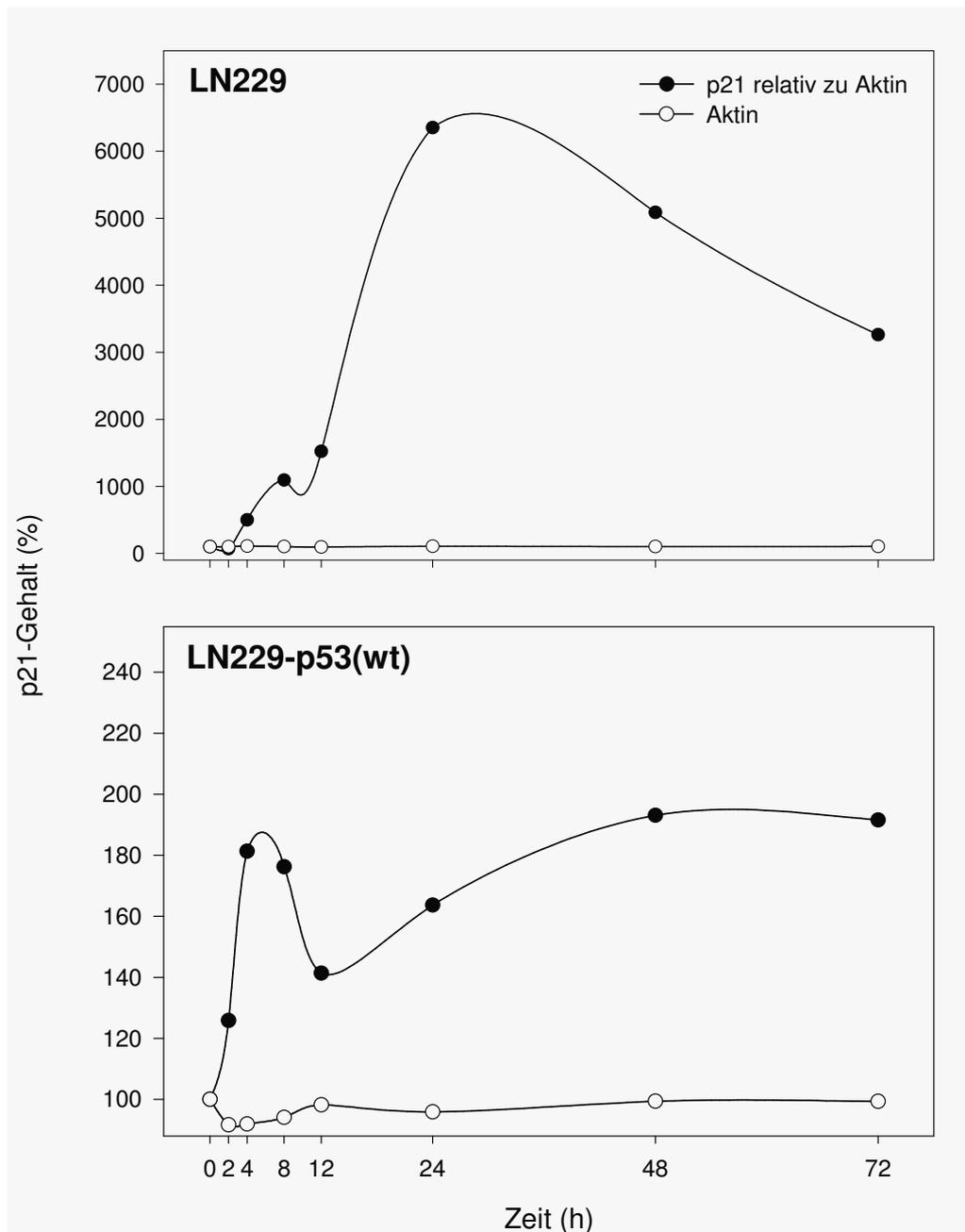
Zellen kein Bestrahlungseffekt. Nach 24 h erhielt man ohne Bestrahlung einen Wert von 114,7 % +/- 9,2, von dem sich der mit 8 Gy behandelte mit 134,1 % +/- 13,8 nicht unterschied ( $p = 0,31$ ). Beide Werte hatten sich nicht gegenüber der Kontrolle bei 0 h erhöht ( $p = 0,19$  und  $p = 0,07$ ).

Bei den LN229-Zellen konnte also ein Anstieg des p21-Proteins im Zeitverlauf über 72 h nach 8 Gy Bestrahlung beobachtet werden. Das Maximum wurde 24 h p.r. mit dem etwa 63,0-fachen Ausgangswert erreicht. Danach erfolgte eine langsame Abnahme bis zum Versuchsende. 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war ein deutlicher Strahlungseffekt erkennbar. Bei den LN229-p53(wt)-Zellen war kein eindeutiger Anstieg des Proteins im Zeitverlauf zu beobachten. Nach 24 h war keine spontane Erhöhung der p21-Menge in der unbestrahlten Kontrolle zu finden, und auch die Bestrahlung mit 8 Gy veränderte die Menge des Proteins 24 h p.r. nicht.

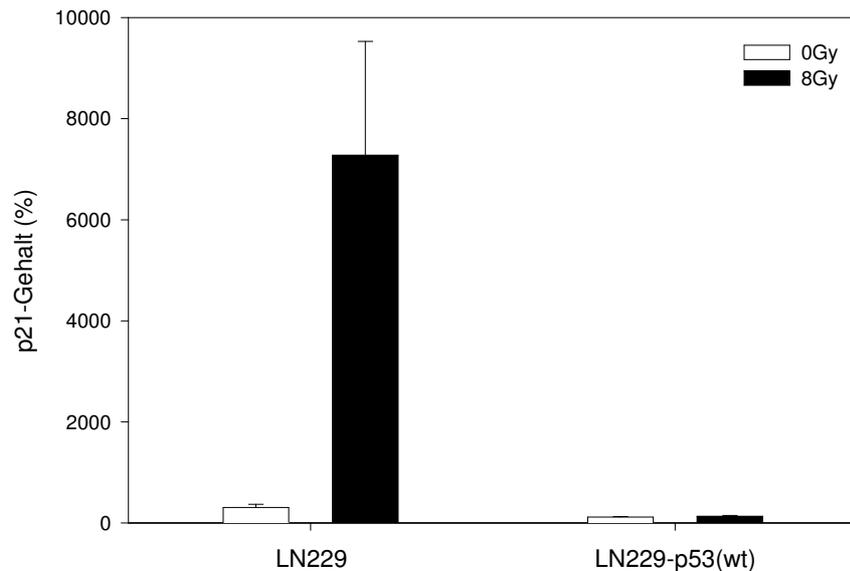
Wie oben bereits erwähnt, konnte in der LN229-p53(mt)-Zelllinie kein p21-Protein nachgewiesen werden.



**Abb. 4.15:** Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die drei Versuche, die die Expression des Proteins p21 über einen Zeitraum von 72 h nach 8 Gy Bestrahlung betrachteten. Links sind die Verläufe für die LN229-Zellen, rechts die für die LN229-p53(wt)-Zellen dargestellt. Die schwarzen Kreise stehen für den p21-Gehalt nach 8 Gy Bestrahlung. Diese Werte wurden relativ zum Gehalt an Aktin in der jeweiligen Probe berechnet, der durch die weißen Kreise dargestellt wird. Wie man erkennen kann, wich der erste Versuch deutlich von den beiden folgenden ab, so dass er bei der Ermittlung des Mittelwertes nicht mit berücksichtigt wurde. Da die Zunahme von p21 in den LN229-Zellen gegenüber dem Ausgangswert sehr viel ausgeprägter war als bei den LN229-p53(wt)-Zellen, wurde im linken Bildteil eine andere Skalierung der y-Achse als im rechten gewählt.



**Abb. 4.16:** Übersicht über den Verlauf der p21-Expression nach Bestrahlung mit 8 Gy gegen die Zeit. Gezeigt ist der **Mittelwert aus dem 2. und 3. Versuch** (vgl. Abb. 4.15). Die weißen Kreise zeigen als Zusatzinformation die durchschnittliche Menge an Aktin in den Proben, die immer etwa bei 100 % lag, was einer gleich bleibend großen Menge an aufgetragenem Protein entspricht. Die schwarzen Kreise zeigen den Verlauf des Gehalts an p21. Diese Werte wurden jeweils relativ zur Aktinmenge berechnet. In den LN229-Zellen war 24 h p.r. eine deutliche Zunahme von p21 zu erkennen, die bis zum Versuchsende wieder leicht abnahm. In den LN229-p53(wt)-Zellen war ebenso eine leichte Zunahme von p21 zu sehen, jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Da die ermittelten Werte der LN229-Zellen deutlich höher lagen als bei den LN229-p53(wt)-Zellen, wurde in der unteren Graphik eine andere Skalierung der y-Achse gewählt.



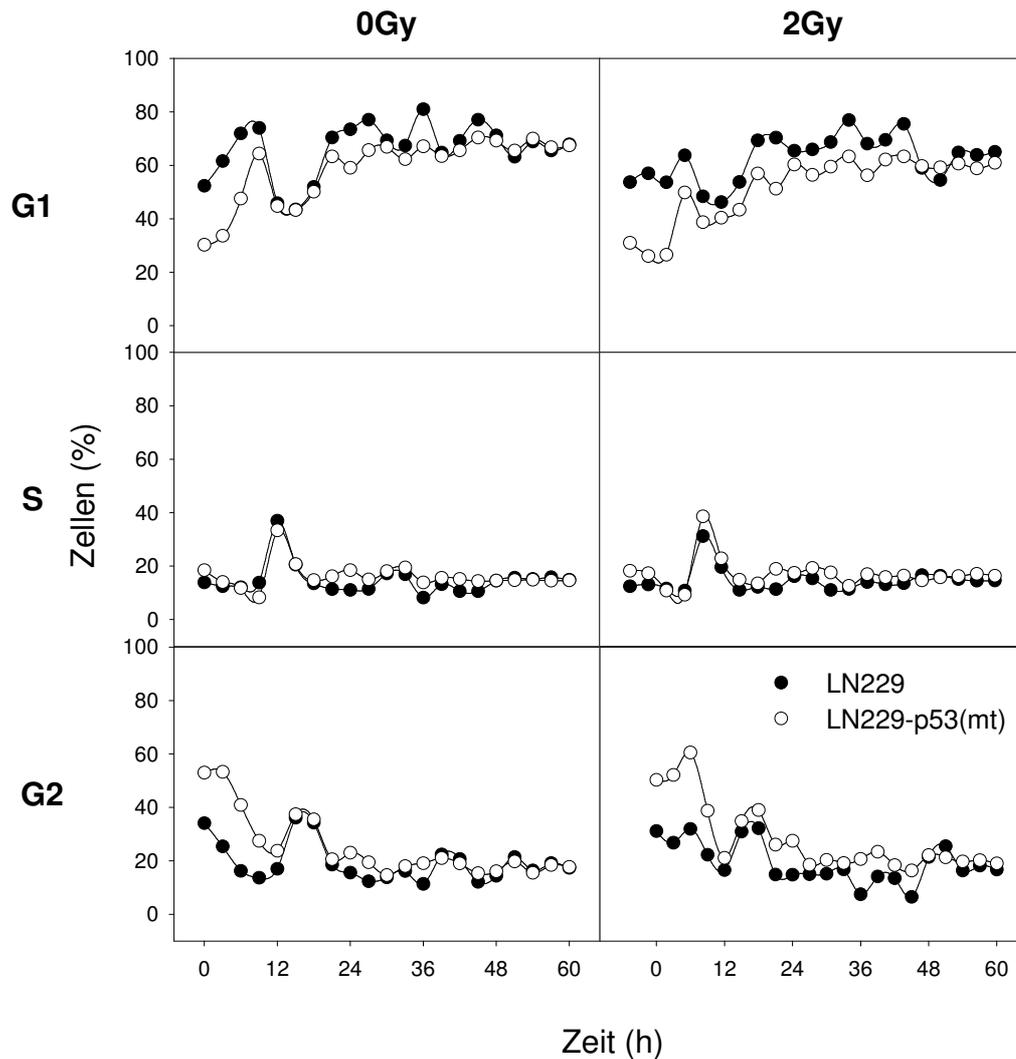
**Abb. 4.17:** p21-Expression nach 0 Gy (weiße Balken) und 8 Gy (schwarze Balken) 24 h p.r.. Man erkannte eine deutliche Zunahme der p21-Proteinmenge nach Bestrahlung mit 8 Gy in den LN229-Zellen. In den LN229-p53(wt)-Zellen konnte keine signifikante Veränderung der Proteinmenge durch die Bestrahlung herbeigeführt werden.

#### 4.5.2. Verteilung der LN229- und LN229-p53(mt)- Zellen in den Zellzyklusphasen nach 2 Gy

Da sich die LN229-Zellen und die LN229-p53(mt)-Zellen in ihrem Zellzyklusverhalten ähnelten, werden diese zunächst gemeinsam abgehandelt. Das Verhalten der LN229-p53(wt)-Zellen wird unter dem Punkt 4.5.3 besprochen. Auf die Berechnung des Mittelwertes wurde verzichtet, da sich zwischen den Versuchen leichte zeitliche Verschiebungen der beobachteten Effekte ergeben können. Das tatsächliche Bild könnte somit durch die Berechnung eines Mittelwertes eher verzerrt werden.

##### 4.5.2.1. Verteilung im Zellzyklus anhand des DNA-Gehaltes

Da sich das Verhalten der Zellen in allen drei durchgeführten Versuchen weitgehend glich, wurde ein repräsentativer Versuch ausgewählt, der eine Übersicht über das Verhalten der Zellen gibt. Zunächst wurde lediglich die Verteilung über die Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehaltes betrachtet. Wie Abb. 4.18 zeigt, verhielten sich die LN229-Zellen und die LN229-p53(mt)-Zellen ähnlich.



**Abb. 4.18:** Übersicht über die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen für die LN229-Zelllinie (schwarze Kreise) und die LN229-p53(mt)-Zelllinie (weiße Kreise). Dargestellt wurde die Verteilung ohne Bestrahlung (linke Seite) und nach 2 Gy Bestrahlung (rechte Seite). Im obersten Teil der Abb. wurde der Anteil Zellen in der G1-Phase dargestellt, in der Mitte die der S-Phase und unten die der G2-Phase. Nur im Bereich der ersten 15 h konnte einen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien hinsichtlich der G1- und der G2-Phase gezeigt werden (siehe Abb. 4.19). Danach verhielten sie sich weitgehend gleich. Ein Unterschied bei Betrachtung der S-Phase ergab sich nicht.

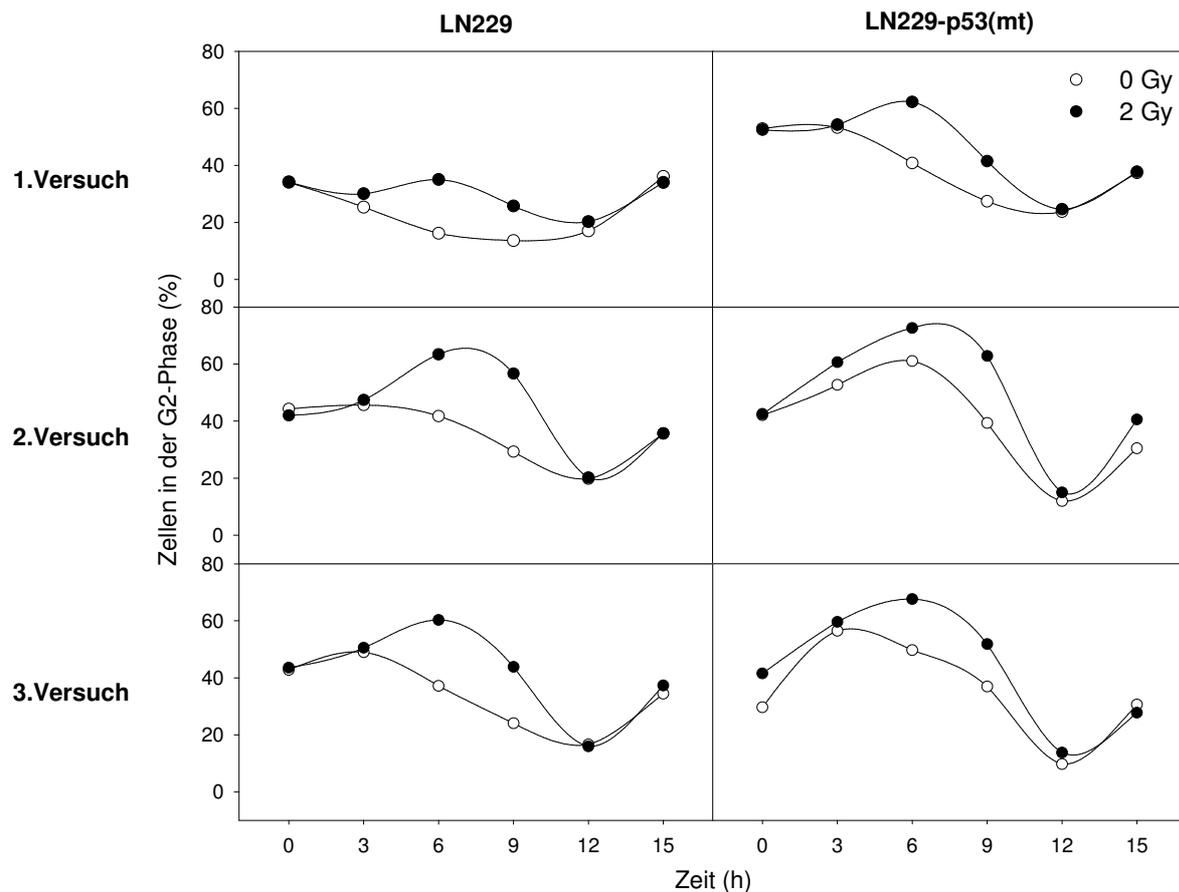
Nur in den ersten Stunden ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der Verteilung in den Zellzyklusphasen. So befanden sich zunächst bei den LN229-Zellen 53 % der Zellen in der G1-Phase und 34 % in der G2-Phase. Hiervon unterschieden sich die LN229-p53(mt)-Zellen mit 30 % G1-Phase-Zellen und 50 % G2-Phase-Zellen. Über den Zeitverlauf glichen sich diese Werte aber zunehmend an, so dass nach 15 h kein Unterschied mehr zu finden war. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich bei den LN229-Zellen 43 % in der G1-Phase, bei den LN229-p53(mt)-Zellen waren dies ebenfalls 43 %. Analog dazu fanden sich 36 % bzw. 38 % in der G2-Phase. Dies blieb bis zum Versuchsende weitgehend unverändert (vgl. Abb. 4.18).

Bei Betrachtung der S-Phase ergab sich eine Lag-Phase, was bedeutet, dass sich der Anteil der Zellen in dieser Phase zunächst kaum veränderte und erst zum Zeitpunkt 9 h wieder

zunahm (Abb. 4.18). Alles im Vorherigen gesagte gilt sowohl für die mit 2 Gy bestrahlten als auch die unbestrahlten Zellen. Der beobachtete Strahlungseffekt war gering ausgeprägt und nur in den ersten Stunden p.r. zu erkennen. Er bestand in einem G2-Block. Dieser Effekt ist für alle drei Versuche in Abb. 4.19 dargestellt. Bei den LN229-Zellen ließ sich erkennen, dass sich in allen drei durchgeführten Versuchen zu den Zeitpunkten 6 h und 9 h nach der Bestrahlung mit 8 Gy ein deutlich größerer Anteil von Zellen in der G2-Phase befand als bei der unbestrahlten Kontrolle. Während die Werte bei 3 h noch keinen Unterschied zeigten (25 % vs. 30 % p.r.), fand sich nach 6 h eine Zunahme der Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung. Sie bedeutete im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme um den Faktor 2,0 der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen (16 % vs. 35 % p.r.). Dieser Effekt war auch noch nach 9 h zu erkennen, und zwar in ähnlich starker Ausprägung (14 % vs. 26 % p.r.). Nach weiteren 3 h war kein Unterschied mehr festzustellen (17 % vs. 20 % p.r.).

Auch bei den LN229-p53(mt)-Zellen war bis zum Zeitpunkt 3 h noch kein Unterschied zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen erkennbar (53 % vs. 54 % p.r.). Im folgenden zeigte sich sowohl nach 6 h (41 % vs. 62 % p.r.) als auch nach 9 h (27 % vs. 42 % p.r.) eine Zunahme der Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung. Auch hier hatte sich die Blockierung in der G2-Phase nach 12 h wieder aufgehoben (24 % vs. 25 % p.r.). Der hier beobachtete G2-Block bewegte sich mit einer Erhöhung der Werte ohne Bestrahlung in etwa auf dem 1,5-fachen Niveau der unbestrahlten Kontrolle.

Es lässt sich also festhalten, dass sich nach Bestrahlung mit 2 Gy sowohl bei den LN229- als auch den LN229-p53(mt)-Zellen anhand der DNA-Menge ein strahleninduzierter G2-Block zwischen 6 h und 12 h p.r. ausprägte. Folglich dauerte er also in beiden Fällen etwa 6 h. Während sich bei den LN229-Zellen eine Verdoppelung des Anteils der Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle ergab, konnte man bei den LN229-p53(mt)-Zellen lediglich einen um den Faktor 1,5 erhöhten Anteil finden. Eine Beeinflussung der G1-Phase im Sinne einer Blockbildung durch die Bestrahlung mit 2 Gy konnte mit diesem Verfahren in keiner der beiden Zelllinien nachgewiesen werden.



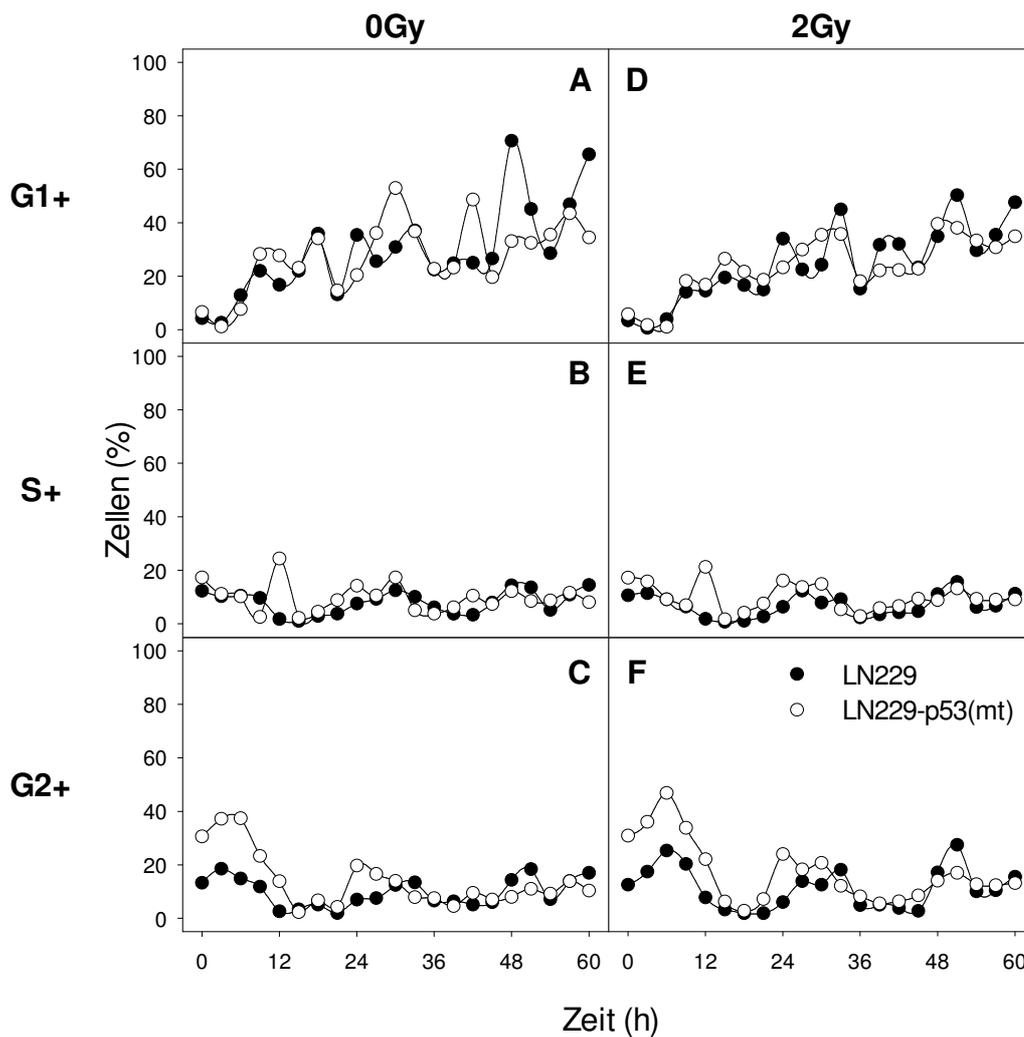
**Abb. 4.19:** Entwicklung des G2-Blockes nach 2 Gy Bestrahlung in LN229- Zellen (linke Seite) und LN229-p53(mt)-Zellen (rechte Seite). Gezeigt wurde der prozentuale Anteil an Zellen in der G2-Phase in Relation zur Gesamtpopulation. Verglichen wurden unbestrahlte Zellen (weiße Kreise) mit solchen nach 2 Gy Bestrahlung (schwarze Kreise). Alle drei durchgeführten Versuche wurden einander von oben nach unten gegenübergestellt. In allen Fällen zeigte sich im Bereich zwischen 6 h und 12 h eine Zunahme der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy. Der Effekt war bei den LN229-Zellen stärker ausgeprägt als bei den LN229-p53(mt)-Zellen.

#### 4.5.2.2. Verteilung im Zellzyklus anhand der BrdU / DNA- Doppelmarkierung

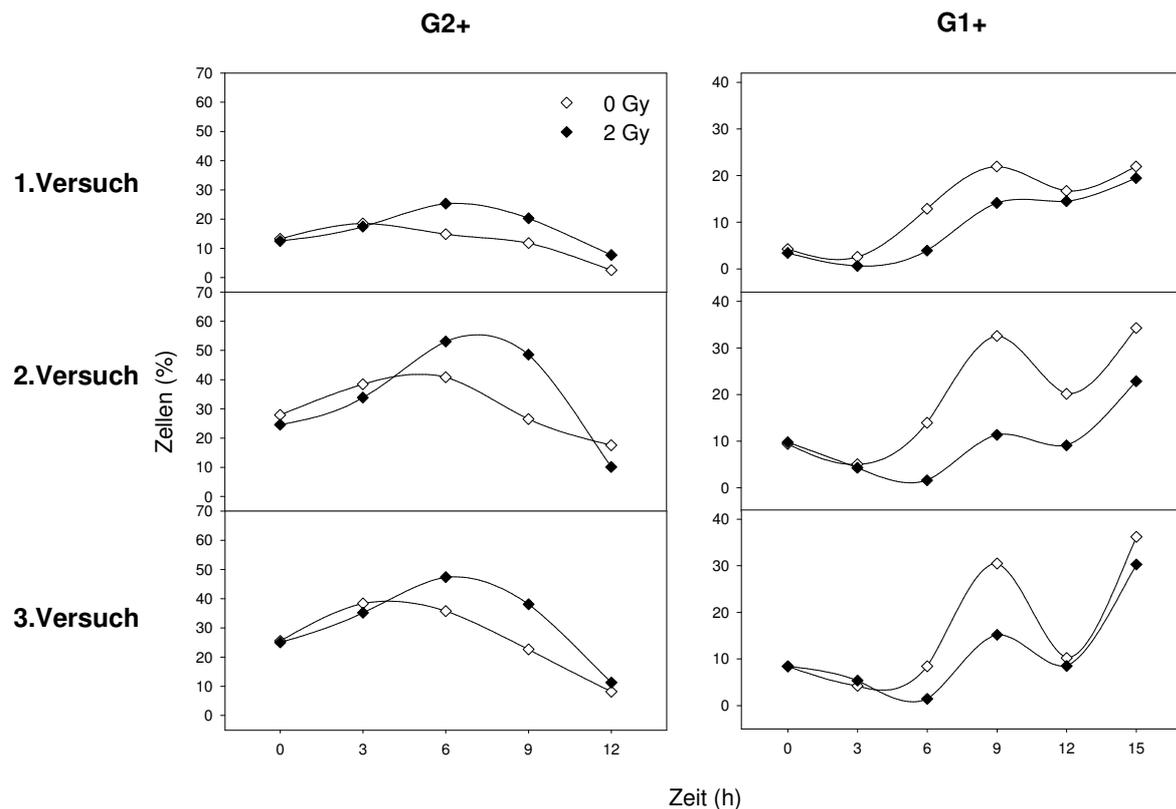
Im Folgenden werden diejenigen Subpopulationen der LN229- und LN229-p53(mt)-Zellen betrachtet, die sich mit BrdU markieren ließen und sich zum Bestrahlungszeitpunkt und der BrdU-Inkubation in der gleichen Zellzyklusphase (S-Phase) befanden. In allen durchgeführten Versuchen lag der Anteil markierter Zellen bei beiden Zelllinien bei etwa 50-70 %. Im Einzelfall erhielt man Werte, die mit etwa 20 % oder 80 % markierter Zellen deutlich über oder unter dem durchschnittlichen Wert lagen. Abb. 4.20 bietet einen Überblick über die Verteilung der markierten Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. Die LN229-Zellen und die LN229-p53(mt)-Zellen verhielten sich weitgehend gleich. Während sich bei beiden Zelllinien zu Beginn des Versuches gleiche Anteile in der G1-Phase und der S-Phase befanden, lagen die Werte der G2-Phase bei den LN229-p53(mt)-Zellen etwas höher. Dieser

Unterschied verlor sich mit der Zeit, so dass sich nach 15 h gleiche Werte für beide Zelllinien ergaben. So befanden sich im dargestellten Versuch zu Beginn 31 % der markierten LN229-p53(mt)-Zellen in der G2-Phase, während es bei den LN229-Zellen lediglich 13 % waren. Auch nach 12 h war noch ein Unterschied erkennbar mit 14 % und 3 % der Zellen, der sich zum Zeitpunkt 15 h mit 2,3 % und 3,3 % verlor. Es war erkennbar, dass durch die Bestrahlung mit 2 Gy nur ein geringer Effekt gegenüber den unbestrahlten Zellen erzielt wurde. Dieser bestand bei beiden Zelllinien in einem dezent ausgeprägten G2-Block im Bereich von etwa 6 h – 12 h p.r. und dadurch bedingt ein späteres Erscheinen der Zellen in der G1-Phase (vgl. Abb. 4.21 und Abb. 4.22). Die Ausbildung eines Blockes in der G1-Phase konnte für keine der beiden Zelllinien nach Bestrahlung mit 2 Gy festgestellt werden. Bei den weiteren Ausführungen wurden in Klammern die jeweiligen prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen für einen Beispielversuch angegeben. In den anderen Versuchen war das Verhalten ähnlich.

So zeigte sich bei den LN229-Zellen (siehe Abb. 4.21) in allen drei Versuchen ein weitgehend analoges Bild. Während sich bis zum Zeitpunkt 3 h noch gleich große Anteile ohne und mit Bestrahlung von 2 Gy in der G2-Phase befanden (19 % vs. 17 % p.r.), war nach 6 h eine Zunahme der sich in der G2-Phase befindenden Zellen nach 2 Gy Bestrahlung zu verzeichnen (15 % vs. 25 % p.r.). Diese Blockbildung war auch zum Zeitpunkt 9 h noch deutlich zu erkennen (12 % vs. 20 % p.r.). Nach 12 h hatte sich die Blockade im Zellzyklus gelöst und es fanden sich wieder ähnliche Werte für bestrahlte und unbestrahlte Zellen (3 % vs. 7 % p.r.). Über einen Zeitraum von 6 h zwischen 3 h und 12 h p.r. fand sich also ein durch 2 Gy Bestrahlung induzierter G2-Phasen-Block mit 1,6-mal soviel Zellen in der G2-Phase als in der unbestrahlten Kontrolle. Im selben Zeitraum entwickelte sich der Anteil der markierten Zellen in der G1-Phase nach Bestrahlung mit 2 Gy gegenläufig. Auch in der G1-Phase befanden sich 3 h nach Versuchsbeginn noch ungefähr gleich hohe Zellanteile für unbestrahlte und bestrahlte Zellen (3 % vs. 1 % p.r.). Nach 6 h war dieser Anteil bei den bestrahlten Zellen gegenüber den unbestrahlten weniger stark gestiegen (13 % vs. 4 % p.r.), eine Entwicklung, die sich auch noch zum Zeitpunkt 9 h so darstellte (22 % vs. 14 % p.r.). Nach 12 h wurden gleiche Zellzahlen gefunden (17 % vs. 15 % p.r.). In einem der Versuche hielt dieser Effekt bis 18 h p.r. an (nicht gezeigt). Mit Hilfe der DNA-/BrdU-Doppelmarkierung ließ sich für LN229-Zellen feststellen, dass sie einen G2-Block von etwa 6 h Dauer zwischen 6 h und 12 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy ausbildeten, der gegenüber der unbestrahlten Kontrolle eine Erhöhung um den Faktor 1,6 bedeutete. Da die Zellen in der G2-Phase verblieben, erschienen sie, verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle, erst verspätet in der G1-Phase.

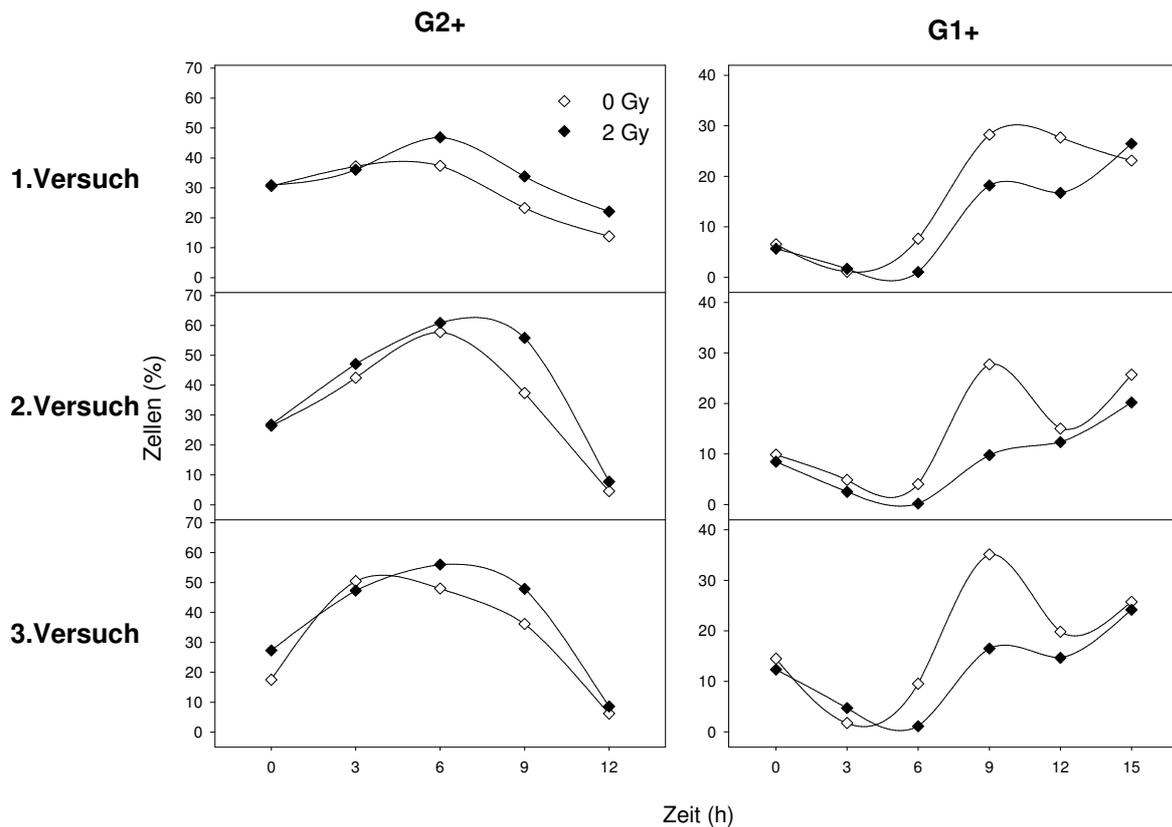


**Abb. 4.20:** Überblick über die Verteilung der BrdU-markierten Zellen an den Zellzyklusphasen. Gezeigt wurde das Verhalten ohne Bestrahlung (A-C) und nach 2 Gy (D-F) für LN229-Zellen (schwarze Kreise) und LN229-p53(mt)-Zellen (weiße Kreise). In den Graphikteilen A und D wurde die Entwicklung in der G1-Phase gezeigt (G1+), in B und E die der S-Phase (S+) und in C und F die der G2-Phase (G2+). Man erkannte nur im Bereich der ersten 15 h einen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien hinsichtlich der G2-Phase, danach verhielten sie sich ähnlich. Ein Unterschied bei Betrachtung der S-Phase ergab sich nicht, die beiden Kurven verliefen gleich bis auf einen als artifiziell zu betrachtenden Gipfel zum Zeitpunkt 12 h bei den LN229-p53(mt)-Zellen. In der G1-Phase schwankten die Anteile bei beiden Zelllinien stark. Zwischen unbestrahlten und mit 2 Gy behandelten Zellen ergaben sich nur kleine Unterschiede, welche in Abb. 4.21 und Abb. 4.22 genauer dargestellt wurden.



**Abb. 4.21:** In der Graphik wurde die Verteilung der BrdU-markierten Zellen der LN229-Zelllinie in der G1-Phase (rechte Seite) und der G2-Phase (linke Seite) ohne Bestrahlung (weiße Rauten) und nach 2 Gy (schwarze Rauten) dargestellt. Gezeigt wurden die ersten 12 h Stunden nach BrdU-Inkubation aller drei durchgeführten Versuche im Vergleich. In allen Fällen befanden sich zwischen 6 h und 12 h p.r. nach 2 Gy Bestrahlung mehr Zellen in der G2-Phase als ohne Bestrahlung, was einer Blockade des Zellzyklus in dieser Phase nach Bestrahlung entsprach. Infolgedessen erschienen diese Zellen später in der G1-Phase, weshalb die Kurven nach 2 Gy Bestrahlung im rechten Bildteil zwischen 6 h und 12 h unter denen der unbestrahlten Zellen verliefen. Ein G1 - Block zeigte sich nicht. Beim 2. Versuch dauerte diese Phase etwas länger, der Verlauf war aber insgesamt dem im 1. und 3. Versuch ähnlich.

Die BrdU-markierten LN229-p53(mt)-Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten (siehe Abb. 4.22). Während die Anteile der G2-Phase für unbestrahlte und bestrahlte Zellen nach 3 h noch etwa gleich waren (51 % vs. 47 % p.r.), zeigte sich nach 6 h in den bestrahlten Proben ein etwas größerer Anteil Zellen in der G2-Phase (48 % vs. 56 %). Bei einem der drei durchgeführten Versuche waren die Anteile zu diesem Zeitpunkt noch gleich. Nach 9 h war die Zunahme des Anteils der Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung mit 2 Gy am deutlichsten ausgeprägt (36 % vs. 48 % p.r.). Nach 12 h hatte sich bestrahlte und unbestrahlte Proben wieder einander angeglichen (6 % vs. 8 % p.r.). Dieser G2-Phase-Block lag etwa im Bereich des 1,4-fachen der unbestrahlten Kontrolle.



**Abb. 4.22:** Dargestellt wurde der Anteil der BrdU-markierten Zellen der LN229-p53(mt)-Zelllinie in der G1-Phase (rechts) und der G2-Phase (links) ohne Bestrahlung (weiße Rauten) und nach Behandlung mit 2 Gy (schwarze Rauten). Gezeigt wurden die ersten 12 h Stunden nach BrdU-Inkubation aller drei durchgeführten Versuche untereinander. Man erkennt im linken Bildteil, dass sich zwischen 6 h und 12 h p.r. nach 2 Gy Bestrahlung ein größerer Anteil Zellen in der G2-Phase befand, was einer Blockierung des Zellzyklus in dieser Phase nach Bestrahlung entsprach. Beim 1. Versuch dauerte diese Phase etwas länger und war erst zum Zeitpunkt 15 h beendet (nicht gezeigt). Entsprechend der Blockierung in der G2-Phase erschienen diese Zellen erst etwas später in der G1-Phase, weshalb die Kurven nach 2 Gy Bestrahlung im rechten Bildteil zwischen 6 h und 12 h unter denen der unbestrahlten Zellen verliefen. Beim 1. Versuch dauerte diese Phase etwas länger, der Verlauf war aber insgesamt dem im 2. und 3. Versuch ähnlich. Es zeigte sich keine Blockierung in der G1-Phase.

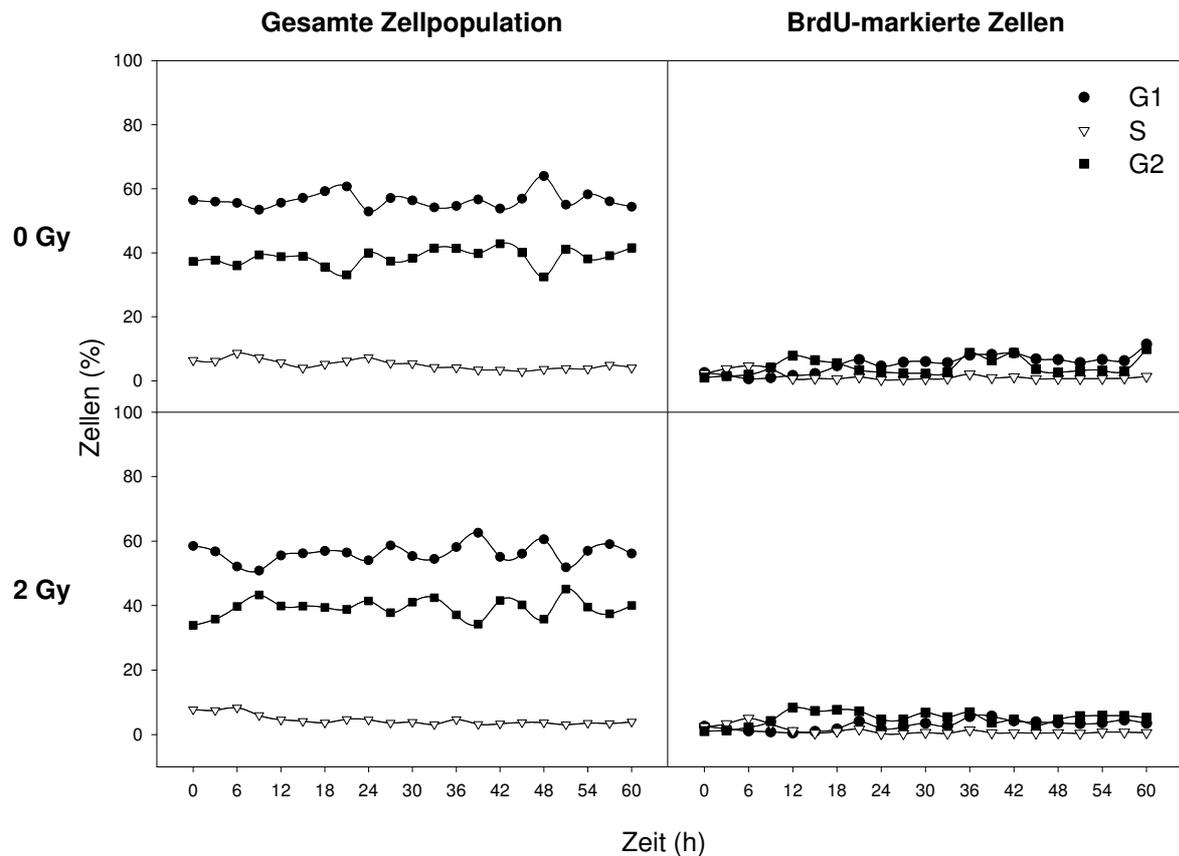
Mit dem vermehrten Anteil der G2-Phase nach Bestrahlung mit 2 Gy ging auch hier ein im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen verminderter Anteil in der G1-Phase einher. Während sich nach 3 h noch gleich hohe Werte für bestrahlte und unbestrahlte Proben ergaben (2 % vs. 5 % p.r.), waren die Werte nach Behandlung mit 2 Gy und 6 h niedriger als die der Kontrolle (10 % vs. 1 % p.r.). Auch bei 9 h war dieser Effekt noch zu beobachten (35 % vs. 17 %). Zum Zeitpunkt 12 h glichen sich die Werte wieder einander an (20 % vs. 15 % p.r.). In einem der drei Versuche fand sich zu diesem Zeitpunkt noch ein niedrigerer Anteil in der G1-Phase nach Bestrahlung, was aber im weiteren Verlauf nicht mehr zu sehen war. Zusammenfassend ergab sich für die LN229-p53(mt)-Zellen, dass in den in der S-Phase bestrahlten, BrdU-markierten Zellen nach Behandlung mit 2 Gy eine geringfügig ausgeprägte Blockierung ihres

Zellzyklus in der G2-Phase induziert wurde, der im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle etwa um den Faktor 1,4 erhöht war. Dieser G2-Block dauerte etwa 6 h zwischen 6 h und 12 h nach der Bestrahlung.

Damit war das Verhalten der LN229-Zellen und der LN229-p53(mt)-Zellen weitgehend gleich. Der G2-Block war bei den LN229-Zellen etwas stärker ausgeprägt. Es konnte kein Effekt der Strahlung hinsichtlich der Ausprägung eines Blockes in der G1-Phase gezeigt werden.

#### **4.5.3. Verteilung der LN229-p53(wt)-Zellen in den Zellzyklusphasen nach 2 Gy**

Bei den LN229-p53(wt)-Zellen ist in Abb. 4.23 am Beispielversuch erkennbar, dass die Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen relativ konstant blieben. Die Zellen befanden sich somit über den gesamten Zeitraum in einem weitgehend stationären Zustand. Bei der Betrachtung der Gesamtpopulation der Zellen war zu erkennen, dass sich in der G1-Phase immer etwa die Hälfte der Zellen befand. Zwischen den drei Versuchen ergaben sich jeweils leichte Schwankungen. Ein Unterschied zwischen mit 2 Gy behandelten und unbestrahlten Zellen zeigte sich nicht. Die prozentualen Anteile sind jeweils für einen beispielhaften Versuch angegeben, von dem sich die anderen nur geringfügig unterschieden. So lag der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase befanden, im Bereich von 51 - 68 %. Den Zeitverlauf betrachtend sind die Schwankungen gering (vgl. Abb. 4.23). Konstant auf geringem Niveau fand sich der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase. Er lag bei 3 - 8 %. Eine größere Veränderung im Zeitverlauf war nicht zu erkennen. Auch hinsichtlich der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen ergab sich weder eine Veränderung mit der Zeit noch ein Effekt der applizierten Strahlung von 2 Gy. Es fanden sich durchgehend 32 - 43 % der Zellen in dieser Zellzyklusphase. Nur eine sehr geringe Anzahl der Zellen ließ sich mit BrdU markieren. Zum Zeitpunkt 0 h unmittelbar nach der Inkubation lag dieser Anteil bei allen durchgeführten Versuchen bei 5 - 6 %. Im weiteren Zeitverlauf ergab sich eine geringe Zunahme dieses Wertes auf etwa 10 % bis zum Versuchsende (vgl. Abb. 4.23). Insgesamt war die Subpopulation der BrdU-markierten Zellen und die Veränderung der Anteile an den Zellzyklusphasen so gering (vgl. Abb. 4.23), dass eine Betrachtung hinsichtlich der Zellzykluskinetik bei diesen Zellen nicht durchzuführen war. Die LN229-p53(wt)-Zellen zeigten sich also hinsichtlich ihrer Proliferation nicht aktiv.



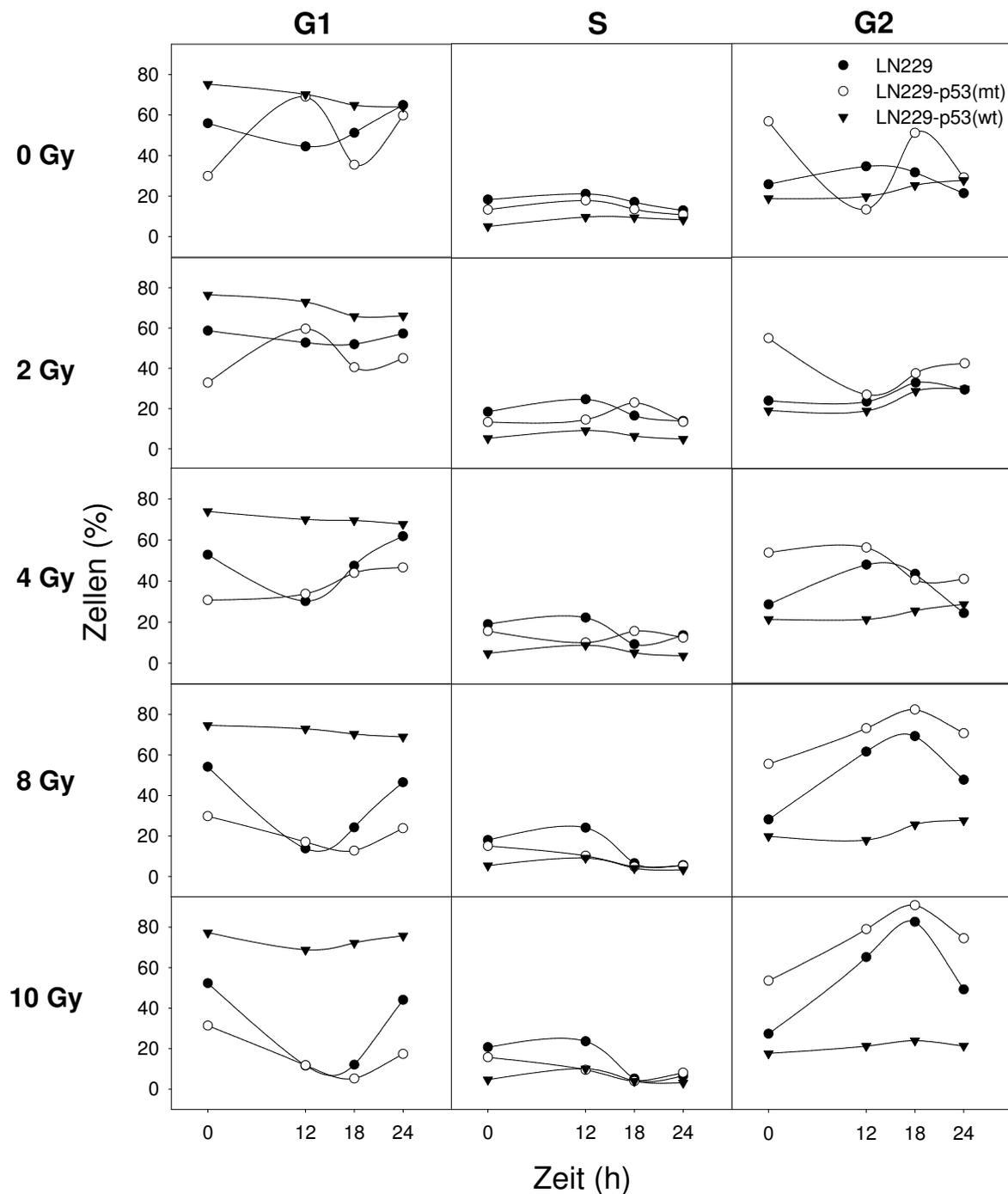
**Abb. 4.23:** Übersicht über die Verteilung aller Zellen und der BrdU-markierten Zellen von LN229-p53(wt)-Zellen nach 2 Gy Bestrahlung über 60 h in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Links ist die Verteilung der gesamten Zellpopulation dargestellt, rechts die derjenigen Zellen, die sich mit DNA / BrdU - Doppelmarkierung. Die schwarzen Kreise repräsentieren die G1-Phase, die schwarzen Vierecke die G2-Phase und die weißen Dreiecke die S-Phase. Im oberen Teil sieht man das Verhalten ohne Bestrahlung, darunter das nach 2 Gy. Man erkennt die nur geringen Schwankungen der Anteile an den verschiedenen Phasen im linken Teil der Graphik. Im linken Teil der Abbildung erkennt man, dass nur sehr wenige Zellen mit BrdU markiert werden konnten. Außerdem ließ sich auch hier keine Progression in eine andere Zyklusphase erkennen. Ein Unterschied zwischen den unbestrahlten Zellen und den mit 2 Gy behandelten entzog sich der Untersuchung.

#### 4.5.4. Einfluss verschiedener Strahlendosen auf die Zellzyklusphasen

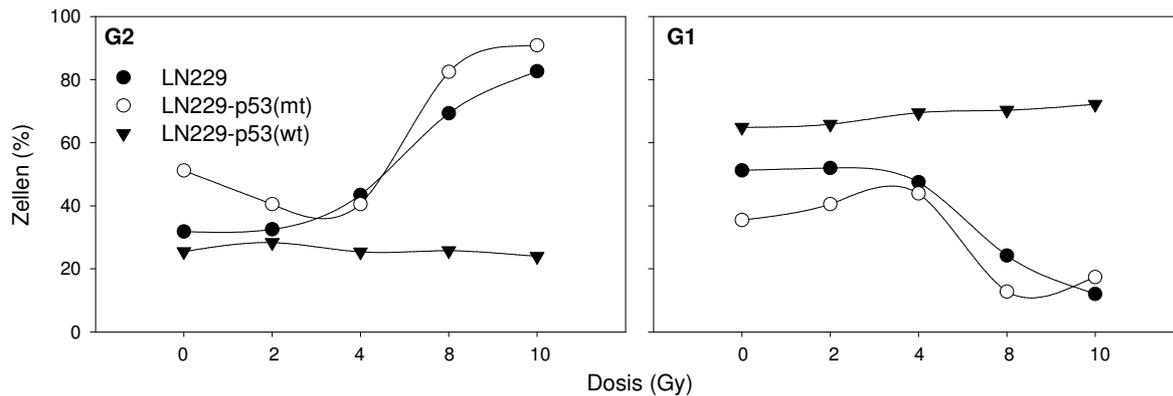
Da der nach 2 Gy Bestrahlung beobachtete Effekt insgesamt sehr gering ausgeprägt war, wurden die drei Zelllinien nochmals bei verschiedenen höheren Strahlendosen untersucht. Allerdings wurde nur die Entwicklung über einen Zeitraum von 24 h betrachtet und nur wenige Zeitpunkte herausgegriffen. Bestrahlt wurde mit 2 Gy - 10 Gy. Außerdem wurde eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Es wurde jeweils nur die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zyklusphasen anhand des DNA-Gehaltes betrachtet. Aus Zeit- und Materialgründen wurde der Versuch nur einmal durchgeführt (Abb.14.24). Man erkennt, dass in allen drei Zelllinien der prozentuale Anteil Zellen in der S-Phase immer ungefähr gleich

hoch war. Er lag im Bereich zwischen 10 % und 20 %, unabhängig von der applizierten Dosis und vom betrachteten Zeitpunkt. Betrachtete man den Zellanteil an der G2-Phase, so war bei den LN229- sowie bei den LN229-p53(mt)-Zellen ein analog zur applizierten Dosis zunehmender Block in der G2-Phase erkennbar. In beiden Fällen nahm der Anteil von Zellen in der G2-Phase bis 18 h zu und fiel dann gegen 24 h ab. Konsekutiv dazu lag der jeweils niedrigste Zellanteil in der G1-Phase bei den LN229- sowie den LN229-p53(mt)-Zellen ebenfalls bei 18 h, da die in der G2-Phase zurückgehaltenen Zellen nicht die Mitose durchliefen und somit auch nicht in der G1-Phase erschienen. Ein solcher Effekt ließ sich nicht für die LN229-p53(wt)-Zelllinie ausmachen. Hier fanden sich unabhängig von der applizierten Dosis und vom Zeitpunkt immer relativ konstante prozentuale Anteile an der G1- und der G2-Phase. Beständig waren ungefähr 70 - 80 % der Zellen in der G1-Phase und etwa 20 - 30 % in der G2-Phase. Um die beobachtete Strahlenwirkung in den drei Zelllinien genauer zu analysieren, wurden die prozentualen Anteile zum Zeitpunkt der maximalen Ausprägung des G2-Blockes bei 18 h (bzw. geringster Anteil an der G1-Phase) betrachtet und die verschiedenen hohen Strahlendosen miteinander verglichen (vgl. Abb. 4.25).

Bei den LN229-Zellen betrug der Anteil Zellen, die sich in der G2-Phase befanden ohne Bestrahlung 31,8 %. Bei 2 Gy ließ sich noch keine Zunahme ausmachen. Mit 43,4 % Zellen in der G2-Phase war bei 4 Gy bereits eine Zunahme festzustellen, die sich über 8 Gy nach 10 Gy mit 82,6 % zu einem immer deutlicheren G2-Block entwickelte. Der Anteil Zellen in der G2-Phase betrug somit nach 10 Gy das 2,6-fache der unbestrahlten Kontrolle. Analog dazu nahm der Teil der Zellen in der G1-Phase ab. Fanden sich hier ohne Bestrahlung noch 51,2 % der Zellen und etwa ebenso viele nach 2 Gy, waren es nach 4 Gy noch 47,5 %. Eine weitere Abnahme erfolgte über 8 Gy nach 10 Gy. Nach dieser Dosis fanden sich noch 12,1 % der Zellen in der G1-Phase. Bei den LN229-p53(mt)-Zellen nahm der Anteil der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen ohne Bestrahlung (51,2 %) bis 4 Gy zunächst ab. Nach 8 Gy kam es aber auch hier zu einer Anhäufung der Zellen in der G2-Phase mit einem Anteil von 82,4 % und 90,8 % nach 10 Gy. Das entspricht einer relativen Zunahme der Zellen in der G2-Phase um den Faktor 1,8 gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Während sich anfänglich 35,4 % der Zellen in der G1-Phase fanden, nahm dieser Wert bis 4 Gy zunächst zu. Bei den höheren Dosen sank er aber dann mit 12,8 % bei 8 Gy bzw. 17,4 % bei 10 Gy entsprechend der Entwicklung in der G2-Phase ab.



**Abb. 4.24:** Überblick über die Verteilung der Zellen der verschiedenen Zelllinien in den Zellzyklusphasen bei verschiedenen Strahlendosen. Die jeweiligen Zellanteile wurden gegen die Zeit aufgetragen. Links wurde die Entwicklung der G1-Phase dargestellt, in der Mitte die der S-Phase und rechts die der G2-Phase. Die applizierte Dosis nahm von oben nach unten zu. Sowohl in den LN229-Zellen (schwarze Kreise) als auch in den LN229-p53(mt)-Zellen (weiße Kreise) kam es zu einem mit der Dosis zunehmenden G2-Block, der nach 18 h maximal ausgeprägt war. Analog dazu nahm der Anteil der G1-Phase ab. Die sich in der S-Phase befindlichen Zellen ergaben immer einen relativ konstanten Anteil. Im Falle der LN229-p53(wt)-Zellen (schwarze Dreiecke) ließ sich keine Veränderung der Anteile in den Phasen erkennen, weder über den betrachteten Zeitraum noch mit der Applikation einer immer höheren Strahlendosis.



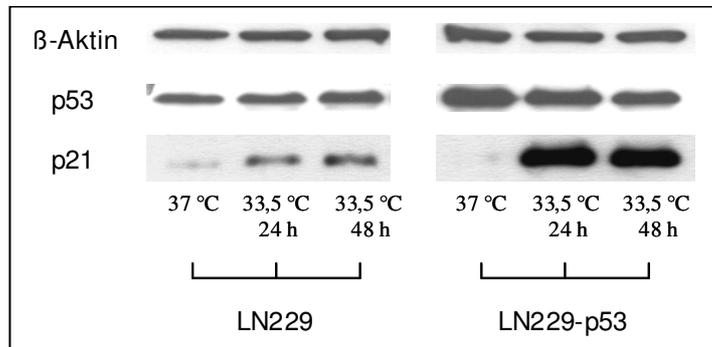
**Abb. 4.25:** Zellanteile in der G2-Phase (linke Graphik) und der G1-Phase (rechte Graphik) zum Zeitpunkt der maximalen Ausprägung des G2-Blockes bei 18 h aufgetragen gegen die verschiedenen Strahlendosen. Sowohl bei den LN229-Zellen (schwarze Kreise) als auch den LN229-p53(mt)-Zellen (weiße Kreise) erkannte man einen mit der Dosis zunehmenden Anteil von Zellen in der G2-Phase und den zugleich abnehmenden Anteil der G1-Phase. Bei den LN229-p53(wt)-Zellen (schwarze Dreiecke) sah man, dass sich für die Anteile an der G2- und der G1-Phase keine Änderungen bei den verschiedenen Dosen ergaben.

Keine Veränderung der Anteile der Zellen in der G2- und der G1-Phase mit der applizierten Dosis fand sich in der LN229-p53(wt)-Zelllinie. Der Anteil Zellen in der G2-Phase lag bei 65 – 70 %, in der G1-Phase bei 25 – 30 %. Die Werte bewegten sich also nur in einem Schwankungsbereich von 5 %. Zusammenfassend ließ sich hier also sowohl für die LN229- als auch die LN229-p53(mt)-Zellen ein dosisabhängiger G2-Block feststellen, der in seiner maximalen Ausprägung nach 18 h vorlag. Bei den LN229-Zellen war die Ausprägung dieser Entwicklung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle stärker ausgeprägt. Bei den LN229-p53(wt)-Zellen erfolgte keine Veränderung der Anteile der Zellen an den verschiedenen Zyklusphasen durch die verschiedenen Dosen.

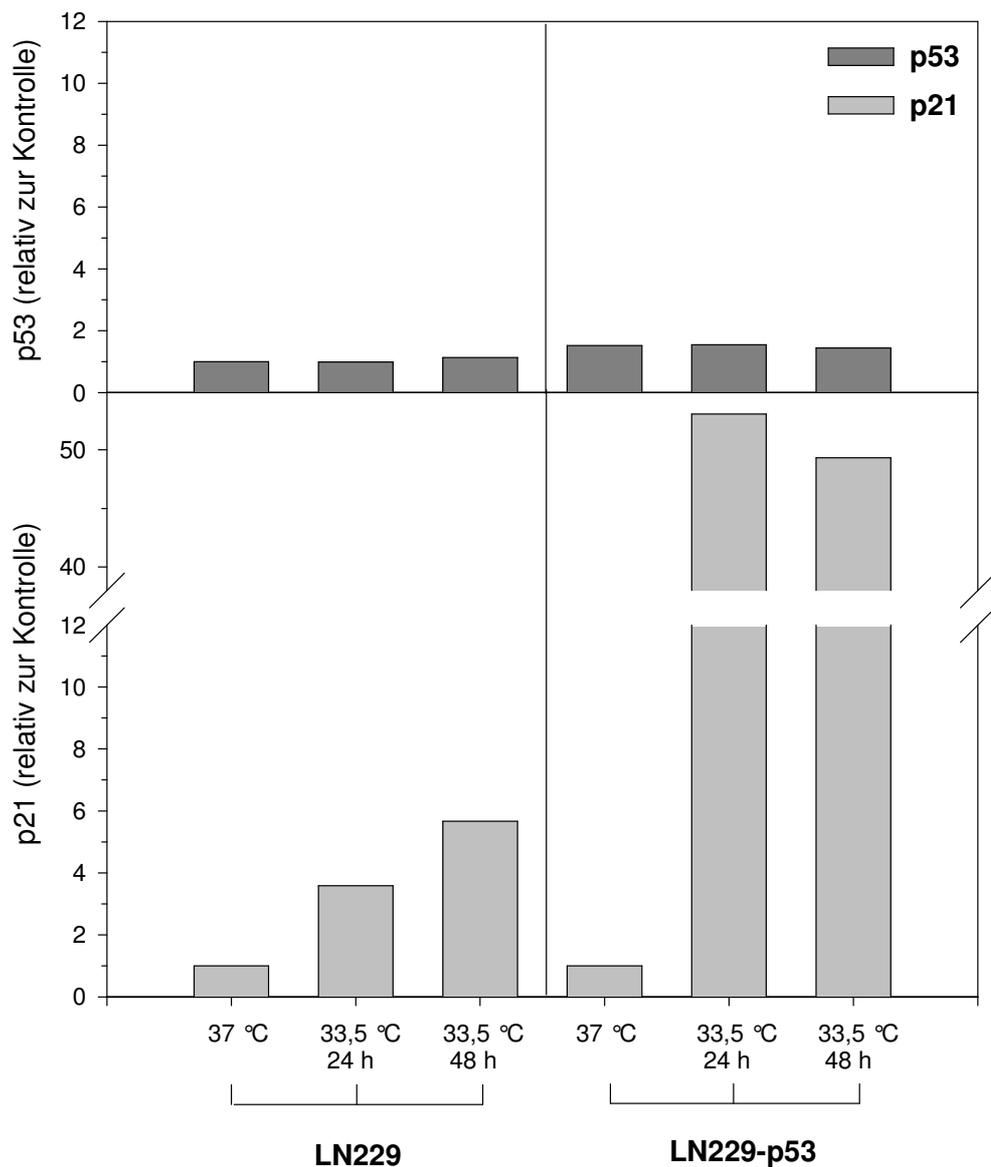
#### 4.6. Expression von p53 und p21 bei 33,5 °C in LN229- und LN229-p53-Zellen

Um den alleinigen Einfluss der erniedrigten Temperatur auf die Expression der Proteine p53 und p21 zu untersuchen, wurde ein zusätzlicher Western Blot durchgeführt, der diese Proteine bei 37 °C und bei 33,5 °C 24 h und 48 h nach dem Temperaturwechsel untersuchte. Aus technischen Gründen war eine Einstellung der Umgebungstemperatur auf 32,5 °C nicht möglich, weshalb die Versuche bei 33,5 °C gemacht wurden. Die Ergebnisse sind Abb. 4.26 und Abb. 4.27 dargestellt. Es zeigte sich, dass sich in beiden Fällen keine Veränderung von p53 bei den verschiedenen Temperaturen ergab. Die Banden waren lediglich bei den transfizierten LN229-p53-Zellen insgesamt stärker ausgeprägt (maximal um das 1,6-fache).

Ein Unterschied in der Menge des exprimierten Proteins als mutante Form (37 °C) und als Wildtyp-Form (33,5 °C) ergab sich nicht.



**Abb. 4.26** Die Abbildung zeigt die Banden der verschiedenen nachgewiesenen Proteine für LN229- und LN229-p53-Zellen bei 37 °C und 33,5 °C, wie sie bei der Detektion auf dem verwendeten Film zur Darstellung kamen. Die etwa immer gleich ausgeprägten β-Aktin-Banden zeigten an, dass man von einer immer gleich hohen aufgetrennten Proteinmenge ausgehen konnte. Für p53 ließ sich weder bei den LN229- noch den LN229-p53-Zellen eine durch die erniedrigte Temperatur bedingte Veränderung des Proteins erkennen. Insgesamt waren die Banden für p53 bei den transfizierten Zellen stärker ausgeprägt. Sowohl in den LN229- als auch den LN229-p53-Zellen erhielt man für p21 bei 33,5 °C stärkere Banden als bei 37 °C. Man kann erkennen, dass dieser Effekt bei den transfizierten Zellen stärker ausgeprägt war.



**Abb. 4.27** Die Balken der Abbildung zeigen den relativen Gehalt der verschiedenen Proben von p53 im oberen und p21 im unteren Teil der Abbildung. Als Kontrolle diente sowohl bei den LN229- als auch den LN229-p53-Zellen die Menge des betreffenden Proteins in den LN229-Zellen bei 37 °C. In den LN229-p53-Zellen war bei 37 °C keine Darstellung des p21-Proteins in verwertbarem Umfang möglich, weshalb auch hier dieser Bezugspunkt gewählt wurde. Bereits in den LN229-Zellen ließ sich ein deutlicher Anstieg von p21 durch den Wechsel zur niedrigeren Temperatur ohne einen entsprechenden Anstieg von p53 zeigen. Dieser Effekt war gleichsinnig in den LN229-p53-Zellen zu erkennen, jedoch deutlich stärker ausgeprägt. Auch hier fehlte eine Zunahme von p53.

Offensichtlich ohne direkte Abhängigkeit von p53 erfolgte die Expression von p21, die in beiden Fällen in Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur stand. In den LN229-Zellen war im Vergleich zu 37 °C die Menge von p21 nach 24 h bei 33,5 °C 3,6-fach und nach 48 h 5,7-fach erhöht. Da in den LN229-p53(mt)-Zellen bei 37 °C mit der verwendeten Methode

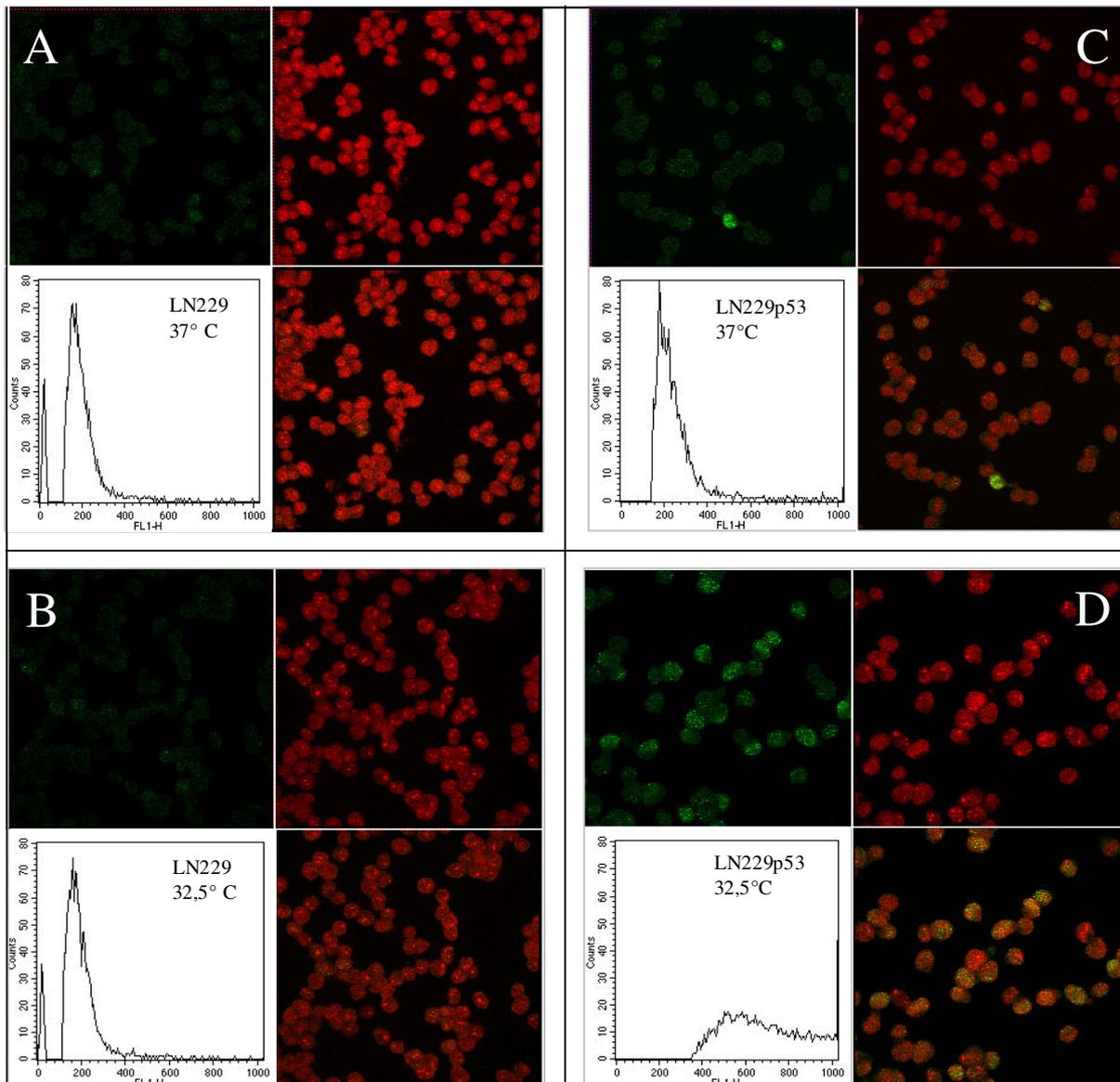
kein verwertbares Signal für p21 erzielt werden konnte, wurde die Zunahme des Proteins für LN229-p53(wt) bei 33,5 °C ebenfalls relativ zur Menge in den LN229-Zellen bei 37 °C berechnet. Hierbei ergab sich eine Erhöhung auf das 53-fache Niveau des Ausgangswertes nach 24 h und das 49,3-fache nach 48 h.

Zusammenfassend war in beiden Zelllinien kein Einfluss der Temperatur auf die Expression von p53 zu erkennen, wobei die Gesamtmenge des Protein in den transfizierten Zellen sowohl als Mutante bei 37 °C und als Wildtyp bei 33,5 °C gleich war und höher lag als in den LN229-Zellen. Für das Protein p21 ergab sich für die LN229- und die LN229-p53-Zellen eine Zunahme bei 33,5 °C gegenüber 37 °C. Dieser Effekt war in der transfizierten Zelllinie deutlich stärker ausgeprägt.

#### **4.7. Nachweis von p21 in LN229- und LN229-p53-Zellen bei 37 °C und 33,5 °C mit Immunfluoreszenz**

Beim Auszählen der p21-positiven Zellen am Präparat unter dem Mikroskop zeigte sich bei den LN229-Zellen eine Zunahme von 2,4 % bei 37 °C auf 4,3 % bei 32,5 °C. Demgegenüber stand eine deutlichere Zunahme des Proteins bei den LN229-p53-Zellen. Hier fand sich bei 37 °C und dem temperatursensitiven p53val<sup>135</sup> in mutanter Konfiguration ein Anteil p21-positiver Zellen von 10,7 %, der beim Temperaturwechsel nach 32,5 °C und p53val<sup>135</sup> als Wildtyp auf den fast 10-fachen Wert von 95,0 % der Zellen zunahm.

Bei der durchflußzytometrischen Betrachtung wurden bei den LN229-Zellen bei 37 °C 10,77 % der Zellen als p21-positiv gezählt, beim Absenken der Temperatur auf 32,5 °C ergab sich eine minimale Zunahme auf 11,17 %. Bei der transfizierten Zelllinie stellten sich bei 37 °C 29,01 % der Zellen als positiv dar, beim Wechsel auf 32,5 °C waren es 78,75 %. Während in den LN229-Zellen die prozentuale Menge der p21-positiven Zellen und die Intensität der spezifischen Fluoreszenz in der Einzelzelle, also die Menge des Proteins in der Einzelzelle, beim Absenken der Temperatur nur wenig aber dennoch in messbarem Umfang zunahm, sah man in den LN229-p53-Zellen eine sehr deutliche Zunahme des Anteils p21-positiver Zellen. Auch nahm die Fluoreszenzintensität als Maß für p21 in der Einzelzelle sehr viel stärker zu als in der ursprünglichen Zelllinie.



**Abb. 4.28:** Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche. Die großen Quadrate A (37 °C) und B (32,5 °C) zeigen die Ergebnisse für die LN229-Zellen, C (37 °C) und D (32,5 °C) die für LN229-p53-Zellen. Die beiden oberen kleinen Quadrate zeigen jeweils links die grüne Fluoreszenz des p21, rechts daneben die rote des Ethidiumbromids zur Markierung aller vorhandenen Zellen. Darunter rechts ist das entsprechende Ergebnis der Durchflusszytometrie dargestellt, links davon das Bild des Zytopreparates im „overlay“ der p21-Fluoreszenz mit der des Ethidiumbromids. Bei Betrachtung der grünen p21-Fluoreszenz erkennt man die leichte Zunahme bei den LN229-Zellen von 37 °C auf 32,5 °C. Derselbe Effekt in deutlich stärkerer Ausprägung zeigt sich bei den LN229-p53-Zellen. Anhand der durchflußzytometrischen Versuche erkennt man, dass in dieser Zelllinie die Intensität der Fluoreszenz der Einzelzelle deutlich zunimmt (von etwa 200 auf ca. 500 rE). Bei den LN229-Zellen ist dieser Effekt nur in geringem Umfang zu sehen.

#### 4.8. Tabellarische Ergebnisübersicht

Eine zusammenfassende Darstellung aller bisherigen Ergebnisse ist der Tabelle 4.1 und 4.2 zu entnehmen.

LN229 p53- Status	Allgemeine und radiobiologische Charakteristika					Apoptose							Proliferation				
	Vita- lität	Ver- dopp- lungs- zeit 1-3 d (h)	D <sub>0</sub> (Gy)	D <sub>q</sub> (Gy)	SF <sub>2</sub>	Apoptose- freq.: 0-10 Gy	spont. Apoptose- freq. gegen die Zeit	Apoptose 8 Gy / 0 Gy	p53, 8 Gy	Bax, 8Gy	Bcl-2, 8 Gy	Casp. 8 Gy / 0 Gy	p21, 8 Gy	G1- Block: 2 Gy	G2- Block, 2 Gy 6-12 h p.r	G1- Block: 0-10 Gy	G2- Block: 0-10 Gy 18 h p.r.
<b>Abb.</b>	4.1	4.2	4.4	4.4	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.10	4.12	4.14	4.16	4.18-22	4.18-22	4.25	4.25
<b>+</b> untransfiziert (37 °C)	~ 87%	22,3 h	1,1	1,8	0,55	x 4,1	n.n.	x 13,9	x 2,3	x 8,9	k.v.	x 3,1	x 63,0	n.n	x 2,0 über 6h	n.n.	x 2,6
<b>-</b> transfiziert, mt (37 °C)	~ 85 %	24 h	1,2	1,9	0,63	x 4,3	x 15,4	x 2,5	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	n.n.	n.n	x 1,5 über 6h	n.n.	x 1,8
<b>++</b> transfiziert, wt (32,5 °C)	~ 83 %	kein Wachs- tum (190,5 h)	n.b.	n.b.	n.b.	k.V.	n.n.	k.V.	k.V.	x 3,5	k.V.	k.V.	k.V.	n.b	n.b.	n.b.	n.b.
<b>+</b> un- transfiziert (32,5 °C)	~ 88 %	61,7 h															

**Tab. 4.1:** Übersicht über die Ergebnisse. k.V. = keine Veränderung; n.b. = nicht beurteilbar; n.n. = nicht nachweisbar; - = mit mutantem p53; + = mit funktionellem p53; ++ = überexprimiertes funktionelles p53

LN229 untransfiziert				LN229-p53			
Western Blot (Abb. 4.26 - 4.27)		p21 in der Immunfluoreszenz (durchflußzytometrisch) (Abb. 4.28)		Western Blot (Abb. 4.26 - 4.27)		p21 in der Immunfluoreszenz (durchflußzytometrisch) (Abb. 4.28)	
p53	p21	Veränderung der Intensität der Einzelzelle gegenüber 37 °C	zusätzlich positive Zellen gegenüber 37 °C	p53	p21	Veränderung der Intensität der Einzelzelle gegenüber 37 °C	zusätzlich positive Zellen gegenüber 37 °C
k.V.	x 3,6	k.V.	0,40%	k. V.	x 53,0	300 rE	49,74%

**Tab. 4.2:** Übersicht über die Veränderungen hinsichtlich p21 und p53 24 h nach dem Temperaturwechsel von 33,5 °C auf 37 °C.  
k.V. = keine Veränderung

## 5. Diskussion

Als Orientierung für die folgende Diskussion sollen Tab. 4.1 und 4.2 dienen. Für die LN229-Zellen ergab sich über einen Zeitraum von 14 Tagen eine gleich bleibend hohe Vitalität von über 87 % lebendiger Zellen, so dass sich über den Zeitraum der durchgeführten Versuche die Bedingungen in dieser Hinsicht nicht veränderten. Mit einer Verdoppelungszeit von 22,3 h lagen die Zellen im Bereich eines üblichen Wertes für in vitro kultivierte Zellen (Abb. 4.1 und 4.2). Als Basisparameter der Strahlenempfindlichkeit der Zellen ergab sich  $D_q$  als Parameter der Reparaturfähigkeit mit 1,8 Gy.  $D_0$  als Maßstab der intrinsischen Strahlensensibilität ergab sich mit 1,1 Gy. Der relative Anteil an Zellen, die nach Applikation von 2 Gy noch fähig zur Proliferation und Klonbildung waren, also die  $SF_2$ , betrug 0,55 (Abb. 4.4). Bei der Betrachtung der durch Bestrahlung induzierten Apoptose in dieser Zelllinie 48 h p.r. ergab sich eine Abhängigkeit von der Dosis, die kontinuierlich bis zur Maximaldosis von 10 Gy anstieg (Abb. 4.5). Bei der Betrachtung im Verlauf über 96 h ergab sich in den LN229-Zelle eine konstant niedrige Apoptosefrequenz in unbestrahlten Zellen, so dass keine spontane Induktion von Apoptose ersichtlich war. Erst nach Bestrahlung mit 8 Gy nahm die Apoptosefrequenz relativ zur unbestrahlten Kontrolle ab 24 h kontinuierlich bis zum Versuchsende nach 96 h zu (Abb. 4.6). Bereits 12 h p.r. kam es zu einer Zunahme des Gehaltes an p53 in den Zellen auf über das Doppelte des Ausgangswertes, und aufgrund des Vergleiches mit der unbestrahlten Kontrolle nach 24 h ist von einer Strahleninduktion des Proteins auszugehen (Abb. 4.8. und 4.9) Gleichzeitig kam es zur Zunahme von Bax als proapoptotischem Faktor in den Zellen, wobei Bax im weiteren Verlauf kontinuierlich bis 72 h p.r. zunahm. Einen Tag nach Bestrahlung mit 8 Gy hatte die Menge dieses Proteins im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle zugenommen, wenn auch nicht signifikant (Abb. 4.10 und 4.11). Im selben Zeitraum blieb der Gehalt an Bcl-2 der Zellen unverändert (Abb.4.12 und 4.13). Eine Strahlenabhängigkeit zeigte sich nicht. Die bei der untransfizierten LN229-Zelllinie beobachteten Phänomene erschienen somit in Einklang mit dem allgemein in der Literatur postulierten Weg, der zur durch Strahlung ausgelösten Apoptose führt, zu stehen (Kirsch et al., 1998, S.3159; El-Deiry, 1998, S.234). Folgt man dieser üblichen Ansicht, so hatte die Applikation von 8 Gy zu einer Stabilisierung und somit einer Zunahme von p53 geführt. Dadurch war dieses Protein möglicherweise in der Lage, seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor wahrzunehmen und führte so zur Zunahme von Bax. Es kam zwar zeitgleich nicht zu einem Abfall des antiapoptotischen Bcl-2. Da aber Bcl-2 auch nicht zunahm, ergab sich eine Verschiebung des Verhältnisses von Bax / Bcl-2 zugunsten von Bax

und somit zum Überwiegen des proapoptotischen Signals. Da eine strahlenabhängige Zunahme des Anteils von Zellen mit Caspaseaktivität (Abb. 4.14) verzeichnet werden konnte, scheint das beschriebene proapoptotische Signal zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade geführt zu haben. Dies führte schließlich zur Auslösung der beobachteten Apoptose nach Bestrahlung. Über die Zunahme von p53 nach Bestrahlung und dessen Eigenschaft als Transkriptionsfaktor kam es außerdem zur Zunahme des an der Regulierung des Zellzyklus beteiligten Proteins p21. Dessen Zunahme erfolgte gleichmäßig bis zum Maximalwert 24 h p.r.. Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Menge an p21 etwa dem 63 - fachen des Ausgangswertes. Eine strahleninduzierte Zunahme nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle war in diesem Fall eindeutig. Trotzdem führte dieses Protein nicht zu einer Ausbildung einer Blockierung im Zellzyklus in der G1-Phase nach Bestrahlung, eine Funktion, die diesem Protein eigentlich zugeschrieben wird. Eine solche Blockierung konnte weder nach 2 Gy Bestrahlung und Betrachtung eines feinen zeitlichen Rasters noch nach Bestrahlung mit verschiedenen höheren Dosen in einem größerem zeitlichem Raster festgestellt werden (Abb. 4.18, 4.20 und 4.24). Offensichtlich scheint den LN229-Zellen dieser Mechanismus zu fehlen. Die Zellen zeigten jedoch eine Blockierung ihres Zellzykluses in der G2-Phase, die nach 2 Gy im Zeitraum von 6 – 12 h p.r. deutlich wurde. Bei der Bestrahlung mit höheren Dosen zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme dieses Effektes, wobei dessen maximale Ausprägung 18 h p.r. zu erkennen war, um sich anschließend aufzulösen (Abb. 4.19 und 4.24). In der Literatur wird über eine Einflussnahme von p21 auch am Zellzykluskontrollpunkt am Übergang von der G2-Phase zur Mitose berichtet (Maeda et al., 2002, S. 519). Da aber wie aus Tab. 4.1 ersichtlich die beobachteten Reaktionen in den LN229-p53(mt)-Zellen, in denen kein p21 nachweisbar war und die kein funktionelles p53 innehatten, nur wenig schwächer ausgeprägt waren als bei den LN229-Zellen, scheint es sich hier um durch andere Mechanismen beeinflusste Reaktionen der Zellen gehandelt zu haben. Diese können eventuell p53 – abhängig ablaufen, was ebenfalls in der Literatur beschrieben wird (Hwang et al., 1998, S. 56). Eine andere Interpretationsmöglichkeit besteht darin, dass der Einfluss von p53 und der transkriptionell dadurch beeinflussten Proteine hier nicht der ausschlaggebende Faktor gewesen ist. Betrachtet man den zeitlichen Rahmen von Apoptose und Blockierung in der G2-Phase kommt man zu dem Schluss, dass es unter Umständen mit Auflösung der Zellzyklusblockierung und anschließender Mitose zur sogenannten postmitotischen Apoptose kam, ein Ablauf wie er von Shinomiya beschrieben wurde (Shinomiya, 2001, S.244). Es ist jedoch auch möglich, dass Zellen der LN229-Zelllinie, die so stark geschädigt waren, dass sie

nicht im Rahmen des G2-Blockes repariert werden konnten, im Anschluss noch vor der Mitose durch Apoptose aus der Zellpopulation eliminiert worden sind.

Bei den LN229-p53(mt)-Zellen, also bei 37 °C und dem p53 des Vektors in der nicht funktionellen, mutanten Konfiguration, ergab sich eine gleich gute Vitalität wie bei den LN229-Zellen. Über 85 % der Zellen waren über einen Zeitraum von 14 Tagen vital, so dass auch hier im zeitlichen Rahmen der durchgeführten Versuche von gleichen Bedingungen auszugehen ist. Auch die Verdoppelungszeit der Zellen mit 24 h unterschied sich nur wenig von der der untransfizierten Zellen (Abb. 4.1 und 4.2). Die von Trepel et al. beschriebene leichte Einschränkung der Proliferation in den mit p53val<sup>135</sup> transfizierten LN229-Zellen bei 37 °C konnte somit nicht verifiziert werden (Trepel et al., 1998, S. 22). Kein Unterschied fand sich auch bei den Basisparametern zur Charakterisierung des Verhaltens der Zellen nach Bestrahlung. Weder  $D_q$  mit 1,9 Gy noch  $D_0$  mit 1,2 Gy unterschied die LN229-p53(mt)-Zellen von den LN229-Zellen. Lediglich die  $SF_2$  lag mit 0,63 etwas höher als bei den LN229-Zellen (Abb. 4.4). Bei der Abhängigkeit der Apoptosefrequenz von der applizierten Dosis sah man auch hier eine Steigerung mit der Dosis. Das Ausmaß der beobachteten Apoptose lag insgesamt etwas über dem der LN229-Zellen. Trotzdem ergab sich hier nur eine Steigerung um das 4,3-fache nach 10 Gy gegenüber der Kontrolle. Im Gegensatz zu den LN229-Zellen war allerdings in den LN229-p53(mt)-Zellen bereits eine deutliche spontane Apoptosefrequenz der unbestrahlten Zellen mit der Zeit zu erkennen. Nach 96 h lag dieser Wert 15,4-mal so hoch als zum Zeitpunkt 0 h. Deshalb ergab sich trotz höherer absoluter Apoptosefrequenz der LN229-p53(mt)-Zellen gegenüber den LN229-Zellen nur eine geringere relative Zunahme der Apoptose nach 8 Gy gegenüber der Kontrolle um das 2,5-fache (Abb. 4.5 – 4.7). p53 zeigte sich nach Bestrahlung mit 8 Gy über 72 h nicht erhöht gegenüber dem 0 h-Wert. Auch beim Vergleich mit der Kontrolle nach 24 h konnte keine eindeutige strahleninduzierte Zunahme des Proteins gezeigt werden (Abb. 4.8 und 4.9). Da die Werte der Dichtemessung der Banden als Maß für den absoluten Gehalt an diesem Protein aber etwa 1,6 - fach höher lagen als in den LN229-Zellen (Abb. 4.26), ist von einer basalen Überexpression des mutanten Proteins auszugehen. Da weder Bax noch Bcl-2 im zeitlichen Verlauf sowie durch Bestrahlung in der Stärke ihrer Expression signifikant verändert wurden bzw. die Veränderung allenfalls gleichsinnig erfolgte und sich das Verhältnis der Proteine zueinander nicht änderte (Abb. 4.10 – 4.13), kann der oben erläuterte Mechanismus für die LN229-Zellen zur Auslösung der Apoptose in dieser Zelllinie nicht angenommen werden. Auch Trepel et al. hatten in ihrer Arbeit mit LN229 – Zellen bereits festgestellt, dass p53val<sup>135</sup> in mutanter Konfiguration in dieser Zelllinie keine Veränderungen von p53 – Zielproteinen

bewirkte und somit bei 37 °C nicht als Transkriptionsfaktor fungierte (Trepel et al., 1998, S. 28). Auch der Anteil Zellen, die hinsichtlich ihrer Caspasen als positiv bewertet wurden, wurde nicht durch Bestrahlung mit 8 Gy beeinflusst. Dass der basale Anteil Caspase-positiver Zellen in der Kontrolle höher lag als bei den LN229-Zellen korrelierte in den LN229-p53(mt)-Zellen mit der hohen spontanen Apoptosefrequenz (Abb. 4.14). Wie diese Beobachtungen mit der Überexpression des mutanten p53 des Vektors zusammenhängt, bleibt zu klären. Einen möglichen Erklärungsversuch lieferten Weller sowie Guillouf et al. Ersterer nimmt einen Funktionszugewinn durch Akkumulation des mutanten p53val<sup>135</sup> bei 38 °C in der Zelle an. Auf diese Weise soll es zu einer erhöhten Chemosensibilität gegenüber bestimmten Substanzen kommen (Weller, 1998, S. 442). Möglicherweise lässt sich ähnliches auf das Verhalten nach Bestrahlung übertragen. Guillouf et al. berichteten in diesem Zusammenhang von der Zunahme strahlungsinduzierter Apoptose in einer Leukämiezelllinie bei nicht permissiver Temperatur. Man machte in dieser Arbeit Apoptose – induzierende Teile des p53val<sup>135</sup> – Proteins, die nicht im Bereich der Mutation lagen, zusammen mit Akkumulation des mutanten Proteins für dieses Phänomen verantwortlich (Guillouf et al., 1998, S. 107). Da in der vorliegenden Arbeit aber keine Veränderung von Bax, Bcl-2 oder der Aktivität der Caspasen nachgewiesen werden konnte, müssten andere Signalwege, die nicht Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen waren, für das Zustandekommen der Apoptose verantwortlich sein.

Es konnte in den LN229-p53(mt) - Zellen kein p21 mit der verwendeten Methode nachgewiesen werden. Deswegen können die beobachteten Effekte der Bestrahlung auf den Zellzyklus auch nicht darauf zurückgeführt werden. Auch in den LN229-p53(mt)-Zellen zeigte sich keine Blockierung in der G1-Phase, sondern lediglich in der G2-Phase des Zellzykluses. Wiederum war der G2-Block im Bereich 6 h – 12 h p.r. nach 2 Gy zu erkennen, und auch hier sah man eine dosisabhängige Zunahme mit maximaler Ausprägung des Effektes 18 h nach Bestrahlung (Abb. 4.24 und 4.25). Somit verhielten sich LN229-Zellen und die transfizierten Zellen bei 37 °C und somit mutanter Konfiguration hinsichtlich des Einflusses von Bestrahlung auf den Zellzyklus weitgehend gleich. Die etwas stärkere Blockierung in den untransfizierten Zellen könnte eventuell auf eine durch das strahlenabhängig induzierte p21 wahrgenommene Funktion am G2-Kontrollpunkt zurückgeführt werden. Dies wurde von Maeda et al. für Keratinozyten beschrieben (Maeda et al., 2002, S. 519).

Aus dem Unterschieden im p53 – Status und dem Apoptoseverhalten dieser beiden Zelllinien ergaben sich keine Konsequenzen für die anhand der Klonogenität in den Dosis-Effekt-Kurven bestimmte Strahlenempfindlichkeit: Betrachtet man die Dosiseffektkurven beider

Fälle (Abb. 4.4) sah man kaum Unterschiede, was sich in den etwa gleich hohen Werten für  $D_q$ ,  $D_0$  und die  $SF_2$  widerspiegelte. Insbesondere lagen auch die Werte nach 8 Gy in den Dosis-Effekt-Kurven gleich hoch (Abb. 4.4). Das legte nahe, dass sich die deutlich höhere absolute Apoptosefrequenz nach 8 Gy (also unter Einbeziehung der spontanen Apoptosefrequenz dieser Zelllinie) bei den LN229-p53(mt)-Zellen (vgl. Abb. 4.6) nicht auf das Langzeitüberleben der Zellpopulation nach ionisierender Strahlung auswirkte. Der unterschiedliche p53-Status zeigte somit zwar auf das Apoptoseverhalten der beiden Zelllinien Einfluss, jedoch wirkte sich dieser Unterschied nicht auf radiobiologische Parameter wie  $D_0$ ,  $D_q$  oder  $SF_2$  aus. Diese Ergebnisse stützen bereits in der Literatur beschriebene Thesen. Brown et al. verglichen Studien, in denen der Einfluss des p53 – Status auf die Dosis – Effekt – Kurve nach ionisierender Strahlung in soliden Tumorzelllinien untersucht wurde. Sie kamen zu dem Schluss, dass die vorhandenen Daten dafür sprächen, dass weder der p53 - Status noch die Fähigkeit zur Apoptose eine signifikante Rolle hinsichtlich der Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung, gemessen im Klonogenitätsassay, spielen würden (Brown et al., 1999, S. 1397 – 1398). Dass Apoptose beim Langzeitüberleben von Zellen nach Bestrahlung keine Rolle zu spielen scheint, wurde ebenfalls bereits in anderen Studien festgestellt (Cohen - Jonathan et al., 1999, S. 78; Rudner et al., 2001, S. 1). Es existieren aber durchaus auch Belege dafür, dass eine positive Korrelation zwischen p53 – Funktion, Apoptose und Klonogenitätsassay besteht. So lieferten Rupnow et al. ebenfalls einen Überblick über eine Vielzahl von Studien mit diesem Thema. Die Autoren kommen hier zu dem Schluß, dass der Beitrag von p53 und Apoptose zum klonogenen Überleben nach Bestrahlung stark vom Zelltyp, dessen genetischer Ausstattung und dem Umgebungsmilieu abhängt. Eine generell gültige Aussage sei daher bis dato nicht möglich (Rupnow et al., 1999, S. 121 – 127). Folgt man der Argumentation von Abend, könnte ein möglicher Ansatzpunkt zur Erklärung der mangelnden Korrelation zwischen Apoptose und klonogenem Überleben – wie auch in der vorliegenden Arbeit zu sehen – in einem dosisabhängigem Shift zwischen verschiedenen Formen des Zelltodes liegen (Abend, 2003, S. 937). Demnach käme es je nach Intensität der Bestrahlung zu einem Wechsel zwischen Apoptose, Nekrose, Mikrokernbildung und anderen Mechanismen. Die Betrachtung der Apoptose als einziger von mehreren Parametern, die Einfluss auf das klonogene Überleben haben, ist somit nicht ausreichend.

Alle Ergebnisse für die LN229-p53(wt)-Zellen (32,5 °C, p53 in wt-Konfiguration) deuteten darauf hin, dass es in dieser Zelllinie zu einem Erliegen der Proliferation kam. Zwar starben die Zellen bei der erniedrigten Temperatur nicht ab, was die mit den anderen beiden Zelllinien

vergleichbare Vitalität zeigte (Abb. 4.1). Wachstum im Sinne einer Zunahme der Zellzahl war jedoch so gut wie nicht mehr vorhanden (Abb. 4.2), was auch die rechnerische, theoretische Verdoppelungszeit von über 190 h zeigte. Dieses Verhalten deckt sich mit dem von Trepel et al. für diese Zellen beschriebenem: reversibler Wachstumsstillstand ohne Vitalitätsverlust (Trepel et al., 1998, S. 28). Das mangelnde Zellwachstum führte dazu, dass keine Dosis-Effekt-Kurven und somit auch nicht die sich daraus ergebenden Basisparameter zur Strahlenempfindlichkeit ermittelt werden konnten. Apoptose konnte bei den LN229-p53(wt)-Zellen durch Bestrahlung nicht ausgelöst werden (Abb. 4.5 und 4.7), obwohl es zu einer Zunahme von Bax bei unverändertem Bcl-2-Gehalt kam (Abb. 4.10 und 4.12). Auch Trepel et al. fanden hier eine Induktion von Bax, aber keine Apoptose durch p53val<sup>135</sup> bei permissiver Temperatur in LN229 – Zellen (Trepel et al., 1998, S. 28). Offensichtlich ändert sich dieses Verhalten auch nach Bestrahlung nicht. Die p53-Expression ließ sich ebenfalls nicht durch Bestrahlung beeinflussen (Abb. 4.8). Das durchgehend hohe Aktivitätsniveau der Caspasen (Abb. 4.14) führte bei diesen Zellen nicht zur Apoptose. Es zeigte sich eine deutliche Überexpression von p21 bei Betrachtung der densitometrisch ermittelten Dichtewerte der Banden im Western Blot (Abb. 4.26 und 4.27). Diese war auch in den Versuchen zur in situ – Immunfluoreszenzmarkierung erkennbar (Abb.4.28). Es erfolgte eine deutliche Zunahme von p21 mit dem Temperaturabfall von 38 °C auf 32,5 °C bzw. 33,5 °C. Eine solche Zunahme war bei den ursprünglichen LN229-Zellen nicht in diesem Ausmaß zu sehen. Das beschriebene Phänomen konnte nicht auf vermehrte Expression von p53 zurückgeführt werden (Abb. 4.9). Die p21-Überexpression könnte zum Stillstand des Zellzykluses der Zellen und zum Aussetzen der Proliferation geführt haben. Dies wurde schon von Chen et al in einer Fibroblasten-Zelllinie beschrieben (Chen et al, 2002, S. 230/231). Da in der vorliegenden Arbeit nur p21 untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Effektoren des Zellzykluses wie GADD45 oder 14-3-3-σ, die am G2 / M-Kontrollpunkt angreifen und zum G2-Block führen, vermehrt exprimiert wurden und ihren Einfluss auf den Zellzyklus ausübten. Der Proliferationsstillstand spiegelte sich auch in den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse mittels BrdU - / DNA - Doppelmarkierung wider. Bei Betrachtung der DNA-Markierung fanden sich konstante Anteile von Zellen für die verschiedenen Zellzyklusphasen (Abb. 4.23). Zum anderen bauten die Zellen nur sehr wenig BrdU in ihr Erbgut ein, was für eine geringe DNA-Syntheserate spricht. Diese BrdU – markierten Zellen zeigten kein Fortschreiten durch den Zyklus. Möglicherweise kam es durch das überexprimierte p21 zu einer Einflussnahme sowohl am G1- als auch am G2 / M-Kontrollpunkt, so dass es zu einer Blockierung in beiden Phasen kam, wie sie für p53 val<sup>135</sup>

bereits von Stewart et al. angenommen wurde (Stewart et al., 1995, S. 113). Der Zyklus wurde also anscheinend nicht durchlaufen, weshalb auch kein Bestrahlungseffekt bei verschiedenen Dosen im Sinne der Ausbildung einer Blockierung in einer der Phasen erkennbar wurde. In dieser Zelllinie konnte somit keine Aussage über die längerfristige Strahlenempfindlichkeit, wie sie über die Dosis-Effekt-Kurven ermittelt wird, gemacht werden. Da hinsichtlich des Zellzyklus sowie der Apoptose keine strahlenabhängigen Effekte beobachtet werden konnten, könnte man von einer „Pseudoresistenz“ (Trepel et al., 1998, S. 28) gegen die Bestrahlung ausgehen, die durch den Proliferationsstillstand bedingt wird. p21 wurde wegen dieses Verhaltens bereits auch als „Pseudoprotektionsfaktor“ gegen Apoptose bezeichnet (Dotto, 2000, S. 47). Ob die beobachtete Überexpression von p21 bei erniedrigter Umgebungstemperatur jedoch als ein über p53val<sup>135</sup> vermitteltes Phänomen, wie bisher für LN229 – Zellen mit p53 val<sup>135</sup> und andere Zelllinien mit temperatursensitiven Vektoren angenommen (Trepel et al., 1998, S. 21 – 29; Weller, 1998, S. 441 – 442; Pollock et al., 1998, S. 1989 - 1990), zu interpretieren ist, ist zu hinterfragen. Wie bereits in den Versuchen zur Platingeffizienz von LN229-Zellen bei 32,5 °C ohne Bestrahlung (Abb. 4.3) zu erkennen war, kam es auch bei diesen Zellen zu einer merklichen Einschränkung der Klonogenität. Offensichtlich stellten bereits etwa 70 % der nicht transfizierten Zellen bei dieser Temperatur ihre Proliferation ein. Es zeigte sich, dass auch in diesen Zellen die Erniedrigung der Umgebungstemperatur zu einer Zunahme des im Western Blot detektierten p21 führte, ohne dass eine Korrelation mit der Menge des detektierten p53 festgestellt werden konnte (Abb. 4.26 und 4.27). Dieser Anstieg war weniger deutlich ausgeprägt als bei den transfizierten Zellen bei erniedrigter Temperatur. Ebenso sah man bei der Untersuchung des Verhaltens der Einzelzelle mittels Immunfluoreszenz gegen p21, dass ein Teil der LN229 – Zellen ohne Vektor eine deutliche Induktion von p21 bei 33,5 °C zeigten (Abb. 4.28). Somit kann angenommen werden, dass es sich bei der p21-Hochregulation und Proliferationsstillstand bei 32,5 °C bzw. 33,5 °C um ein in einem bestimmten Subtyp der LN229-Zellen immanentes Phänomen handelte. Eine mögliche Erklärung für den totalen Proliferationsstillstand der LN229-p53(wt)-Zellen (32,5 °C) findet man somit in einer zufälligen Generierung der transfizierten Zelllinie aus einer LN229-Einzelzelle, die auf Absenkung der Temperatur eben mit dem geschilderten Verhalten – Zunahme von p21 - reagierte. Man könnte deshalb die Beobachtungen für die transfizierte Zelllinie nicht auf die Wirkung von p53val<sup>135</sup> oder den p53 Wildtyp, sondern auf die im Rahmen der Transfektion stattgefundenen, zufälligen Selektion einer Subpopulation von LN229-Zellen, die bereits im nicht transfizierten Zustand auf die erniedrigte Temperatur in analoger Weise reagiert hätten. Zwar wurden in früheren

Studien Versuche sowohl mit p53val<sup>135</sup> transfizierten LN229 - Einzelzellklonen als auch gepoolten Zellen gemacht, um solche Artefakte auszuschließen (Trepel et al., 1998, S. 22; Rieger et al., 1998, S. 2327), jedoch wurde nie das Verhalten auf Einzelzellebene beim Temperaturwechsel betrachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde genau das mittels Immunfluoreszenz gemacht. Um zu eruieren, ob der Proliferationsstillstand sowie die anderen gesehenen Effekte überhaupt auf p21 oder p53 zurückzuführen sind, wäre in weiteren Versuchen eine Blockierung des Proteins mittels Antikörper oder antisense-RNA gegen p21 und p53 denkbar. Falls die Zellen dann in analoger Weise reagieren wie ohne Blockierung, wäre ein von p21 bzw. p53 unabhängiges Verhalten bewiesen. Mit Hilfe von antisense – RNA gegen p53 konnte beispielsweise ein Wachstumsstillstand durch p53val<sup>135</sup> in Mäuseembryofibroblasten bei 32,5 °C aufgehoben und somit der Zusammenhang gezeigt werden (Carnero et al., 2000, S.2236 - 2241). Proliferationsstillstand, nicht vorhandenen Durchlauf durch den Zellzyklus, mangelnde Induktion von Apoptose durch Strahlung könnten bei Ausschluss eines p21 – Einflusses dann unter Umständen auf die durch den Temperaturabfall verlangsamte Kinetik enzymatisch kontrollierter Prozesse zurückgeführt werden. Da es sich sowohl bei der Regulation des Zellzykluses als auch bei der Apoptose um solche enzymatisch regulierten Prozesse handelt, könnte deren Ausfall auf diese Weise begründet werden. Für das unterschiedliche Verhalten von LN229- und LN229-p53(wt)-Zellen bei 32,5 °C könnte die weiter oben gegebene Erklärung in gleicher Weise greifen: die Generierung der transfizierten Zelllinie aus einem Zell-Subtyp, dessen Enzymausstattung besonders empfindlich auf die erniedrigte Umgebungstemperatur reagierte. Da auch in anderen Zelllinien mit p53val<sup>135</sup> ein Wachstumsarrest bei permissiver Temperatur von 32,5 °C festgestellt wurde (Weller, 1998, S. 443), sollte vor weiteren Versuchen auch hier die tatsächliche Wirkung von überexprimierten p53 in wt – Konfiguration sowie der alleinige Einfluss der erniedrigten Temperatur kritisch für jedes Zellsystem überprüft werden.

## 6. Zusammenfassung

Wird eine Zelle ionisierender Strahlung ausgesetzt, werden Prozesse aktiviert, die eine Vielzahl von ineinander greifenden, intrazellulären Mechanismen beteiligen. Ein Weg, dieses Signal umzusetzen, ist der über p53 und seine über die Wirkung als Transkriptionsfaktor nachfolgend aktivierten Proteine. Über diese erfolgt die Kontrolle über das weitere Schicksal der Zelle: Blockierung im Zellzyklus und Reparatur des Schadens oder Apoptose und Zelltod. In dieser Studie sollte der Effekt eines unterschiedlichen p53-Status auf diese strahleninduzierten Vorgänge untersucht werden und ihre Bedeutung für das Langzeitüberleben der Zellen. Hierzu sollte die Strahlenantwort nativer Zellen der humanen Glioblastomzelllinie LN229 mit intaktem p53-Signalweg mit solchen verglichen werden, die mit dem temperatursensitiven Vektor p53val<sup>135</sup> transfiziert waren. Diese exprimierten bei 37 °C eine transdominante mutante Form des Proteins, bei 32,5 °C eine funktionelle Wildtyp-Form. Es wurden für alle drei Fälle Koloniebildungstests als Maß für das Überleben, durchflußzytometrische Messungen zur Ermittlung der Zellzykluskinetik und Apoptosebestimmungen sowie Messungen der Caspaseaktivität bei verschiedenen Strahlendosen vorgenommen. Es erfolgte mittels Western Blot die Analyse der die Apoptose beeinflussenden Proteine Bax und Bcl-2, sowie des Zellzyklusregulators p21 und p53 selbst. Zusätzlich wurde der Effekt der verringerten Temperatur auf die Zellen mittels Western Blot - Analyse von p53 und p21 und p21-Immunfluoreszenz bei 37 °C und 33,5 °C in den nativen und den transfizierten Zellen ohne Bestrahlung untersucht.

Insgesamt ergab sich kein Unterschied zwischen den ursprünglichen LN229-Zellen mit ihrem immanenten, funktionellem p53 und den LN229-p53(mt) ohne intakten p53-Signalweg bei 37 °C hinsichtlich ihrer Strahlensensibilität, ermittelt im Klonogenitätsassay. Der unterschiedliche p53-Status wirkte sich nicht auf das Zellzyklusverhalten hinsichtlich Blockierungen nach Bestrahlung aus. Nur in den nativen Zellen konnte strahleninduziertes p21 nachgewiesen werden, welches aber nicht zum G1-Block führte. Es zeigte sich eine hohe spontane Apoptoserate in LN229-p53(mt) bei 37 °C, die allerdings durch Bestrahlung nur noch geringfügig erhöht wurde. In LN229-Zellen kam es nicht zur spontanen Apoptose, Apoptose ließ sich jedoch durch Bestrahlung über Zunahme von Bax und Caspasen-Aktivierung induzieren. Dieses unterschiedliche Verhalten wirkte sich nicht auf die Dosis-Effekt-Kurven aus. Dies legt nahe, dass die strahleninduzierte Apoptose und spontane Apoptose an sich hier keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben der Zellen haben. Ein zusätzlicher Vergleich mit LN229-p53-Zellen, die p53 in Wildtypkonfiguration bei 32,5 °C

überexprimierten, war nicht möglich, da die transfizierten Zellen bei 32,5 °C nicht proliferierten und somit nicht ihren Zellzyklus durchliefen. Apoptose war mittels Bestrahlung nicht auslösbar. Eine Dosis-Effekt-Kurve konnte so nicht erstellt werden. Inwieweit die mangelnde Proliferation auf die nachgewiesene, basal hohe Expression von p21 zurückzuführen war bleibt zu klären. Da auch ein Teil der nativen LN229-Zellen ihre Proliferation bei 32,5 °C einstellten und auch ein Teil der Zellen einen Anstieg von p21 bei erniedrigter Temperatur zeigten, könnte der beobachtete Stillstand der Zellen auch einem bestimmten Zellsubtyp der LN229-Zelllinie immanent sein und eben dieser Subtyp zufälligerweise bei der Transfektion selektioniert worden seien. Die Frage, was Wirkung des p53-Vektors in Wildtypkonfiguration bei 32,5 °C ist und ob andere Faktoren wie Selektion eines Zellsubtyps bei der Transfektion oder reine temperaturabhängige Phänomene hier eine Rolle spielten, erfordert weitere Untersuchungen. Grundsätzlich sollte bei Versuchen mit temperatursensitiven Mutanten genau untersucht werden, was Wirkung des entsprechenden Gens ist, und was allein auf die veränderte Temperatur zurückzuführen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass der Abfall der Klonogenität bei 32,5 °C in den mit p53val<sup>135</sup> transfizierten Zellen nicht durch Apoptose zu erklären ist. Auch das unterschiedliche Apoptoseverhalten und der unterschiedliche p53-Status von nativen und transfizierten Zellen bei 37 °C hatten keinen Einfluss auf Strahlensensibilität und Langzeitüberleben der Zellen nach Bestrahlung.

## 7. Summary

### **Influence of the p53-status on apoptosis, cell cycle and radiosensitivity after ionizing radiation**

If a cell is exposed to ionizing radiation, several processes are activated, which involve a network of intracellular mechanisms. One way of answering the damage done by radiation is p53, its ability of acting as a transcriptional factor and its transactivated proteins. These proteins decide about the further fate of the cell: stops in the cell cycle, repair or apoptosis.

The aim of this study was investigating the effect of a different p53-status on these radiation-induced processes and their importance for the long-time survival of the cells. In order to do this, the answer to radiation of the native human glioblastoma-celline LN229 with intact p53-pathway was compared to LN229-cells, which were transfected with the temperature-sensitive vector p53val<sup>135</sup> (LN229-p53). The transfected cells exprimated a transdominant mutant form of p53 at 37 °C and a functional wild-type at the permissive temperature of 32,5 °C. For each of these three cases, cell-survival-curves as a measure for radiosensitivity, flowcytometric analysis of the cell cycle, measurement of apoptosis as well as measurement of activity of caspases were made using different doses of  $\gamma$ -radiation. Bax and bcl-2, proteins which control apoptosis, the cell cycle regulating protein p21 as well as p53 itself were analysed by western blot. Additonally, the effect of the reduced temperature on the native and transfected cells was examined by western blot analysis of p53, p21 and immunohistochemistry of p21 without radiation.

Altogether, there was no difference between the native LN229-cells with their immanent, functional p53 and the transfected LN229-p53 (mt) at 37 °C regarding radiosensitivity, measured by cell-survival-curves. The different p53-status did not affect the cell cycle in the sense of showing differences in arrests after radiation. Radiation-induced p21 was only detectable in native LN229-cells, but did not cause an arrest in G1-phase. A high spontaneous rate of apoptosis was seen in LN229-p53(mt)-cells, but after radiation there was only a slight increase of apoptosis. LN229-cells showed no spontaneous apoptosis, but apoptosis was induced in a radiation-dependent way by increase of bax and activation of caspases. This different behaviour did not affect the cell-survival-curves, which supposes, that radiation-induced apoptosis or apoptosis itself does not have an influence on the long-time survival of these cells after radiation. A further comparison with LN229-p53 (wt) at the permissive temperature of 32,5 °C was not possible because the transfected cells did not proliferate or go

through the cell cycle at this temperature. Ionizing radiation was unable to cause apoptosis. Thus, a cell-survival-curve could not be made. The question, if the lack of proliferation was due to the proved basal overexpression of p21 remains uncertain. As also some of native LN229-cells stopped proliferation at 32,5 °C and some of them showed increase of p21 at the lowered temperature, the observed standstill of the cells could also be an immanent reaction in a certain subtype of the LN229-celline. This subtype could accidentally have been selected during the process of transfection. The question if the impact of the p53-vector in wild-type configuration itself was responsible for the standstill of the LN229-p53-cells at 32,5 °C or if other factors like selection of a subtype of cells during the process of transfection or pure temperature-dependent phenonemons played a role, would require further investigation. If experiments with temperature-sensitive mutants are made, there must be a strict distinction between the effect of the transfected protein and the effect of temperature itself.

It could be shown, that the decrease of clonogenicity at 32,5 °C in the with p53val<sup>135</sup> transfected cells with wildtype - p53 overexpressed was not caused by an increase of apoptosis. Also the different behavior regarding apoptosis and the different p53-status of native and transfected cells at 37 °C had no influence on the long-time-survival and radiosensitivity of these cells after irradiation.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abend, M.  
Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy  
*Int J Radiat Biol*, 79 (2003): 927 - 941
  
- Abend, M., van Beuningen, D.  
Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie, Teil I  
*Strahlenther Onkol*, 3 (1998): 156 - 166
  
- Abraham, J.; Kelly, J.; Thibault, P.; Benchimol, S.  
Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analysed by mass spectrometry  
*J Mol Biol*, 295 (2000): 853-864
  
- Adams, P. D., Kaelin, W. G.  
Negative control elements of the cell cycle in human tumors  
*Curr Opin Cell Biol*, 10 (1998): 791 - 797
  
- Aguda, B.D., Tang, Y.  
The kinetic origin of the restriction point in the mammalian cell cycle  
*Cell Prolif*, 32 (1999): 321 – 335
  
- Akyüz, N., Boehden, G.S., Süsse, S., Rimek, A., Preuss, U., Scheidtmann, K.-H., Wiesmüller, L.  
DNA substrate dependance of p53-regulation of double-strand breaks repair  
*Mol Cell Biol*, 22 (2002): 6306 - 6317
  
- Amundson, S. A., Myers, T. G., Fornace, A. J. Jr.  
Roles of p53 in growth arrest and apoptosis: putting the brakes after genotoxic stress  
*Oncogene*, 17 (1998): 3287 - 3299
  
- Antonsson, B., Martinou, J.-C.  
The Bcl-2 protein family  
*Exp Cell Res*, 256 (2000): 50 - 57
  
- Ashcroft, M.; Kubbutat, M.H.G.; Vousden, K.H.  
Regulation of p53 function and stability by phosphorylation  
*Mol Cell Biol*, 3 (1999): 1751-1758
  
- Atsushi, H., Kong, J., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., Mak, T.W.  
DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk-2  
*Science*, 287 (2000): 1824 - 1827
  
- Benchimol, S.  
p53-dependent pathways of apoptosis  
*Cell Death Differ*, 8 (2001): 1049 – 1051

- Bristow, R. G., Benchimol, S., Hill, R. P.  
The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy  
*Radiother Oncol*, 40 (1996): 197 - 223
- Brown, J. M., Wouters, B. G.  
Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents  
*Cancer Res*, 59 (1999): 1391 – 1399
- Brustugun, O. T., Fladmark, K. E., Doskeland, S.O., Orrenius, S., Zhivotovsky, B.  
Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2  
*Cell Death Differ*, 5 (1998): 660 – 668
- Buddecke, E.  
Wachstum und Differenzierung  
In: „Grundriss der Biochemie für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften“  
Buddecke, E., de Gruyter, Berlin-New York, 1994, 9. Auflage, 525 - 526
- Carnero, A., Hudson, J. D., Hannon, G. J., Beach, D. H.  
Loss – of – function genetics in mammalian cells: the p53 tumor suppressor model  
*Nucleic Acids Res*, 28 (2000): 2234 - 2241
- Caspari, T.  
Checkpoints: How to activate p53  
*Curr Biol*, 8 (2000): 315-317
- Chen, X.; Zhang, W.; Gao, Y.F.; Su, X.Q.; Zhai, Z.H.  
Senescence-like changes induced by expression of p21<sup>waf1/cip1</sup> in NIH3T3 cell line  
*Cell Res*, 12 (2002): 229 – 233
- Cohen-Jonathan, E., Bernhard, E. J., McKenne, G. W.  
How does radiation kill cells?  
*Curr Opin Chem Biol*, 3 (1999): 77 - 83
- Dahm-Daphi, J.  
p53: biology and role for cellular radiosensitivity  
*Strahlenther Onkol*, 6 (2000): 278-285
- Dotto, G.P.  
p21<sup>waf1/cip1</sup>: more than a break to the cell cycle?  
*Biochim Biophys Acta*, 1471 (2000): 43 – 56
- Eckardt-Schupp, F., Klaus, C.  
Radiation inducible DNA repair processes in eukaryotes  
*Biochimie*, 81 (1999): 161 - 171
- El-Deiry, W.S.  
The p53 pathway and cancer therapy  
*Cancer J*, 5 (1998): 229 - 236

- Eliyahu, D., Evans, S., Rosen, N., Eliyahu, S., Zwiebel, J., Paik, S.; Lippman, M.  
p53val<sup>135</sup> temperature sensitive mutant suppresses growth of human breast cancer cells  
*Breast Cancer Res Treat*, 30 (1994): 167 – 177
- Dumaz, N.; Meek, D.W.  
Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM-2  
*EMBO J*, 24 (1999): 7002-7010
- Geyer, R.K.; Yu, Z.K.; Maki, C.G.  
The mdm-2 ring-finger domain is required to promote p53 nuclear export  
*Nat Cell Biol*, 2 (2000): 569-573
- Guillouf, C., Rosselli, F., Sjin, R.T. T., Moustacchi, E., Hoffman, B., Liebermann, D. A.  
Role of a mutant p53 protein in apoptosis: characterization of a function independent of transcriptional trans-activation  
*Int J Oncol*, 13 (1998): 107 – 114
- Hwang, A.; Muschel, R.J.  
Radiation and the G2 phase of the cell cycle  
*Radiat Res*, 150 Suppl. (1998): 52-59
- Jabbur, J.R.; Huang, P.; Zhang, W.  
DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and mdm-2 induction in vivo  
*Oncogene*, 19 (2000): 6203-6208
- Jack, M.; Woo, R.A.; Hiaro, A.; Cheung, A.; Mak, T.W.; Lee, P.W.K.  
Chk-2 is dispensable for p53-mediated G1-arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 7 (2002): 9825-9829
- Jasty, R., Lu, J., Irwin, T., Suchard, S., Clarke, M. F., Castle, V. P.  
Role of p53 in the regulation of irradiation induced apoptosis in neuroblastoma cells  
*Mol Genet Metab*, 65 (1998): 155 – 164
- Juven-Gershon, T.; Oren, M.  
Mdm-2: The ups and downs  
*Mol Med*, 5 (1999): 71-83
- Jürgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J. C.  
Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (1998): 4997 – 5002
- Kao, G. D., McKenna, W. G., Maity, A., Blank, K., Muschel, R. J.  
Cyclin B1 availability is a rate-limiting component of the radiation-induced G2 delay in HeLa cells  
*Cancer Res*, 57 (1997): 753 – 758

- Khanna, K. K., Jackson, S. P.  
DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection  
*Nat Genet*, 27 (2001): 247 – 254
  
- Kim, I. A., Yang, Y. J., Yoon, S. C., Choi, I. B., Kay, C. S., Kwon, H. C., Kim, C.M.,  
Joe, Y. A., Kang, J.-K., Hong, Y. K.  
Potential of adenoviral p53 gene therapy and irradiation for the treatment of malignant  
gliomas  
*Int J Oncol*, 19 (2001): 1041 - 1047
  
- Kirsch, D. G.; Kastan, M. B.  
Tumor suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis  
*J Clin Oncol*, 9 (1998): 3158-3168
  
- Lane, D. P., Lain, S.  
Therapeutic exploitation of the p53 pathway  
*Trends Mol Med*, 8 (2002): 38 - 42
  
- Levine, A. J.  
p53, the cellular gatekeeper for growth and division  
*Cell*, 88 (1997): 323 – 331
  
- López-Sáez, J. F., de la Torre, C., Pincheira, J., Giménez-Martín, G.  
Cell proliferation and cancer  
*Histol Histopathol*, 13 (1998) : 1197 - 1214
  
- Maeda, T.; Chong, M.T.; Espino, R.A.; Chua, P.P.; Cao, J.Q.; Chomey, E.G.; Luong, L.;  
Tron, V.A.  
Role of p21Waf-1 in regulating the G1 and G2/M checkpoints in ultraviolet-irradiated  
keratinocytes  
*J Invest Dermatol*, 119 (2002): 513-521
  
- Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J., Levine, A. J.  
Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein  
*Genes Dev*, 5 (1991): 151 – 159
  
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R.,  
Xie, Z.-H., Reed, J.C., Kroemer, G.  
The permeability transitionpore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and  
Bcl-2-related proteins  
*J Exp Med*, 187 (1998): 1261 – 1271
  
- May, P., May, E.  
Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein  
*Oncogene*, 18 (1999): 7621 - 7636
  
- McDonald, E. R. III, El-Deiry, W. S.  
Cell cycle control as a basis for cancer drug development (review)  
*Int J Oncol*, 16 (2000): 871 – 886

- McIlwrath, A. J., Vasey, P. A., Ross, G. M., Brown, R.  
Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity  
Cancer Res, 54 (1994): 3718 - 3722
- Michalovitz, D., Halevy, O., Oren, M.  
Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature – sensitive mutant of p53  
Cell, 62 (1990): 671 – 680
- Milner, J., Medcalf, E.A.  
Temperature-dependent switching between „wild-type“ and „mutant“ forms of p53-val<sup>135</sup>  
J Mol Biol, 216 (1990): 481 – 484
- Moll, U. M., Zaika, A.  
Nuclear and mitochondrial apoptotic pathway of p53  
FEBS Lett, 493 (2001): 65 – 69
- Nakayama, K., Nakayama, K.  
CIP/KIP cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development  
Bioessays, 20 (1998): 1020 – 1029
- Offer, H., Zurer, I., Banfalvi, G., Reha`k, M., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Goldfinger, N., Rotter, V.  
p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress  
Cancer Res, 61 (2001): 88 – 96
- Olive, P. L., Durand, R. E.  
Apoptosis: an indicator for radiosensitivity in vitro?  
Int J Radiat Biol, 71 (1997): 695 - 707
- Pavletich, N. P.  
Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors  
J Mol Biol, 287 (1999): 821 - 828
- Pollock, R., Lang, A. L., Ge, T., Sun, D., Tan, M., Yu, D.  
Wild-type p53 and a temperature-sensitive mutant suppress human soft tissue sarcoma by enhancing cell cycle control  
Clin Cancer Res, 4 (1998): 1985 - 1994
- Porter, A.G.  
Protein translocation in apoptosis  
Trends Cell Biol, 9 (1999): 394 - 401

- Rieger, J., Ständer, M., Löschmann, P. A., Heneka, M., Dichgans, J., Klogether, T., Weller, M.  
Synthesis and biological effects of NO in malignant glioma cells: modulation by cytokines including CD95L and TGF- $\beta$ , dexamethasone, and p53 gene transfer  
*Oncogene*, 17 (1998): 2323 – 2332
- Rudner, J., Belka, C., Marini, P., Wagner, R. J., Faltin, H., Lepple-Wienhues, A., Bamberg, M., Budach, W.  
Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells  
*Int J Radiat Biol*, 1 (2001): 1 - 11
- Rupnow, B. A., Knox, S. J.  
The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiatio therapy  
*Apoptosis*, 4 (1999): 115 - 143
- Salles-Passador, I.; Fotedar, A.; Fotedar, R.  
Cellular response to DNA-damage. Link between p53 and DNA-PK  
*C R Acad Sci III*, 322 (1999) : 113-120
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M.  
Caspases: intracellular signaling by proteolysis  
*Cell*, 14 (1997): 443 - 446
- Schmitt, C., Lowe, S.W.  
Apoptosis and therapy  
*J Pathol*, 187 (1999): 127 – 137
- Schuler, M., Green, D. R.  
Mechanisms of p53-dependent apoptosis  
*Biochem Soc Trans*, 29 (2001): 684 – 688
- Schwartz, D., Rotter, V.  
p53-dependent cell cycle control: responses to genotoxic stress  
*Semin Cancer Biol*, 8 (1998): 325 - 336
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., Paules, R. S.  
Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress  
*Environ Health Perspect*, 107 supp. (1999): 5 – 24
- Sheikh, M. S., Fornace, A. J. Jr.  
Role of p53 family members in apoptosis  
*Journal Cell Physiol*, 182 (2000): 171 - 181
- Shinomiya, N.  
New concepts in radiation-induced apoptosis: ‘premitotic apoptosis’ and ‘postmitotic apoptosis’  
*J Cell Mol Med*, 3 (2001): 240-253

- Stewart, N.; Hicks, G.G.; Paraskevas, F.; Mowat, M.  
Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53  
*Oncogene*, 10 (1995): 109-115
  
- Strasser-Wozak, E. M. C., Hartmann, B. L., Geley, S., Sgonc, R., Böck, G.,  
Olivera Dos Santos, A. J., Hattmannstorfer, R., Wolf, H., Pavelka, M., Kofler, R.  
Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic  
leukimia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression  
*Cell Death Differ*, 5 (1998): 687 – 693
  
- Stroh, C., Schulze-Osthoff, K.  
Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates  
*Cell Death Differ*, 5 (1998): 997 - 1000
  
- Trepel, M., Groscurth, P., Malipiero, U., Gulbins, E., Dichgans, J., Weller, M.  
Chemosensitivity of human malignant glioma: modulation by p53 gene transfer  
*J Neurooncol*, 39 (1998): 19 – 32
  
- Trepel, M., Scheduling, S., Horny, H. P., Malipiero, U., Brugger, W., Dichgans, J., Weller, M.  
A new look at the role of p53 in leukemia cell sensitivity to chemotherapy  
*Leukemia*, 11 (1997): 1842 – 1849
  
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S.  
Bcl-2 family: life-or-death switch  
*FEBS Lett*, 466 (2000): 6 - 10
  
- Wang, X.W.  
Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis  
*Anticancer Res*, 19 (1999): 4759 – 4771
  
- Weller, M.  
Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53  
*Cell Tissue Res*, 292 (1998): 435 – 445
  
- Weber, K.-J., Wenz, F.  
p53, apoptosis and radiosensitivity – experimental and clinical data  
*Onkologie*, 25 (2002): 136 - 141
  
- Winters, Z. E., Ongkeko, W. M., Harris, A. L., Norbury, C. J.  
p53 regulates cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced  
G2 arrest in human cells  
*Oncogene*, 17 (1998): 673 - 684

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Dissertation ermöglicht haben und zu ihrer Entstehung maßgeblich beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. van Beuningen, für die wissenschaftliche Anleitung, die großzügige Ausstattung des Arbeitsplatzes und der Unterstützung beim Fertigstellen der Arbeit.

Herrn Dr. Abend für die sehr gute Betreuung beim Zusammenschreiben der Arbeit und die wertvolle Hilfestellung bei der Interpretation meiner Ergebnisse.

Frau Claudia Baaske für ihre stete Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten. Ohne sie hätte ich sicher vieles nicht geschafft. Ihr gilt auch besonderer Dank für die Durchführung der zusätzlichen Versuche zur Immunhistochemie und zum Western Blot.

Herrn Dr. Gilbertz für die Beratung bei der Interpretation der Ergebnisse der Zellzyklusanalysen.

Frau Dr. Lu-Hesselmann für die Betreuung während des praktischen Teils meiner Arbeit.

Auch allen anderen Mitarbeitern und Angestellten am Institut für Radiobiologie gilt mein Dank. Ausnahmslos alle hatten stets ein offenes Ohr für meine Probleme und Fragen und haben dadurch zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen.

## 10. Lebenslauf

<b>Name:</b>	Ines Therese Johanna Puttkammer
<b>Geb.-Datum:</b>	10. Januar 1979
<b>Geb.-Ort:</b>	Passau, Niederbayern
<b>Eltern:</b>	Dr. Gerhard Puttkammer, Zahnarzt Herta Puttkammer, Angestellte
<b>Geschwister:</b>	Axel Puttkammer, geb. 6.7.1976, Geodät / Geoinformatiker Freija Puttkammer, geb. 11.2.1982, Studentin der Geodäsie / Geoinformatik
<b>Schullaufbahn:</b>	
1985 – 1989	Grundschule Grafenau
1989 – 1997	Gymnasium Grafenau, Überspringen der 8. Klasse
1997	Abitur
<b>Studium:</b>	
1997	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Herbst 1999	Physikum
Frühjahr 2000	Wechsel an die TU München
Frühjahr 2001	1. Staatsexamen
Sommersemester 2002	Freisemester zur Fertigstellung des experimentellen Teils der Doktorarbeit
Frühjahr 2003	2. Staatsexamen
2003 / 2004	Praktisches Jahr am Klinikum rechts der Isar
Frühjahr 2004	3. Staatsexamen
Seit Juli 2004	Assistenzärztin am Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg, Abteilung für Unfallchirurgie
<b>Doktorarbeit:</b>	
seit Frühjahr 2001	Promotionsarbeit am Institut für Radiobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München