

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie

Klinikum rechts der Isar

**Vergleich akuter biologischer Strahlenwirkung bei Applikation
dünn und dicht ionisierender Strahlung
in einem in-vitro Hautmodell**

Jeannine Ulrike Haase

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. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff
	2. Univ.-Prof. Dr. S. E. Combs

Die Dissertation wurde am 01.09.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.03.2015 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Einleitung	5
2.1	Vorwort	5
2.2	Physikalische Grundlagen	6
2.2.1	Wellen- und Teilchenstrahlung	6
2.2.2	Wechselwirkung von Strahlung mit Materie und Strahlendosis	6
2.2.3	Tiefendosisprofile	8
2.2.4	Linear Energy Transfer (LET)	10
2.3	Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	12
2.3.1	Direkte und indirekte Strahlenwirkung	12
2.3.2	Sauerstoffeffekt	13
2.3.3	Relative biologische Wirksamkeit	15
2.3.4	Der Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Radiosensitivität	16
2.4	Die Bedeutung der Haut in der Strahlentherapie	19
2.4.1	Anatomie und Funktion	19
2.4.2	Die Epidermis	20
2.4.3	Radiogene Hautreaktionen	22
3.	Ziel des Projektes	23
4.	Material und Methoden	25
4.1	Chemikalien und Reagenzien	25
4.2	Kits	25
4.3	Plastikmaterial	25
4.4	Geräte	26
4.5	Hautmodell Epi-Derm-201 TM	28
4.6	Kultivierung	29
4.7	Bestrahlung	29
4.7.1	Applikation der Röntgenstrahlung (Low-LET)	29
4.7.2	Applikation der Protonen (Low-LET)	30
4.7.3	Applikation der Lithium-Ionen (High-LET)	30
4.8	Fixierung	31
4.9	RNA-Isolierung	32
4.10	cDNA-Herstellung	32

4.11	Polymerase-Ketten-Reaktion	33
4.12	Quantitative Real-Time-PCR	33
4.12.1	Prinzip	33
4.12.2	Durchführung	34
4.12.3	Auswertung	37
4.13	ELISA	38
5	Ergebnisse.....	42
5.1	qRT-PCR mit cDNA	42
5.2	ELISA	48
5.2.1	Ergebnisse 14-Tage ELISA	48
5.2.2	Reliabilität der ELISA-Daten	59
6	Diskussion	60
6.1	Hautmodell Epiderm-201 TM	60
6.2	Bestrahlungsmodalitäten	61
6.3	Genexpressions-Analysen	61
6.4	14-Tage ELISA	69
7	Zusammenfassung	72
8	Literaturverzeichnis	75
9	Anhang	82
10	Danksagung	83

1 Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B (eine Serin/Threonin-Kinase)
AMP	antimicrobial peptide
ATM	<u>A</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
B2M	β2-Mikroglobulin
cDNA	copy- <u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleinsäure (- <u>a</u> cid)
cdk	cyclin <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
COX	<u>C</u> ycloo <u>x</u> xygenase
cp	crossing point
ct	cycle treshold
dsDNA	<u>d</u> oppel <u>s</u> trängige <u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleinsäure (- <u>a</u> cid)
DNA	<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleinsäure (- <u>a</u> cid)
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
g	Erdbeschleunigung
GADD45A	growth <u>a</u> rrest and <u>D</u> N <u>A</u> - <u>d</u> amage inducible ...
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3- <u>p</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
G-Phase	Gap-Phase
Gy	Gray
H	Wasserstoff
HRP	<u>h</u> orseradish- <u>p</u> eroxidase
ICRU	<u>I</u> nternational <u>C</u> ommission on <u>R</u> adiation <u>U</u> nits & Measurements
IL	Interleukin
keV	Kiloelektronenvolt
LEM	<u>L</u> ocal <u>E</u> ffect <u>M</u> odel
LET	<u>L</u> inear <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer
M-Phase	Mitose-Phase
MAPK	<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase
MDM2	<u>m</u> ouse <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>2</u> homolog (E3 Ubiquitin-Protein Ligase)
MeV	<u>M</u> ega <u>e</u> lektronenvolt
miRNA	<u>m</u> itochondriale <u>R</u> ibon <u>u</u> kleinsäure (- <u>a</u> cid)
Miz-1	<u>M</u> yc <u>i</u> nteracting <u>z</u> inc finger protein 1
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibon <u>u</u> kleinsäure (- <u>a</u> cid)

MT	membrane-type
MLH1	human <u>mutL</u> <u>h</u> omolog 1
MMP	<u>M</u> atrix- <u>M</u> etallo- <u>P</u> roteinase
MYC	Protoonkogen
μ	mikro
n	nano
NF-κB	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
O	Sauerstoff
OER	<u>o</u> xygen <u>e</u> nhancement <u>r</u> atio
PBS	<u>p</u> hosphat- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PET	<u>P</u> ositronen- <u>E</u> missions- <u>T</u> omographie
PI3K	<u>P</u> hosphatidyl- <u>I</u> nositol- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PKC	Protein-Kinase C
PP	Proteinphosphatase
PTGS2	<u>P</u> rostaglandin- <u>E</u> ndoperoxidase <u>S</u> ynthase 2
p21	CDK-Inhibitor 1
qRT-PCR	<u>q</u> uantitative <u>R</u> eal- <u>T</u> ime-Polymerasekettenreaktion
RBE	<u>r</u> elative <u>b</u> iological <u>e</u> ffectiveness
RBW	<u>r</u> elative <u>b</u> iologische <u>W</u> irksamkeit
RNA	<u>R</u> ibonukleinsäure (-acid)
S	Schwefel
S-Phase	Synthese-Phase
SMAD	Homolog des Drosophila Proteins <i>mothers against decapentaplegic</i> (MAD) und des <i>Caenorhabditis elegans</i> Proteins SMA; portmanteau aus beiden
SOBP	spread-out Bragg Peak
TBS	<u>t</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
TGF-β	<u>t</u> umor growth <u>f</u> actor beta
TIMP	<u>t</u> issue <u>i</u> nhibitor of <u>m</u> etalloproteinases
TMB	<u>t</u> etramethylbenzidine
TP53	Tumorsuppressorgen 53
Trp53	Maus Tumorsuppressorgen 53
UVB	Ultraviolettstrahlung (Wellenbereich 280-315 nm)

2 Einleitung

2.1 Vorwort

Über 100 Jahre nach Entdeckung der Röntgenstrahlen ist das Spektrum der kurativen wie palliativen Behandlungsmöglichkeiten in der Strahlentherapie sehr vielfältig. Auswahl der Strahlenqualität, der Applikationsform und individuell optimierte Planung mittels modernster bildgebender Verfahren ermöglichen hohe Präzision. Dennoch wird jede Therapie durch ihre Nebenwirkungen in gesundem Gewebe limitiert. Vor diesem Hintergrund erweist sich die genaue Betrachtung der physikalischen Eigenschaften einer Strahlung und das Verständnis für die daraus resultierenden biologischen Effekte als wegweisend.

Seit mehr als drei Jahrzehnten profitieren Patienten weltweit von der Bestrahlung mit Protonen - einer Partikelstrahlung. Wesentlich jünger sind die Entwicklungen auf dem Gebiet der sog. Schweren Ionen, wie etwa Kohlenstoff, die über einen hohen linearen Energietransfer verfügen. Das Heidelberger Ionen-Therapiezentrum bietet als erste Therapieanlage an einer Klinik in Europa sowohl die Möglichkeit einer Protonenbestrahlung als auch alternativ die Behandlung mit verschiedenen Schweren Ionen, wodurch vergleichende klinische Studien durchgeführt werden können. Ziel einer Strahlentherapie mit Partikelstrahlung (Protonen und schwere Ionen) sind vor allem tiefliegende Tumoren, die gegenüber konventionellen Bestrahlungsformen sehr widerstandsfähig bzw. von hoch strahlenempfindlichem gesundem Gewebe umgeben sind. Zukünftige Forschungsprojekte müssen klären, welche Form der Partikelstrahlung im Einzelfall die effektivere Therapie darstellt und inwiefern akute bzw. chronische Nebenwirkungen zu erwarten sind [Budach, 2008; Tuffs, 2013].

Da sich der Lineare Energietransfer (LET) innerhalb der Partikeltherapie als theoretisch markantes Unterscheidungskriterium eignet, wurden im Rahmen dieser Arbeit strahlenbedingte Veränderungen an einem in-vitro Hautmodell nach Applikation einer Low-LET- (dünn bzw. locker ionisierend) und einer High-LET-Strahlung (dicht ionisierend) untersucht.

2.2 Physikalische Grundlagen

2.2.1 Wellen- und Teilchenstrahlung

Als Strahlung bezeichnet man die freie Ausbreitung von Energie im Raum. Dabei wird die Energie entweder in Form elektromagnetischer Wellen oder durch Teilchen übertragen. Im ersten Fall spricht man von Wellenstrahlung (Photonenstrahlung), im zweiten von Teilchenstrahlung (Korpuskularstrahlung). Teilchen transportieren Masse und können elektrisch geladen oder ungeladen sein. Wellenstrahlung trägt keine Masse und ist stets ungeladen. Die elektromagnetischen Wellen bestehen aus einem elektrischen und einem magnetischen Feld. Diese Felder schwingen senkrecht zueinander sowie senkrecht zur Ausbreitungsrichtung und sind periodisch veränderlich. In der Quantentheorie verfügen elektromagnetische Wellen über Teilcheneigenschaften. Zugrunde liegt die von Max Planck im Jahre 1900 geprägte Vorstellung, dass die Energie von Licht nur in Portionen aufgenommen und abgegeben werden kann. Fünf Jahre später griff Albert Einstein diese Idee auf und kam zu der Überzeugung, dass Licht sogar aus Lichtpaketen, den Photonen, besteht. Da nach heutigem Wissensstand jede Strahlung sowohl Teilchen- als auch Welleneigenschaften besitzt, ist die Unterscheidung vor allem historischen Ursprungs. Dennoch wird weiterhin von dieser Einteilung Gebrauch gemacht. Gamma- und Röntgenstrahlung werden der Photonenstrahlung, Elektronen, Neutronen, Protonen und Schwer-Ionen der Korpuskularstrahlung zugeordnet.

2.2.2 Wechselwirkung von Strahlung mit Materie und Strahlendosis

Bei der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie kommt es zur Übertragung von Energie. Je nachdem, wie viel Energie die Strahlung auf ihrem Weg durch die Materie abgibt, führt dies entweder zu Anregung oder Ionisation. Unter Anregung versteht man die Anhebung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau innerhalb

der Atomhülle. Ionisation bezeichnet den Prozess der Herauslösung eines oder mehrerer Elektronen aus der Atomhülle durch Kollision mit einem Atom oder Molekül, sodass ein positiv geladenes Ion entsteht. Ebenso gültig ist der Begriff für den umgekehrten Vorgang – der Anlagerung eines oder mehrerer Elektronen an ein neutrales Atom, das auf diese Weise eine negative Ladung erhält. Die Ionisation erfordert in der Regel eine höhere Energie als die Anregung.

In der Strahlentherapie kommt heute ausschließlich ionisierende Strahlung zur Anwendung. Die Wahrscheinlichkeit von Ionisationsereignissen steht in Zusammenhang mit der räumlichen Verteilung der Energiedeposition in der Zielmaterie. Strahlung, die im Mittel lokal eine geringe Energiemenge deponiert, wird als „dünn“ bzw. „locker ionisierend“ bezeichnet, Strahlung, die lokal größere Energiemengen deponiert, als „dicht ionisierend“ (siehe Abb. 1).

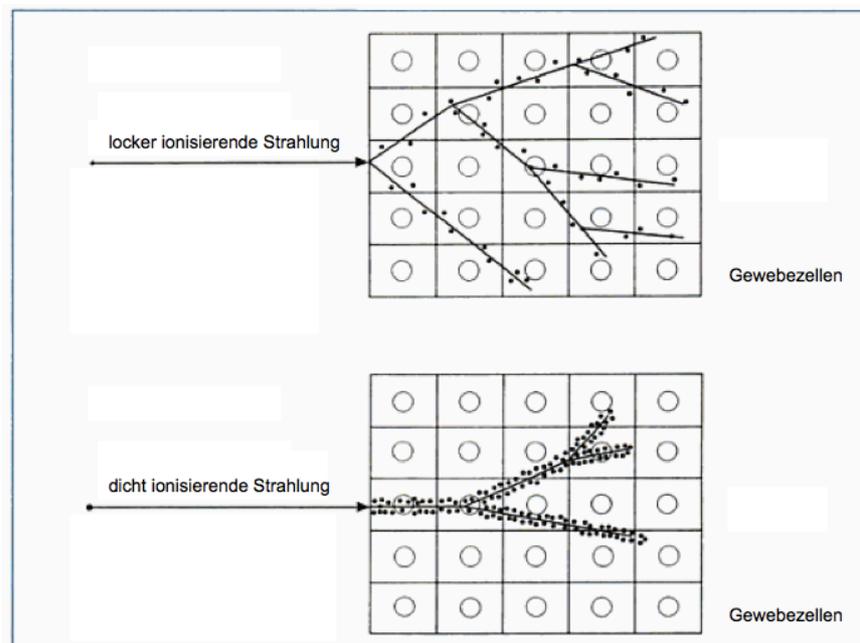


Abb.1: Unterschiede in der räumlichen Verteilung von Ionisationsereignissen zwischen locker und dicht ionisierender Strahlung (modifiziert nach Goretzki, 2004)

Die von einer Strahlung in Materie deponierte Energie wird als Dosis quantifiziert und berechnet sich aus dem Quotienten derjenigen Menge an Strahlenenergie, die in einem betrachteten Medium in einem definierten Volumen absorbiert wird, und der Masse des Mediums in diesem Volumen. Die absorbierte Dosis wird in Gray (Gy) gemessen [Rossi,1998]. In der klinischen Strahlendosimetrie und besonders in der Strahlentherapie wird Wasser als sehr gut gewebeäquivalentes Bezugsmedium herangezogen.

2.2.3 Tiefendosisprofile

Beim Durchgang durch Materie zeigt Photonenstrahlung innerhalb der ersten Zentimeter den charakteristischen Dosisaufbaueffekt. Dieser entsteht aufgrund der Überlagerung von nahe an der Oberfläche ausgelösten Elektronen mit Sekundärelektronen von weiter von der Oberfläche entfernten Streuprozessen.

Mit zunehmender Tiefe nimmt die Dosisdeposition im Sinne des Absorptionsgesetzes exponentiell ab. Auf diese Weise wird ein großer Anteil der Dosis bereits im gesunden Gewebe deponiert. Im Gegensatz dazu ist die Energieabgabe geladener Teilchen (Protonen und Schwerionen) anfangs gering und erreicht erst kurz vor Ende des Weges ihr Maximum im sogenannten „Bragg Peak“ (Abb. 2), bevor die Kurve steil abfällt. Das Tiefendosisprofil dieser Strahlung wird daher auch als „Inverses Tiefendosisprofil“ bezeichnet [Kraft, 2000]. Da die Lage des Bragg Peaks über die Anfangsenergie variiert werden kann, ist es in der klinischen Anwendung möglich die Hauptdosis der Strahlung ganz gezielt in Tumorgewebe abzugeben sowie durch die Applikation mehrerer Strahlenbündel den Bereich des Bragg Peaks so zu vergrößern, dass er genau an das Tumolvolumen adaptiert ist (Abb. 3). Diese Modulation wird als „extended“ oder „spread-out Bragg Peak“ (kurz: SOBP) bezeichnet. Für eine vergleichbare Effektivität beim Einsatz von Röntgenstrahlung wird eine Dosismaximierung durch Überlagerung erzeugt (Abb. 4). Über diese grundsätzliche Unterscheidung der Tiefendosisprofile von

Photonen- und Teilchenstrahlung hinaus, ist es möglich zwischen den Tiefendosisprofilen verschiedener Teilchen weiter zu differenzieren. So zeigen Kohlenstoffionen, die zu den schweren Ionen gehören, gegenüber Protonen einige Besonderheiten. Der Quotient aus der im Bragg Peak deponierten Dosis und der Energieabgabe in der sog. „entrance region“ (gekennzeichnet in Abb. 2) ist für Kohlenstoffionen wesentlich größer als für Protonen, sodass vor einem Tumor befindliches Gewebe besser geschont werden kann [Schulz-Ertner, 2006]. Für Ionen, die schwerer sind als Neon, wie zum Beispiel Argon, kehrt sich dieses Verhältnis jedoch um [Goldstein, 1981].

Ein Nachteil der Schwerionen-Therapie ist das vermehrte Auftreten nuklearer Kernzertrümmerung (*engl. nuclear fragmentation*). Die bei diesem Prozess entstehenden Fragmente haben zwar eine geringere Reichweite als der ursprüngliche Ionenstrahl, erzeugen aber einen sog. „dose tail“ hinter dem mit dem Bragg Peak verbundenen Dosisabfall. Eine sinnvolle Nutzung dieser zusätzlichen Dosisbelastung für das Gewebe besteht in der Detektierung der von den Fragmenten emittierten Positronen durch Positronen-Emissions-Tomographie (in diesem Fall als „Inbeam-

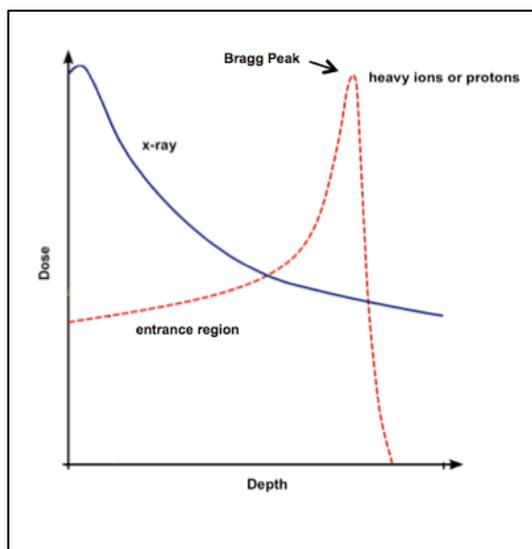


Abb. 2: Tiefendosiskurven von Röntgenstrahlung (blau) und Teilchenstrahlung (rot)

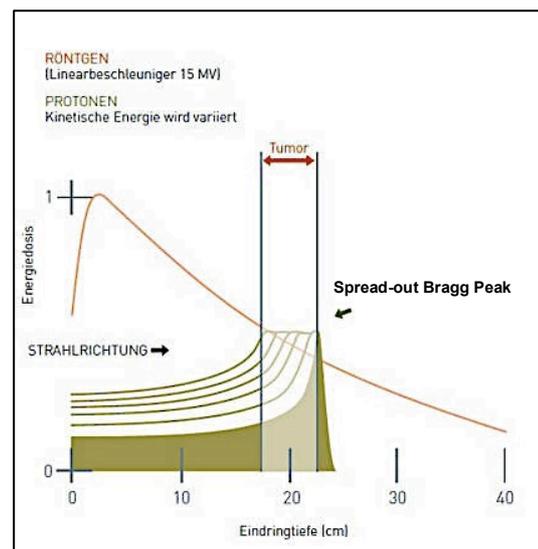


Abb. 3: Erzeugung eines Spread-out Bragg Peaks (mod. Rinecker Proton Therapy Center)

PET“ bezeichnet) [Enghardt, 1999]. Mittlerweile konnte dies auch für andere Ionenqualitäten gezeigt werden [Parodi, 2007].

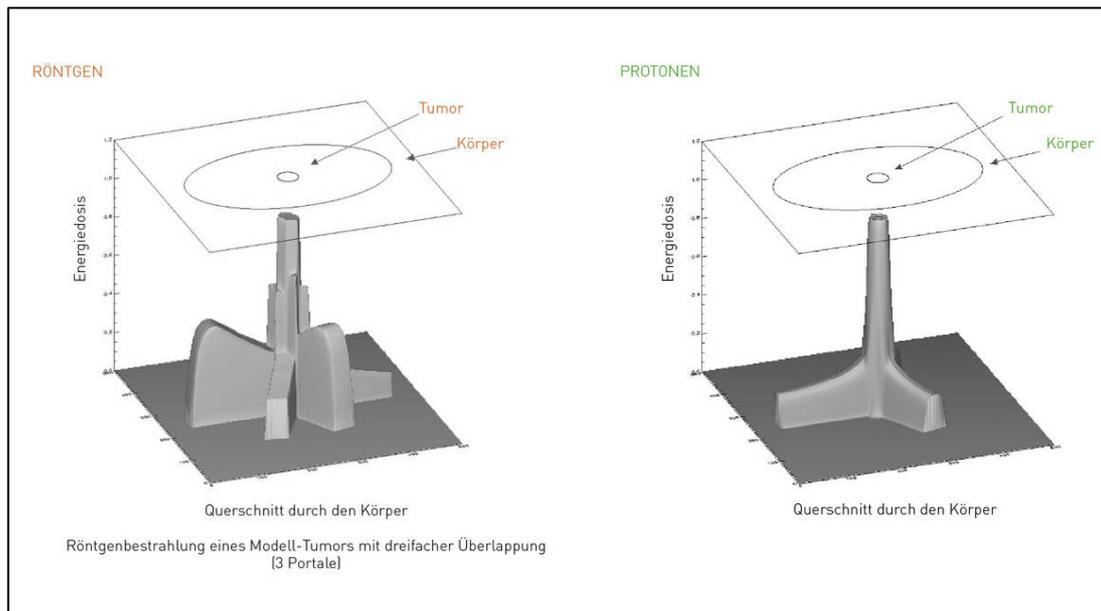


Abb. 4: Modelle zur Dosismaximierung im Tumorgewebe für Röntgen- (links) und Teilchenstrahlung (rechts) (Rinecker Proton Therapy Center, Abruf von <http://www.rptc.de>, 12.12.2012)

2.2.4 Linear Energy Transfer (LET)

“Linear Energy Transfer“ ist definiert als der Energieverlust eines Ions entlang seiner Wegstrecke und wird in Kiloelektronenvolt pro Mikrometer ($\text{keV}/\mu\text{m}$) angegeben. Da auf mikroskopischer Ebene je nach aktueller Lokalisation des entsprechenden Ions unterschiedlich große Energieabgaben beobachtet werden können, handelt es sich beim LET um einen Durchschnittswert. Als Zirkle und Tobias den Begriff 1953 einführten schien ein universeller Parameter für radiobiologische Effekte zur Verfügung zu stehen [Zirkle 1950 und 1953]. Für die Berechnung des durchschnittlichen LET (*engl.: average LET*) existieren zwei Methoden: “dose/energy-averaged LET“ und “track-averaged LET“. Um den “dose/energy-

averaged LET“ zu erhalten wird der zurückgelegte Weg (*engl.: track*) in energetisch gleichwertige Abschnitte unterteilt und anschließend der Mittelwert aus der Länge der Abschnitte gebildet, über die sich diese energetisch gleichwertigen Abschnitte erstrecken. Bei der Kalkulation des “track-averaged LET“ teilt man die Wegstrecke in Abschnitte gleicher Länge, berechnet die in jedem Abschnitt deponierte Energiemenge und bildet daraus den Mittelwert. Die zuletzt beschriebene Vorgehensweise ist üblicher. Abbildung 5 zeigt eine graphische Veranschaulichung der beiden Möglichkeiten.

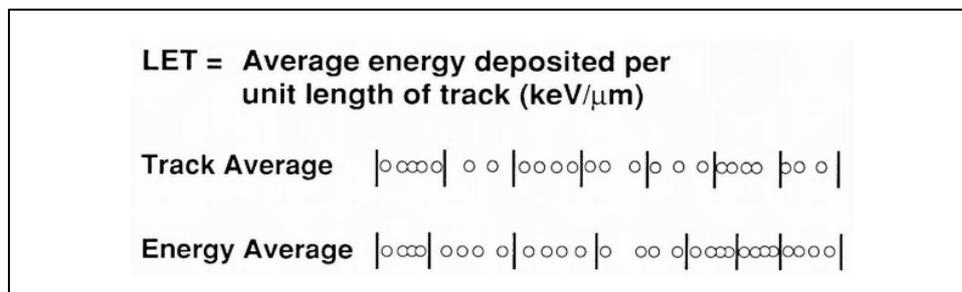


Abb. 5: Linear Energy Transfer (aus Hall und Giaccia, 2006, chapter 7)

Für monoenergetische geladene Teilchen liefern beide Rechenmodelle identische Ergebnisse [ICRU 1970, Hall und Giaccia 2006], wohingegen die LET-Werte nach fragmentierter Strahlung je nach Methode sehr große Unterschiede aufweisen [Durante, 2005].

Der lineare Energietransfer ist inhaltlich eng mit dem Begriff der „relativen biologischen Wirksamkeit“ (kurz: RBW bzw. engl. RBE für relative biological effectiveness) verknüpft. Für bestimmte LET-Werte kann ein annähernd linearer Zusammenhang beobachtet werden. Eine genauere Erläuterung enthält der Punkt 2.3.3 des Kapitels „Relative biologische Wirksamkeit“ (Seite 15).

Schwere geladene Partikel zeigen, entsprechend ihrer Masse in absteigender Reihenfolge, hohe LET-Werte, β -, Röntgen- und γ -Strahlung niedrige. Neben der Masse stellen Energie und Ladung zusätzliche Einflussfaktoren auf die Höhe des LET dar. Über die Abgrenzung zwischen Low-LET und High-LET-Strahlung finden

sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Die für die Bezeichnung Low-LET-Strahlung beschriebenen Grenzwerte liegen im Bereich von $< 3,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ bis $< 20 \text{ keV}/\mu\text{m}$, für High-LET-Strahlung werden als Grenzwerte $> 3,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$, $> 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$ und $> 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ genannt [Fokas, 2009 und Park, 2011]. Die Ermittlung des LET macht eine Quantifizierung locker und dicht ionisierender Strahlung (siehe Abb. 1, S. 7) möglich.

2.3 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

Kommt es zur Interaktion ionisierender Strahlung mit biologischer Materie in Form eukaryoter Zellen, wirkt sich die Strahlung besonders schädigend auf die im Kern befindliche Desoxyribonucleinsäure (DNA) aus [Munro, 1970]. Das Spektrum induzierbarer DNA-Schädigungen reicht von Modifikationen an Basen und Zuckern, über Querverbindungen innerhalb eines DNA-Stranges bis hin zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie komplexen Schadensmustern (*engl.: clustered damage*) [Ward, 1988]. Da nicht oder nicht korrekt reparierte Doppelstrangbrüche zum Verlust genetischer Information führen können, werden diese Schäden als besonders kritisch für das Zellüberleben angesehen [Khanna, 2001]. Grundsätzlich führt eine Dosis von 1 Gy in einer sauerstoffgesättigten Säugetierzelle zu über 1000 Basenschäden, ca. 1000 Einzel- und ca. 40 Doppelstrangbrüchen [Powell, 1990], wobei die Form der Schädigung neben der Dosis auch von der Art der Strahlung (hoher vs. niedriger LET) abhängig ist.

2.3.1 Direkte und indirekte Strahlenwirkung

Wenn die Schritte Energieabsorption, Ionisation und Induktion chemischer sowie biochemischer Prozesse (Sekundärprozesse), die zu strukturellen Veränderungen führen, am gleichen Biomolekül ablaufen, wird dies als „direkte Strahlenwirkung“ bezeichnet. Da lebende Zellen zu einem großen Teil aus Wasser bestehen, treffen

ionisierende Strahlen jedoch sehr häufig zunächst auf Wassermoleküle. Durch die Radiolyse des Wassers entstehen dann freie Radikale, die sekundär mit DNA und anderen Biomolekülen reagieren. In diesem Fall spricht man von „indirekter Strahlenwirkung“. Sowohl bei Röntgenstrahlung als auch bei Schwerionenstrahlung beruhen resultierende Schäden auf einer Kombination aus direkter und indirekter Strahlenwirkung.

Hirayama und Ito (2009) konnten anhand ihrer Experimente mit Hamsterzellen zeigen, dass, bezogen auf den Zelltod, der Beitrag indirekter Strahlenwirkung mit steigendem LET einer Strahlung abnimmt und der direkte Effekt in den Vordergrund tritt. Bei sehr hohen LET-Werten im Bereich von über 1000 keV/ μm können noch ca. 30 % des Zelltodes auf die Folgen indirekter Strahlenwirkung zurückgeführt werden [Hirayama, 2009].

2.3.2 Sauerstoffeffekt

Erreicht ein solider Tumor eine gewisse Größe, kann die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion bzw. präexistente Vaskularisation nicht mehr gewährleistet werden. Der auftretende Sauerstoffmangel stellt einen Hauptstimulus für die tumoreigene Angiogenese dar. Können trotz Neovaskularisation die aufgrund des schnellen Tumorwachstums auftretenden Versorgungsdefizite nicht mehr ausgeglichen werden, entstehen dauerhaft hypoxische und in der Folge nekrotische Areale.

Die Anwesenheit von Sauerstoff ist auch für die Sensitivität eines Tumors gegenüber radiotherapeutischer Behandlung von entscheidender Bedeutung [Nordsmark, 1996]. Während unter hypoxischen Bedingungen weniger strahlenbedingte Schäden an der DNA auftreten und repariert werden, führt eine gute Oxygenierung häufiger zu letalen Schäden [Hall und Giaccia, 2006]. Verantwortlich dafür sind im Rahmen der Radiolyse des Wassers entstehende OH-Radikale, die entweder durch H-Abstraktion oder H-Addition DNA-Radikale induzieren. In Abwesenheit von Sauerstoff kann eine chemische Reparatur der DNA-Radikale stattfinden, indem von einem anderen

Molekül (meist SH-Verbindungen) wieder ein Wasserstoffmolekül abgegeben wird. So wird die Radikalstelle unschädlich gemacht. Sauerstoff reagiert schneller mit der Radikalstelle als SH-Verbindungen und macht sie auf diese Weise für die chemische Reparatur unzugänglich [Kauffmann, 2006]. Man sagt auch, der Sauerstoff fixiert die Radikalstelle. Obwohl enzymatische Reparaturmechanismen DNA-Schäden unabhängig von Sauerstoff beheben [Ewing, 1998], gibt es Untersuchungen, die die sogenannte "oxygen-fixation-hypothesis" (chemische Reparatur) stützen [Meesungnoen, 2009].

Die strahlensensibilisierende Wirkung von Sauerstoff lässt sich durch den Sauerstoffverstärkungsfaktor OER (*engl. oxygen enhancement ratio*) quantifizieren. Die Berechnung des OER erfolgt nach der Formel

$$\text{OER} = \frac{\text{Energiedosis in Gy unter anoxischen Bedingungen}}{\text{Energiedosis in Gy unter oxischen Bedingungen}}$$

wobei die für eine bestimmte Überlebensrate zu applizierende Dosis betrachtet wird. In einer umfangreichen Arbeit konnte Y. Furusawa für Low-LET-Kohlenstoffionen einen OER von ca. 2.5 – 3, vergleichbar mit dem OER von Photonen, zeigen. Für sehr hohe LETs jenseits von 200 keV/μm erwies sich der Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff auf das Zellüberleben nahezu als vernachlässigbar, sodass der OER den Wert 1 annimmt [Furusawa, 2000 und 2012]. Eine mögliche Erklärung für die hohe Effektivität von High-LET-Strahlung unabhängig vom Sauerstoffgehalt der bestrahlten Zellen könnte die bei der Radiolyse von Wasser in erheblichem Umfang entstehende Menge molekularen Sauerstoffes darstellen [Meesungnoen, 2009].

2.3.3 Relative biologische Wirksamkeit

Um die biologische Wirkung unterschiedlicher Strahlungsarten besser vergleichen zu können wurde als Bezugsgröße die Relative biologische Wirksamkeit (kurz: RBW oder *engl. Relativ Biological Effectiveness, RBE*) geschaffen. Sie ist definiert als Quotient aus den Energiedosen einer Referenzstrahlung und der zu untersuchenden Strahlung, die im Testsystem den gleichen biologischen Effekt aufweisen [ICRU, 1986]. Als Referenzstrahlung dient zumeist 220 keV- Röntgenstrahlung, als biologischer Endpunkt häufig die Überlebensfraktion nach Behandlung mit der zu untersuchenden Strahlenart (siehe Abb. 6). Die RBE unterliegt einer Reihe von Einflussfaktoren. Viele Untersuchungen zeigen eine Korrelation zwischen dem Linear Energy Transfer einer Strahlung und der Relativen Biologischen Wirksamkeit. Die RBE steigt mit zunehmendem LET an [Ando, 2009]. Bis zu einem gewissen LET-Wert kann ein linearer Zusammenhang gezeigt werden. Jenseits dieses Wertes, der wiederum von der verwendeten Ionenart abhängig ist, führen steigende LET-Werte nicht zu höherer biologischer Wirksamkeit – ein Phänomen, das in der Literatur als “overkill“ bezeichnet wird. Auch die Strahlenart, die applizierte Dosis, der Zelltyp, die Reparaturkapazität und der gewählte Endpunkt nehmen Einfluss auf den RBE-Wert [Goodhead, 1992, Weyrather, 1999, Suzuki, 2000, Kraft, 2000]. RBE-Werte von Low-LET-Strahlung liegen häufig im Bereich 1,06 bis 1,33, RBEs von High-LET-Strahlung oft zwischen 1,5 und 3,01, gelegentlich auch darüber [Suzuki, 2000 und Sørensen 2011]. Diese experimentell ermittelten Werte können in der klinischen Anwendung höher ausfallen. Um die RBE möglichst genau vorherzusagen wurde von der Gesellschaft für Schwerionenforschung das Local Effect Model (kurz: LEM) entwickelt und wiederholt verbessert. Mit dem inzwischen in vierter Version erprobten LEM lässt sich für jede Zusammensetzung eines Strahlenfeldes die lokale RBE punktuell berechnen und für die Bestrahlungsplanung verwenden [Elsässer und Scholz, 2006]. Bezüglich des Zellüberlebens nach High-LET-Strahlung wird angenommen, dass

ineffektives rejoining der DNA-Doppelstrangbrüche verantwortlich für die hohe RBE ist [Goodhead, 1980 und Rydberg 2005]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Anteil der direkt ionisierenden Strahlenwirkung an einer hohen RBE den der indirekt ionisierenden bei weitem übertrifft [Hirayama, 2009].

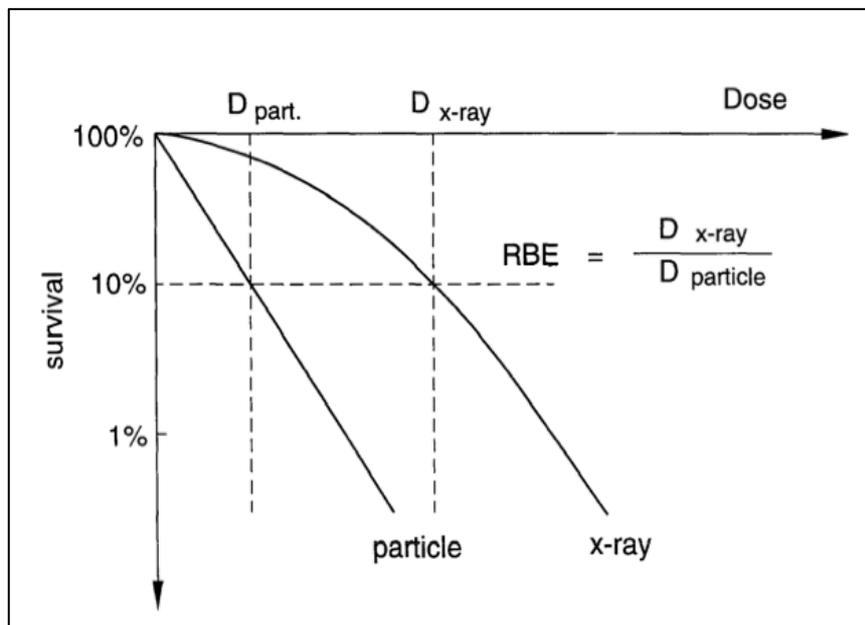


Abb. 6: Definition der Relativen Biologischen Wirksamkeit, illustriert anhand von Zellüberlebenskurven (aus Kraft, 2000)

2.3.4 Der Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Radiosensitivität

Während der Proliferation durchlaufen eukaryotische somatische Zellen spezifisch aufeinander folgende Phasen. Nach der Kernteilung (Mitose) befinden sich die Zellen in der G1-Phase (von engl. gap, Lücke) und besitzen einen einfachen Chromosomensatz. Die G1-Phase wird auch als Wachstumsphase bezeichnet, da viele für das Zellwachstum nötige Proteine und Lipide gebildet werden und die Zellen an Größe zunehmen. In Geweben, in denen sich die Zellen nur noch selten oder gar nicht mehr teilen, besteht jetzt die Möglichkeit in die G0-Phase

überzutreten. Die Zellzykluskontrolle wird dann teilweise außer Kraft gesetzt. Sofern die Zelle nicht irreversibel postmitotisch ist, können bestimmte Signale die Fortführung des Zellzyklus initiieren. Überschreitet das Zellwachstum ein bestimmtes Kern/Plasma-Verhältnis treten die Zellen von der G1- in die S- (Synthese-) Phase über und die chromosomale DNA wird repliziert. Nun liegt ein doppelter Chromosomensatz vor. An die S-Phase schließt sich eine zweite Gap-Phase, die G2-Phase an, in der unter anderem notwendige Reparaturen, wie etwa die Beseitigung von Replikationsfehlern, erfolgen. G1, S- und G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet. In der darauf folgenden M- (Mitose-) Phase werden die beiden durch Replikation entstandenen Chromosomensätze auf die beiden Tochterkerne verteilt und danach wird das Cytoplasma getrennt.

An definierten Kontrollpunkten wird der regelrechte Ablauf der Prozesse der einzelnen Phasen überprüft und der Zellzyklus je nach Ergebnis entweder angehalten oder fortgesetzt. Ein zentraler Apparat aus sog. Cyclinen und ihren katalytischen Untereinheiten (cdk, cyclin-abhängige Kinasen) steuert den Fortgang des gesamten Zellzyklus und die Passage von Kontrollpunkten. Die Aktivität der Cyclin-Cdk-Komplexe wird dabei im Wesentlichen von zwei Faktoren bestimmt: Zum einen durch die Menge der Cycline – sie stellen die regulatorische Untereinheit der Komplexe dar, zum anderen durch Inhibitorproteine, die spezifische Cyclin-Cdk-Komplexe hemmen und z. B. als Antwort auf zellulären Stress synthetisiert werden. Jede Zellzyklusphase und jeder Kontrollpunkt ist mit definierten Cyclinen und cyclin-abhängigen Kinasen assoziiert. Die Synthese von Cyclinen und Inhibitorproteinen wird durch eine Vielzahl externer Faktoren gesteuert [Vermeulen, 2003, Schmidt und Unsicker, 2003, Wagener und Müller, 2009]. Einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene (in Abb. 7 gelb hinterlegt) haben neben anderen Funktionen auch entscheidenden Einfluss auf die Zellzyklusprogression.

Im Allgemeinen bestehen je nach Zellzyklusphase Unterschiede in der Radiosensitivität. Zellen in der Mitose sind besonders sensitiv. Während der mittleren bis späten S-Phase kann dagegen ausgeprägte Radioresistenz beobachtet werden, während Zellen in der G2-Phase am sensitivsten sind. Mit zunehmendem LET verringern sich diese Unterschiede jedoch und Zellen in der späten S-Phase werden sensitiver. Darüber hinaus scheint High-LET-Strahlung den Zellzyklus effektiver zu verzögern oder anzuhalten [Scholz, 1994, Fokas, 2009].

2.4 Die Bedeutung der Haut in der Strahlentherapie

2.4.1 Anatomie und Funktion

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Mit einer Gesamtfläche von 1,5 bis 2,0 m² und einem Anteil von 10 – 15% des Körpergewichtes ist sie das größte Organ des menschlichen Körpers. Die Dicke der Haut beträgt je nach Körperregion zwischen 1,0 und 2,0 mm. Während der größte Teil der Körperoberfläche mit der Drüsen und Haare enthaltenden Felderhaut bedeckt ist, befindet sich an Hand- und Fußflächen die sog. Leistenhaut.

Von außen nach innen gliedert sich die Haut in die drei Schichten **Epidermis** (Oberhaut), **Dermis** (Lederhaut, Corium) und **Subcutis** (Unterhaut, Tela subcutanea, vgl. Abb. 8). Die Epidermis (Abb. 9) ist ein primär aus Keratinozyten bestehendes mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, dessen Dicke in Abhängigkeit von Lokalisation, Alter und Geschlecht stark variiert und zwischen 30 und 300 µm betragen kann. Die Epidermis enthält keine Gefäße aber freie Nervenendigungen; mit der Dermis ist sie dreidimensional verzapft, jedoch durch eine Basalmembran getrennt. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion. Die Dermis stellt das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe dar. Hauptkomponenten dieser Hautschicht sind Fibroblasten, elastische und Kollagenfasern sowie eine aus vielen Bestandteilen zusammengesetzte Matrix, in welche Zellen und Fasern eingelagert sind. Im Gegensatz zur Epidermis ist die Dermis reich vaskularisiert und enthält neben freien

Nervenendigungen eine Vielzahl an Rezeptoren. Talgdrüsen und Haare stellen schichtübergreifend eine Verbindung zwischen Dermis und Epidermis her. Die Subcutis besteht aus lockerem Binde- und Fettgewebe und befindet sich zwischen Haut und oberflächlicher Körperfaszie. Auch die Dicke der Subcutis ist abhängig von Körperregion, Geschlecht und Körpergewicht. Während bei der Frau bevorzugt die Haut von Brust, Hüften und Gesäß von subkutanem Fett unterlagert wird, ist es beim Mann die Bauchhaut.

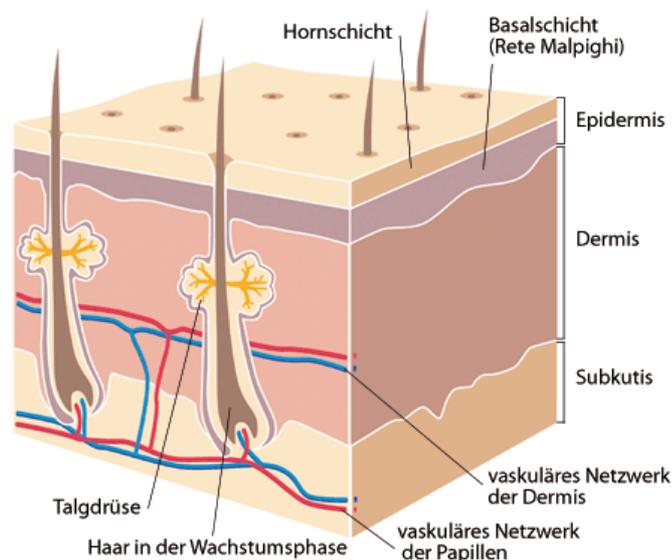


Abb. 8: Aufbau der menschlichen Haut (Abruf von www.hypro.cz/images/HF-kuze-de.gif, 12.12.2012)

2.4.2 Die Epidermis

Mit über 90% stellen Keratinoblasten bzw. Keratinozyten den vorherrschenden Zelltyp der Epidermis dar. Die verbleibenden Prozente verteilen sich auf Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten. Da die Keratinozyten ein proliferierendes und differenzierendes Stammzellsystem bilden, kann die Epidermis, orientiert an funktionellen und morphologischen Unterschieden dieses Zelltyps, wiederum in mehrere Schichten unterteilt werden. Direkt an die

Basalmembran angrenzend liegt das **Stratum basale** (Basalschicht). Diese basalen Keratinozyten bzw. Keratinoblasten sind kubisch, fungieren als Stammzellen und tragen so zur stetigen Regeneration des Epithels bei. An das Stratum basale grenzt das **Stratum spinosum** (Stachelzellschicht), dessen Namensgebung auf der polygonalen Form der in der terminalen Differenzierung fortgeschrittenen Keratinozyten beruht. Die polygonale Form entsteht durch die vielfache Verzahnung der Zellen untereinander über Adhäsionsstrukturen (Desmosomen). Die Zellen des **Stratum granulosum** (Körnerzellschicht) sind deutlich abgeflacht und enthalten basophile Keratohyalin granula als Zeichen beginnender Verhornung. Das Keratin ist bereits in den Basalzellen in Form von Tonofilamenten vorhanden und wird im Lauf der terminalen Differenzierung lediglich biochemisch verändert. Das **Stratum lucidum (helle Schicht)** tritt nur in sehr vielschichtigen Epithelien auf und ist durch die fehlende Abgrenzbarkeit von Zelle und Kern gekennzeichnet. Die äußerste Schicht – das **Stratum corneum** (Hornschicht) – besteht aus stark abgeflachten Hornzellen ohne Zellkern und Organellen mit hohem Keratingehalt. Lösen sich die Desmosomen in den obersten Zelllagen, kommt es zur Abschilferung abgestorbener Hornschuppen. Die Transitzeit einer Zelle vom Stratum basale bis ins Stratum corneum beträgt in gesunder Haut 26-42 Tage.

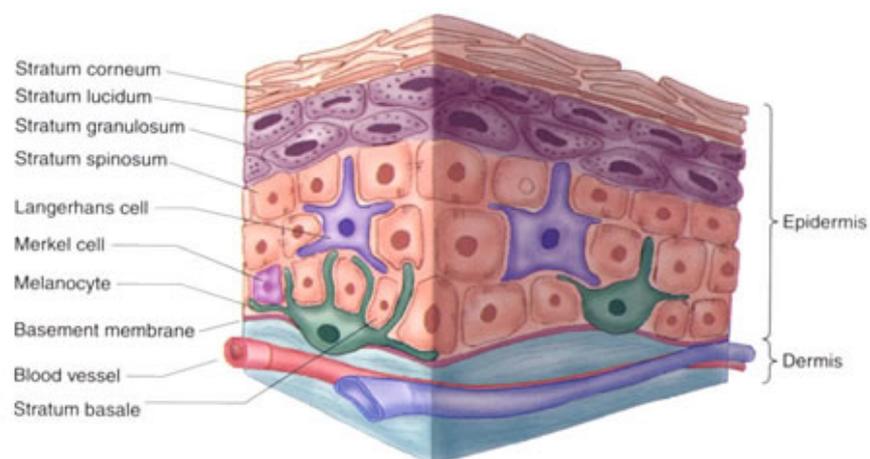


Abb. 9: Aufbau der Epidermis (Abruf von http://histologi.haidl.se/Kapitel_17_-_Hud, 12.12.2012)

Durch ihren speziellen Aufbau wirkt die Epidermis als Barriere und schützt den Körper sowohl vor schädigenden Einflüssen aus der Umwelt als auch vor Austrocknung. Darüber hinaus sind die im Stratum spinosum lokalisierten Langerhans-Zellen maßgeblich an körpereigenen Abwehrmechanismen beteiligt. Sie phagozytieren in die Epidermis eingedrungene Antigene, präsentieren diese den T-Lymphozyten und leiten somit die erworbene Immunabwehr ein. Wie die Langerhans-Zellen besitzen auch Keratinozyten sog. Toll-like-Rezeptoren mit deren Hilfe sie verschiedene Oberflächenmarker auf Bakterien, Viren und Pilzen erkennen können. Durch die Ausschüttung von Zytokinen wie z. B. Interleukin-8 sind Keratinozyten in der Lage neutrophile Granulozyten anzulocken, die ebenfalls Pathogene durch Phagozytose inaktivieren [Aumüller, 2006; Moll, 2010; Sterry, 2011].

2.4.3 Radiogene Hautreaktionen

Bei fast jeder therapeutisch indizierten Strahlenapplikation werden auch gesunde Gewebestrukturen (Normalgewebe) signifikanten Dosen ausgesetzt.

Nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Strahlenfolgen. Die Grenze liegt definitionsgemäß bei 90 Tagen nach Behandlungsbeginn. Akute Strahlenfolgen treten zumeist in Geweben mit hohen Teilungsraten wie z. B. Knochenmark, Epidermis und Epithelien der Schleimhäute auf. Grundsätzlich lassen sich an diesen sog. Umsatzgeweben verschiedene pathogenetische Phasen und Komponenten unterscheiden. Häufig ist zu Beginn eine Gefäßreaktion zu beobachten, die sich in begleitenden Entzündungsprozessen manifestiert. Darüber hinaus kommt es zur Beeinträchtigung der Zellproduktion und durch den unabhängig von der Behandlung fortbestehenden physiologischen Zellverlust zu progressiver Zellverarmung. Der Zusammenbruch der normalen Gewebestruktur begünstigt in der Folge sekundäre Infektionen. Abgesehen von sehr

ausgeprägten Strahlenreaktionen tritt abschließend die Heilungsphase ein. Ausgangspunkt hierfür sind überlebende oder einwandernde Stammzellen.

Da die Haut im Rahmen einer Teletherapie von der applizierten Strahlung stets durchquert werden muss, stellt die akute Radiodermatitis - die strahlenbedingte akute entzündliche Hautreaktion - mit einer Inzidenz von ca. 80 bis 95% die häufigste Nebenwirkung einer Strahlentherapie dar [Potthoff, 2011].

Unter fraktionierter Bestrahlung kommt es ab der dritten Woche zu linearer Basalzelldepletion und der perivaskulären Infiltration von Entzündungszellen. Klinisch zu beobachten sind Ödeme und Erytheme. Da in den meisten Fällen eine einzige überlebende Basalzelle zur Regeneration der Epidermis ausreichend ist und im Verlauf der Bestrahlung eine deutliche Erhöhung der Mitoserate beobachtet werden kann, ist die Erholungskapazität der Oberhaut, isoliert betrachtet, sehr hoch. Die darüber hinaus einsetzende morphologische Umgestaltung der Mikrogefäße, die die Papillen der Dermis durchziehen, führt jedoch im Verlauf von Monaten bis Jahren zu verschlechterter Durchblutung und damit auch zu einer Mangelversorgung der Epidermis. Wird eine Kompensation dosisabhängig verhindert, führt dies zu Atrophie, trockenen und feuchten Epitheliolysen, oberhalb von 60 Gy zu vereinzelt Nekrosen. Fibrosierungen und Indurationen können als Spätreaktionen noch Jahre nach Abschluss der Strahlenbehandlung in Erscheinung treten, verlaufen häufig progredient und kennzeichnen das Bild der chronischen Radiodermatitis [Adamietz, 2011].

3. Ziel des Projektes

Anhand eines in-vitro Hautmodells, welches stellvertretend für schnell proliferierendes und insofern strahlenempfindliches gesundes Gewebe verwendet wurde, sollten durch die Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten verursachte Veränderungen auf genetischer sowie Protein-Ebene untersucht werden.

Die Auswahl der Strahlenqualitäten wurde entsprechend des Parameters „Linearer Energietransfer“ getroffen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Ergebnisse der Untersuchungen nach Applikation von High-LET-Strahlung gerichtet, da deren physikalische und strahlenbiologische Eigenschaften hohe Erwartungen bezüglich einer gesteigerten Wirksamkeit gegen Tumorerkrankungen wecken, wobei die Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe noch weitgehend unerforscht sind.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Konzentration bzw. Einheiten	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)		SIGMA-ALDRICH
Ethanol	99,6%	Carl Roth
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Lt. Hersteller	GIBCO
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)-Lösung	10.000 U/ml Penicillin 10.000 µl/ml Streptomycin	GIBCO
RNase Zap		Ambion
Tris Buffered Saline (TBS)	20mM Trizma base, 150mM NaCl	SIGMA-ALDRICH
Tween 20		CALBIOCHEM

4.2 Kits

Bezeichnung	Firma
Human CXC8/IL-8 DuoSet®	R&D Systems
Human IL-1 alpha/IL-1F1 DuoSet®	R&D Systems
Human Total MMP-1 DuoSet®	R&D Systems
Human IL-1 alpha/IL-1F1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
Human Pro-MMP-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master	Roche
PAXgene Tissue miRNA Kit	PreAnalytiX (Qiagen)
QuantiTect® Primer Assay	Qiagen
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen
Reagent Diluent Concentrate 2	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems

4.3 Plastikmaterial

Bezeichnung	Firma
Adhesive Sealing Films for Microplates	EXCEL Scientific
Clear Multiple Well Plate, 6 u. 12 well	CORNING
EIA/RIA Plate, 96 well, Nr. 3590	Costar

Einmalpinzetten	Seidl Medizin GmbH
Einwegpipette (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50ml)	SARSTEDT
Injekt Einmalspritzen, 2 teilig	Braun
Kryo-Röhrchen 1,2 ml	TPP
M Tubes	MACS Miltenyi Biotec
MilliCell Culture Inserts	Millipore
Parafilm „M“, Laboratory film	BEMIS
PAXgene Tissue Container	PreAnalytiX (Qiagen)
Pipettenspitzen	ependorf, SARSTEDT
Pipettenspitzen mit Filter (RNase free)	SARSTEDT
Reagent Reservoir 50 ml	VWR
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, SARSTEDT
RealTime ready Custom Panels (96-8)	Roche
Spritzenfilter 0,22 µm	TPP
Transferringpipetten	SARSTEDT
Zellkulturschalen, 10 cm	CORNING
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT

4.4 Geräte

Bezeichnung	Firma
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	Thermo SCIENTIFIC
Feinwaage EW 620-3NM	Kern
gentle MACS™ Dissociator	MACS Miltenyi Biotec
Light Cycler 480	Roche
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph
Microbeam Facility SNAKE	Standort: Garching bei München
Mini-Zentrifuge D 6015	neoLab
Multipipette plus	ependorf
NanoDrop 2000	Thermo SCIENTIFIC
pH-Messgerät S20-Seven Easy™	METTLER TOLEDO
Pipettierhilfe PIPETBOY acu	IBS INTEGRA BIOSCIENCES
Pipettierhilfe Stripettor™	CORNING
Research plus pipette, 12 channel, 30-300µl	ependorf
Röntgenbestrahlungsgerät RS225A	Gulmay Medical Ltd
Schüttler 3017	GFL
Sicherheitswerkbank Gelaire BSB4A	GELAIRE
Sicherheitswerkbank HERA safe KS18	Thermo ELECTRON CORPORATION
Spektrophotometer EL808	BioTEK
Thermoblock TB1	Biometra
Vortex IKA® Model MS 1 minishaker	SIGMA-ALDRICH

Vortex Reax top	Heidolph
Wasseraufbereitungssystem Direct-Q 3	Millipore
Waterbath Y14	Grant
Zentrifuge 5415R	eppendorf
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo ELECTRON CORPORATION
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR1	Thermo SCIENTIFIC
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich ZENTRIFUGEN
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher SCIENTIFIC

4.5 Hautmodell Epi-Derm-201™

Bei dem hier verwendeten Hautmodell Epi-Derm-201™ der Firma MatTeK Corporation (Ashland, MA, USA) handelt es sich um ein aus vier bis sechs Zellschichten bestehendes Epidermis-Äquivalent mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Dicke von 25-40µm (Abb. 10 a).

Die humanen Keratinozyten für dieses Modell werden aus neonataler Vorhaut isoliert und in vitro neu geschichtet. Hierbei entspricht der Aufbau mit den in Grundzügen bereits zu erkennenden Schichten Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum dem Vorbild natürlicher menschlicher Oberhaut.

Das Modell eignet sich im Vergleich zu einer einzelnen Zellschicht speziell zur Beobachtung aller Arten von Zell-Zell-Interaktionen bzw. zur Untersuchung von enzymaler Aktivität, Genexpression und Cytokinproduktion. Dabei stellt die geringe Dicke einen entscheidenden Vorteil für die Behandlung mit den in diesem Projekt untersuchten Strahlenarten dar, da das vollständige Durchdringen des Gewebes auf diese Weise gewährleistet ist.

Die Keratinozyten wachsen auf einer semipermeablen Membran in Millicell Cell Culture Inserts von Millipore (Billerica, MA, USA) und werden auf mediumgetränktem Agarosegel geliefert.

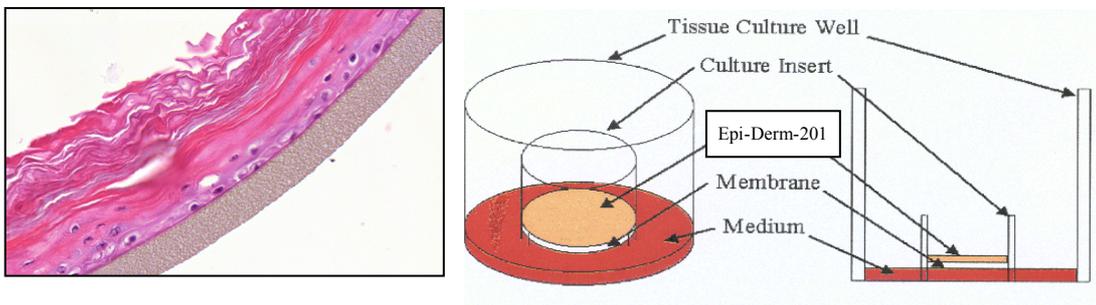


Abb. 10

- a: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Schnitts des Epi-Derm-201™ Skin Models inkl. Membran (links)
b: Anordnung des Hautmodells im Tissue Culture Well für die Kultivierung (rechts)
(modifiziert nach <http://www.mattek.com/pages/in-vitro-basics>, Abruf 16.12.2012)

4.6 Kultivierung

Die MilliCell Culture Inserts wurden sofort in 9-well Platten mit je 1.5 ml EPI-100-NMM (serumfreies Medium von MatTeK) umgesetzt und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Die Ernährung erfolgte dabei über Diffusion durch die semipermeable Membran (Abb. 10b). Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, wobei Medium-Rückstände oberhalb der Haut sorgfältig entfernt wurden um Schimmelbildung zu vermeiden. Da während des Bestrahlungsvorganges Sterilität aufgrund des Kontaktes mit ungefilterter Raumluft nicht gegeben war, wurde dem Medium zuvor Fungin in der Konzentration 10 µl/ml zugesetzt.

4.7 Bestrahlung

4.7.1 Applikation der Röntgenstrahlung (Low-LET)

Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erfolgte mit Hilfe des Gulmay RS225A device (Gulmay Medical, Camberly, UK) homogen bei 200 kv, 15 mA, Filter 5 (bestehend aus 0,5 mm Kupfer), mit den Dosen 1 Gy für 1 min 7 sec, 2 Gy für 2 min 14 sec und 4 Gy für 4 min 28 sec. Der LET dieser Röntgenstrahlen liegt bei ca. 3 keV/µm, die RBW bei 1. Die Proben hatten, bedingt durch die eingestellte Tischhöhe des Gerätes, einen Abstand von 50 cm zur Bestrahlungsquelle. 3 Proben erhielten jeweils die identische Dosis, 3 unbestrahlte Kontrollen wurden den gleichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt. Für die Dauer der Bestrahlung befanden sich die MultiCell Culture Inserts in den 9-well Platten, die auch während der Kultivierung verwendet wurden, jedoch ohne Medium. Die auf diese Weise generierten 12 Proben dienten nach Fixierung der RNA-Isolierung und der anschließenden Genexpressionsanalyse. Weitere 12 Proben wurden ebenso behandelt und 14 Tage kultiviert, wobei hier das Ziel in der Messung der in das Medium abgegebenen Cytokinmenge durch einen ELISA bestand. Dazu wurde

direkt vor der Bestrahlung (0h) sowie zu den Zeitpunkten 2, 4, 8, 10 und 14 Tage bei Mediumwechsel das abgenommene Medium aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

4.7.2 Applikation der Protonen (Low-LET)

Die Bestrahlung mit Protonen wurde an der Microbeam Facility SNAKE des Münchener 14 MV Tandembeschleunigers homogen bei 20 MeV durchgeführt. Die Applikation erfolgte mit einer Fluenz von 2,34, 4,72 bzw. 9,44 μm^{-2} , was einer Dosis von 1, 2 bzw. 4 Gy entspricht, und dauerte etwa 5-15 Minuten. Der LET dieser Protonen liegt bei ca. 2,6 keV/ μm , die RBW für den Endpunkt Zellüberleben bei etwa 1,2. Die MultiCell Culture Inserts wurden für die Zeit der Bestrahlung in speziell für dieses Experiment angefertigte und sterilisierte Container eingesetzt (siehe Abb. 11). Dabei diente ein Element als Halterung für das Insert, das andere wurde mit Parafilm bespannt und verschloss das offene Ende des MultiCell Culture Inserts. Die beiden Elemente wurden verschraubt und die Container in die Bestrahlungsanlage eingepasst. Durch Scannen des Ionenmikrostrahles wurde ein $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ Feld bestrahlt. Mehrere solcher Felder wurden nebeneinander gesetzt um eine runde Fläche von 4 mm Durchmesser zu bestrahlen. Die Container wurden bis auf eine Entfernung von 0,1 mm an den Vakuumaustrittspunkt des Ionenstrahles herangefahren und der Strahl traf senkrecht den MultiCell Culture Insert. Um die Bestrahlungsfluenz und damit die Dosis zuverlässig einzustellen wurden die Protonen nach Durchtritt durch das Hautmodell mit einem CsI Szintillator detektiert und gezählt. Anzahl und Aufteilung der Proben auf die unterschiedlichen Dosen sowie Handhabung der Kontrollen verhalten sich äquivalent zu der Beschreibung in Abschnitt 4.7.1.

4.7.3 Applikation der Lithium-Ionen (High-LET)

Auch die Bestrahlung mit 45 MeV Lithium Ionen wurde an der Microbeam Facility SNAKE durchgeführt. Der LET der Lithium-Strahlung liegt bei 60,4 keV/ μm , die

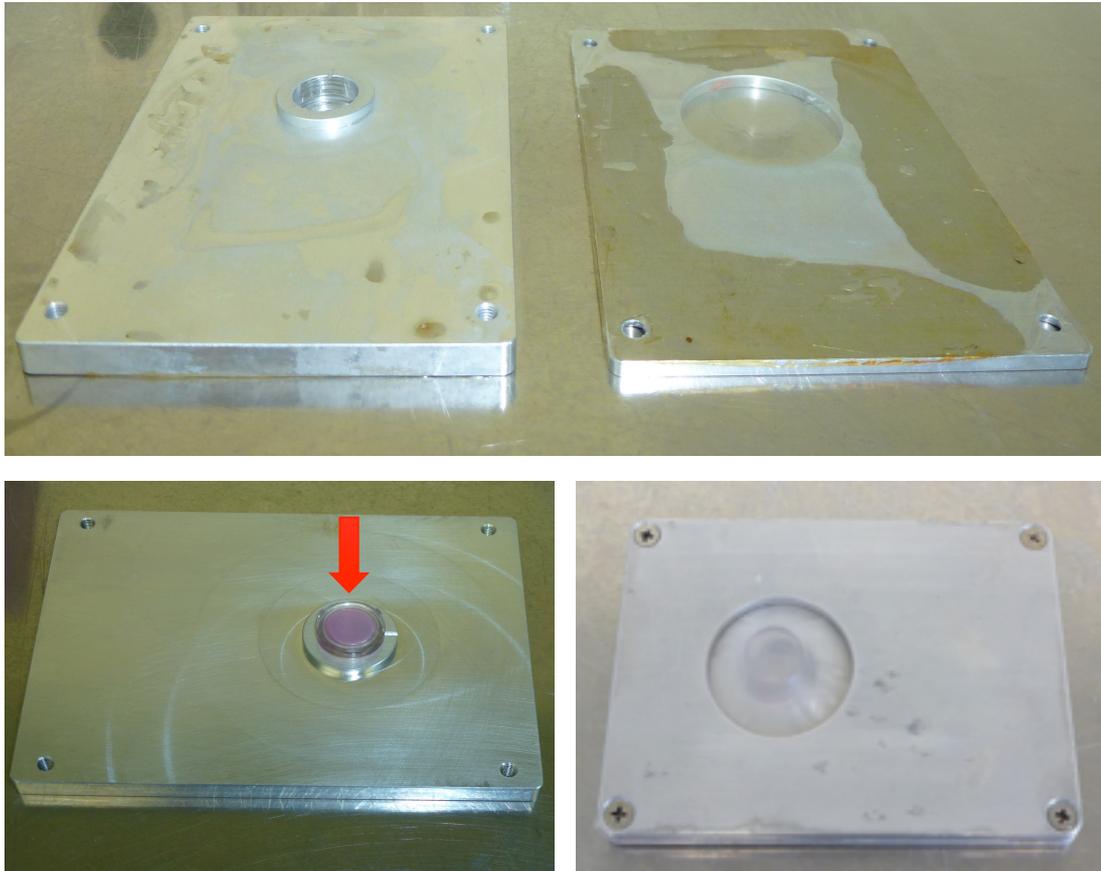


Abb.11: An die Millicell Culture Inserts adaptierte Bestrahlungscontainer: Zweiteiliger Aufbau (oben); mit eingesetztem Millicell Culture Insert: die Membran zeigt nach oben, die Bestrahlung erfolgt in Pfeilrichtung (links unten); das Millicell Culture Insert wird mit Hilfe von Parafilm im Container fixiert (rechts unten)

RBE bei etwa 3. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 1, 2 bzw. 4 Gy dauerte etwa 5-15 Minuten, wobei eine Fluenz von 0,103, 0,207 bzw. 0,414 μm^{-2} appliziert wurde.

4.8 Fixierung

Die für die spätere Genexpressionsanalyse bestimmten Proben wurden 24 h nach Bestrahlung aus den MilliCell Culture Inserts entfernt, in PAXgene Tissue Containern (PreAnalytiX, Qiagen/BD Company) entsprechend den Anweisungen des Herstellers fixiert und bei -20°C gelagert.

4.9 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde das Tissue miRNA Kit H (PreAnalytiX, Qiagen/BD Company) verwendet. Das Probenmaterial wurde dazu aus den PAXgene Tissue Containern entnommen. Da die Haut außerhalb des in den Containern befindlichen Tissue Stabilizers nicht mehr geschützt ist, wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt und der Arbeitsplatz, sämtliches Arbeitsmaterial sowie die Handschuhe mit RNase Zap® eingesprüht um einen Abbau der RNA durch freie RNAsen zu verhindern. Die Zerkleinerung der Haut sowie die Homogenisierung des entstandenen Lysats erfolgte im TissueRuptor von PreAnalytiX mit dem Gentle MACS (MACS Miltenyi Biotec), Menüeinstellung RNA 02.01, MTube, über einen Zeitraum von 90 Sekunden. Alle übrigen Arbeitsschritte wurden entsprechend den Angaben aus dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden die RNA-Konzentrationen mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 (BioTek) gemessen und die Isolate bei -20°C eingefroren. Obwohl der Anteil der m-RNA an der gesamten RNA nur 1-5% beträgt, ist dies für die PCR (Polymerase chain reaction) ausreichend.

4.10 cDNA-Herstellung

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), das die vorherige Elimination genomischer DNA miteinschließt. Hierbei wurde, orientiert an den gemessenen mRNA-Konzentrationen, stets das gesamte aus der Isolierung gewonnene Material eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde auf Eis gelagert und direkt im Anschluss mit Hilfe der quantitativen RealTime-PCR (qRT-PCR) relativ quantifiziert.

4.11 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (*engl. polymerase-chain-reaction*, kurz *pcr*) handelt es sich um ein *in-vitro* Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA. Ausgehend von nur einem Molekül lassen sich so innerhalb kurzer Zeit Milliarden Kopien erzeugen. Seit ihrer Erfindung durch Kary Banks Mullis 1983 wurde die PCR vielfach weiterentwickelt und ist heute essentielles Instrument molekularbiologischer Forschung sowie medizinischer Diagnostik.

Ein klassischer PCR-Lauf beinhaltet drei Reaktionsschritte, die zusammengefasst einen Reaktionszyklus ergeben, welcher je nach Anwendung 20-50 Mal wiederholt wird. Die drei Schritte - Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung komplementärer Primer an die denaturierte DNA (Annealing) und die rekombinante Verlängerung (Extension) der angelagerten Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase - laufen auf unterschiedlichen Temperaturstufen ab. Tabelle 1 (S. 35) zeigt die an die Erfordernisse adaptierten Temperaturwerte unter dem Stichpunkt Amplifikation (Vervielfältigung).

Primer sind kurze DNA-Stücke, die aufgrund ihrer Sequenz spezifisch an komplementäre Abschnitte der Matrize binden und so das 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes festlegen. Je nach Design der Primer lassen sich so ganz bestimmte Gene vervielfältigen.

4.12 Quantitative Real-Time-PCR

4.12.1 Prinzip

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) stellt eine wichtige Weiterentwicklung des klassischen PCR-Prinzips dar. Mit ihrer Hilfe kann die Amplifikation in Echtzeit (*real-time*) verfolgt werden. Eine einfache Möglichkeit, die entstehenden PCR-Produkte zu detektieren, besteht im Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes. Wenn dieser in die neu gebildeten DNA-Doppelstränge interkaliert, steigt die Intensität

seines Fluoreszenzsignales stark an; die Signalstärke korreliert quantitativ mit der Menge des PCR-Produkts. Die Fluoreszenz wird gegen Ende eines jeden Extensionsschrittes gemessen und der Verlauf der Messungen graphisch gegen die Zykluszahl aufgetragen. Auf diese Weise erhält man einen sigmoidalen Kurvenverlauf, der in drei Bereiche unterteilt werden kann.

Die Signale der Anfangsphase werden durch die geringe Hintergrundfluoreszenz ungebundener SYBR Green Moleküle hervorgerufen. Eine deutliche Zunahme der Intensität erfolgt mit dem Übergang der Reaktion in die exponentielle Phase, die so genannte Log-Phase. Mit Abnahme der für die DNA-Vervielfältigung notwendigen Ausgangsprodukte erreicht die Kurve ein Plateau. Der Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant aus dem Hintergrund heraustritt, wird als Cp-Wert (englisch: crossing point) bzw. Ct-Wert (engl. cycle treshold für Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet. Am Cp ist die Menge neu synthetisierter DNA in allen Reaktionsgefäßen gleich. Ein um eine Einheit höherer Cp entspricht der halben Menge eingesetzter cDNA, bzw. mRNA (Pfaffel, 2004). Idealerweise liegen die Crossing Points zwischen 20 und 30. Werte über 35 basieren in der Regel auf einer sehr geringen Startmenge und es ist damit zu rechnen, dass vermehrt unspezifische Bindungen entstehen.

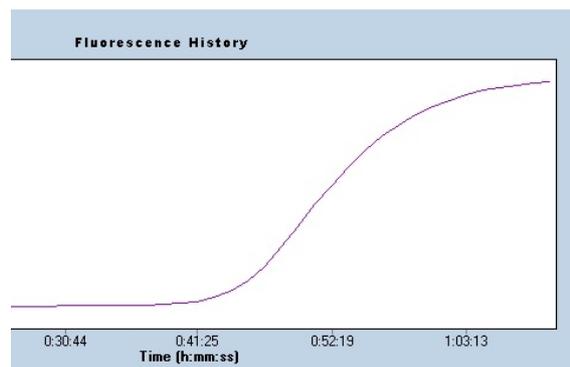


Abb. 12
Sigmoidaler Kurvenverlauf
qRT-PCR

4.12.2 Durchführung

Für die quantitative RT-PCR wurden die RealTime ready Custom Panels 96-8 der Firma Roche verwendet. Hier sind die wells bereits mit den Primern (forward,

reverse) für die zu untersuchenden Gene vorbeschichtet, eine Vorgehensweise, die das Experiment erheblich vereinfacht und Fehlerquellen reduziert. Das Plattenlayout ist im Anhang (Seite 82, Abb. 37) dargestellt.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte mit dem Kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). Bei einem Reaktionsvolumen von insgesamt 10 µl wurden pro well 2,5 µl cDNA, 2,5 µl Wasser (PCR grade) und 5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green eingesetzt. Die RealTime ready Custom Panels waren mit den Primern für sechs zu testende Gene (MYC, TGF-β, ATM, GADD45A, TP53, COX-2) und die beiden Referenzgene β2-Mikroglobulin (B2M) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestückt. Entsprechend der Beschreibung in der Legende von Abbildung 15 erfolgte pro Platte die Auftragung dreier Replikate einer Dosis und Strahlenart sowie der unbestrahlten Kontrolle in jeweils dreifacher Ausführung. Anschließend wurden die Platten mit einer Schutzfolie versehen, bei 1.500g für 2 Minuten zentrifugiert und in den LightCycler® 480 (Roche) eingesetzt. Das Programm der PCR ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
<u>Vorinkubation</u>		
95°C	10 min	1 Zyklus
<u>Amplifikation</u>		
95°C	10 sec	10 Zyklen à 63°C, 35 Zyklen à 55°C } 45 Zyklen
63°C (55°C*)	30 sec	
72°C	30 sec	
<u>Schmelzkurve</u>		
95°C	5 sec	1 Zyklus
65°C	1 min	
97°C	-	
<u>Kühlung</u>		
40°	30 sec	1 Zyklus

Tab. 1: Programm für den PCR-Lauf,

*Reduktion der Temperatur von 63°C auf 55°C nach 10 Zyklen im Sinne einer Touchdown-PCR

Zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung und damit der Amplifikate erfolgte eine Touchdown-PCR [Don, 1991]. Dabei wurde die Annealing-Temperatur entsprechend der Abbildung 13 für die ersten 10 Zyklen auf 63°C festgesetzt, bevor sie dann um jeweils 0,5°C pro Zyklus bis auf 55 °C gesenkt wurde. Die hohe Temperatur zu Beginn erlaubt nur sehr spezifische stabile Bindungen und die exponentielle Vervielfältigung stellt sicher, dass deren Produkte am Ende eines Runs weit überwiegen.

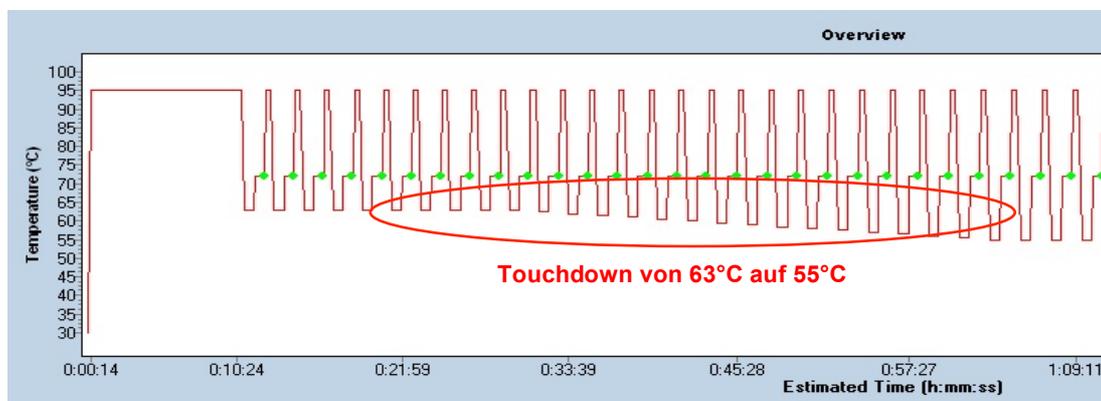


Abb.13: Temperaturverlauf der RT-PCR aufgetragen nach der Zeit

Die Quantifizierung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffes SybrGreen I. Das nach Absorption blauen Lichtes der Wellenlänge 494 nm emittierte grüne Fluoreszenzsignal (Wellenlänge 521 nm) steigt besonders stark an, wenn der Farbstoff an doppelsträngige DNA gebunden hat [Zipper, 2004]. Da die Spezifität dieses Verfahrens eingeschränkt sein kann, wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Jedes PCR-Produkt hat, abhängig von seiner Länge und dem Anteil an den Nukleinbasen Guanin und Cytosin eine individuelle Schmelztemperatur. Definitionsgemäß liegt bei dieser Temperatur die Hälfte der DNA als Doppelstrang, die andere als Einzelstrang vor. Zur Ermittlung der produktspezifischen Schmelztemperatur wird der PCR-Ansatz nach dem letzten Amplifikationszyklus auf 95°C erhitzt, sodass sämtliche dsDNA denaturiert. Bei 65°C verbinden sich die Einzelstränge wieder und werden

anschließend durch langsames Erhitzen von 65°C auf 97°C erneut denaturiert. Dabei wird die Fluoreszenz in 0,11°C-Schritten gemessen und als Schmelzkurve dargestellt. Enthält die Schmelzkurve nur einen Peak, beruhen die während der PCR gemessenen Fluoreszenzen auf der spezifischen Vervielfältigung der Template-DNA. Unspezifische Sequenzen, wie z. B. Primer-Dimer schmelzen bei niedrigeren Temperaturen und erzeugen so einen weiteren Peak [Roche, LightCycler 480 Sybr Green I Master, Version 2011].

4.12.3 Auswertung

Die Crossing Points (CPs) wurden von der Light Cycler Software mit der „Second Derivative Maximum-Methode“ über die 2. Ableitung der Fluoreszenzkurve ermittelt. Die Bestimmung der Expressionsunterschiede (Ratios) erfolgte durch relative Quantifizierung. Dabei wurde die Genexpression eines Zielgens auf das nicht regulierte Housekeeping-Gen GAPDH bezogen. Die Varianz der Expressionsergebnisse kann so reduziert werden, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription sowohl das Zielgen als auch das Housekeeping-Gen betreffen. Die individuellen Probeneffekte heben sich in den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes gegenseitig auf. Da bei dieser Vorgehensweise keine absoluten Konzentrationen betrachtet werden, spricht man von relativer Quantifizierung.

Die Berechnung der Ratios erfolgte nach der von M. W. Pfaffl beschriebenen $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode [Pfaffl, 2004]. Dazu wurde in einem ersten Schritt von jeder untersuchten Probe der CP-Wert des Referenzgens GAPDH vom CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als Normalisierung der Expressionsergebnisse und den erhaltenen Wert als ΔCP . Anschließend wurde vom ΔCP -Wert der bestrahlten Probe der ΔCP -Wert einer unbestrahlten Kontrolle subtrahiert. Der so gebildete $\Delta\Delta\text{CP}$ -Wert wurde dann in die arithmetische Formel

$2^{-\Delta\Delta C_P}$ eingesetzt. Da dieses Berechnungsschema eine Verdoppelung der DNA in jedem Zyklus voraussetzt, was nur bei einer optimalen real-time PCR Effizienz in allen Proben der Fall wäre, wurde die Expression eines Gens erst als hochreguliert eingestuft, wenn eine Ratio > 2 berechnet wurde. Werte < 2 wurden auf eine Herunterregulierung der Expression zurückgeführt. Hoch- und Herunterregulierung sind bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen.

4.13 ELISA

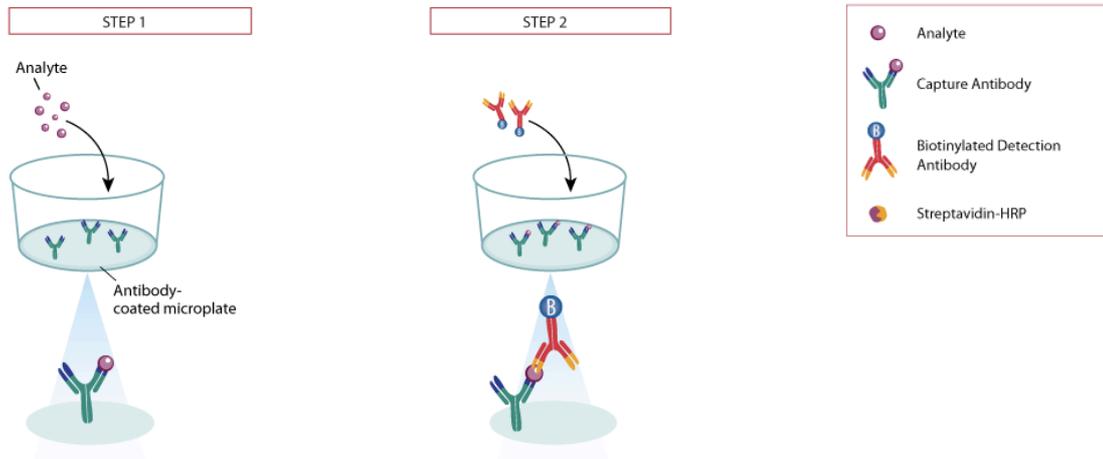
Bei dem von Peter Perlmann in den 1970er Jahren entwickelten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um ein antikörperbasiertes enzymales Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen [Engvall und Perlmann, 1971].

Die hier angewendete ELISA-Technik wird aufgrund des Einsatzes zweier Antikörper zur Detektion der Zielsubstanz auch als Sandwich-Verfahren bezeichnet. Das zu untersuchende Probenmaterial in Form der Überstände des oben genannten Nährmediums, in dem die Hautmodelle kultiviert wurden, wurde zu Versuchsbeginn mit weiterem Medium verdünnt. Der jeweils geeignete Verdünnungsfaktor wurde in entsprechenden Vorversuchen ermittelt.

Für den Nachweis von Interleukin-1 (IL-1) bzw. Matrix-Metallo-Proteinase-1 (MMP-1) aus dem Nährmedium des Hautmodells wurden 96-well Mikrotiterplatten aus den Quantikine® Kits (R&D Systems, Minneapolis) verwendet, die bereits mit einem monoklonalen *Capture-Antibody* gegen das zu untersuchende Protein „vorgecoated“ sind. Bei der Aufarbeitung weiterer Proben wurden die Kits gewechselt (DuoSet ELISA Development System, R&D Systems) und dieser Schritt manuell durchgeführt. Die Experimente wurden um die Untersuchung des Interleukin-8 erweitert. Hierzu wurden die entsprechenden *Capture-Antibodies* am Vortag des Versuches aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Bindungsprozess wurde durch einen Waschschriff und die Zugabe eines *Block Buffers* beendet. Das daraufhin zugegebene Protein (im Nährmedium der Proben und

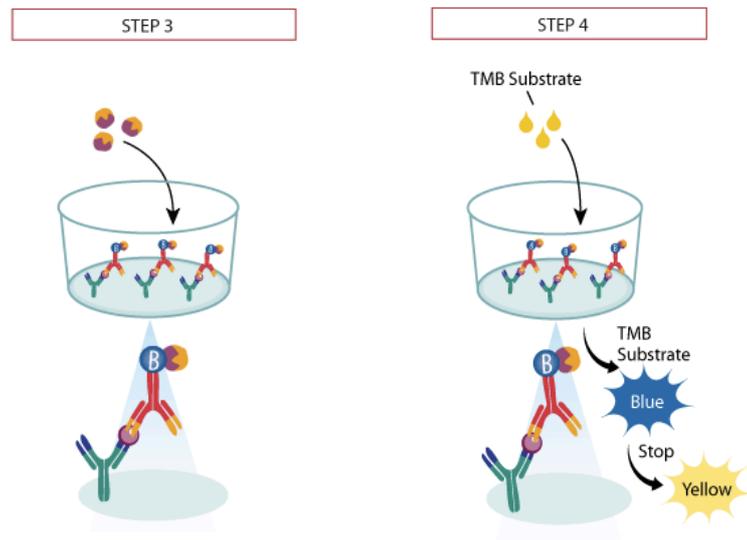
Kontrollen und im Standard enthalten; in Abbildung 14 als Analyte bezeichnet) wurde inkubiert und dabei entsprechend einer Antigen-Antikörper-Reaktion an den fixierten Antikörpern gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden ungebundene Bestandteile durch Waschen entfernt und ein zweiter, enzymgebundener Antikörper, der sogenannte *Detection-Antibody*, hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Streptavidin-HRP). Ungebundene Moleküle wurden wieder durch Waschen entfernt. Diese Peroxidase bindet an den Detection-Antibody und oxidiert die im nächsten Schritt zugegebene Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution. Die Oxidation des TMB-Substrates führte zur Bildung eines blauen Endproduktes. Nach einem definierten Zeitfenster von 20 min. wurde die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt und es entstand ein stabiler gelber Farbkomplex. Die optische Dichte der Reaktionslösung verhält sich proportional zur Menge des gebundenen Proteins.

Die Farbintensität konnte nun gemessen und mit der Intensität der auf der selben Platte aufgetragenen Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration verglichen werden. Innerhalb von 30 Minuten nach dem Stopp des enzymvermittelten Farbumschlags wurde mit Hilfe des Spektrophotometers EL808 (BioTek) die optische Dichte bei einer Wellenlängenkorrektur von 540nm und 570nm bestimmt und mit der Software Gen5.1.1 (BioTek) ausgewertet. Für ein präzises Messergebnis empfiehlt es sich das Spektrophotometer ca. 20 Minuten zuvor einzuschalten, damit sich die enthaltenen Lampen warmlaufen können. Mit Ausnahme der Inkubationstemperatur für den *Capture-Antibody* wurden alle Schritte der ELISAS exakt nach den Angaben des Herstellers der Kits durchgeführt. Abbildung 14 stellt den Arbeitsablauf graphisch dar. Eine Übersicht der untersuchten Proben und ihrer Verteilung auf die durchgeführten Experimente ist in Abbildung 15 (Seite 41) dargestellt.



Der Capture-Antibody bindet an den Boden der Microtiterplatte. Ungebundene Moleküle werden durch Waschen entfernt. Die Platten werden geblockt und nochmals gewaschen. Die Proben, Kontrollen und Standards (Analyte) werden zugegeben. Es folgt ein Waschschrift.

Der Detection-Antibody wird zugegeben. Es folgt ein Waschschrift.



Streptavidin-HRP bindet an die Detection-Antibodies. Es folgt ein Waschschrift.

Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat wird zugegeben und ein blauer Farbkomplex entsteht. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb. Die optische Dichte der Reaktionslösung verhält sich proportional zur Menge des untersuchten Proteins bzw. Standards.

Abb.14:
Prinzip DuoSet®
ELISA, R&D Systems,
adaptiert

Strahlen-qualität	Dosis	Anzahl Proben/ Kontrollen	Strahlen-qualität	Dosis	Anzahl Proben/ Kontrollen
X-ray	1 Gy	3	X-ray	1 Gy	3
	2 Gy	3		2 Gy	3
	4 Gy	3		4 Gy	3
	0 Gy	3		0 Gy	3
Protonen	1 Gy	3	Protonen	1 Gy	3
	2 Gy	3		2 Gy	3
	4 Gy	3		4 Gy	3
	0 Gy	3		0 Gy	3
Lithium- Ionen	1 Gy	3	Lithium- Ionen	1 Gy	3
	2 Gy	3		2 Gy	3
	4 Gy	3		4 Gy	3
	0 Gy	3		0 Gy	2*

 24 h
  14 d

m-RNA-Isolierung und PCR
 ELISA

Abb.15: Verteilung der 71 Hautmodelle Epi-Derm-201TM auf die durchgeführten Experimente:
 Die Fixierung der Proben und Kontrollen für die Real-Time PCR erfolgte 24 h nach Bestrahlung;
 der mittels ELISA erfasste Beobachtungszeitraum umfasste 14 Tage, *1 Hautmodell mit fehlerhafter
 Bestrahlung wurde von der Auswertung ausgeschlossen

5 Ergebnisse

5.1 qRT-PCR mit cDNA

Nach Isolierung der mRNA und Umschreibung in die entsprechende cDNA wurden die mit Röntgenstrahlen, Protonen und Lithium-Ionen bei 1, 2 und 4 Gy behandelten Proben und unbehandelten Kontrollen bezüglich der Regulation ausgewählter Gene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Von den betrachteten Genen (ATM, TP53, GADD45A, TGF- β , MYC, COX-2) ist bekannt, dass sie entweder direkt durch ionisierende Strahlung reguliert werden und/oder miteinander interagieren und einen Bezug zu den Themen Tumormilieu und Entzündung aufweisen (siehe auch Abb. 7, Seite 18). Einen vereinfachten Überblick möglicher Interaktionen zeigt Abb. 16. Die Tabelle 2 enthält die durchgeführten Konzentrationsmessungen der isolierten mRNA.

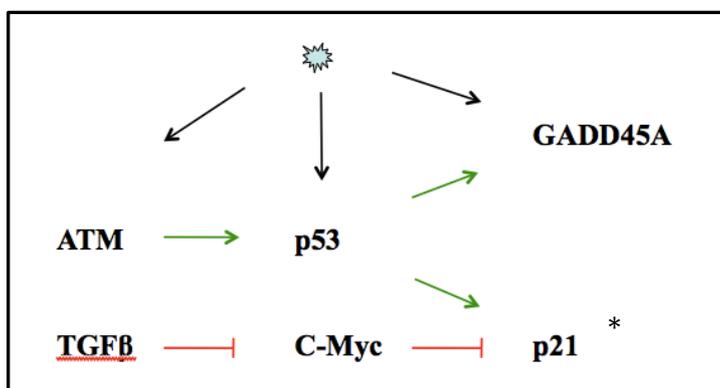


Abb. 16:
Interaktion untersuchter Gene;
grüner Pfeil: „aktiviert“;
rote Verbindung: „hemmt“;
blaues Symbol: „ionisierende Strahlen“;
*nicht untersucht

Probe		Röntgenstrahlen	Protonen	Lithium-Ionen
1 Gy	P1	9,6 ng/ μ l	10,5 ng/ μ l	9,1 ng/ μ l
	P2	21,9 ng/ μ l	10,7 ng/ μ l	10,6 ng/ μ l
	P3	13,5 ng/ μ l	10,7 ng/ μ l	11,1 ng/ μ l
2 Gy	P1	24,6 ng/ μ l	11,7 ng/ μ l	10,0 ng/ μ l
	P2	12,5 ng/ μ l	9,8 ng/ μ l	14,2 ng/ μ l
	P3	15,7 ng/ μ l	8,7 ng/ μ l	10,5 ng/ μ l
4 Gy	P1	14,2 ng/ μ l	9,2 ng/ μ l	13,2 ng/ μ l
	P2	14,7 ng/ μ l	16,7 ng/ μ l	9,3 ng/ μ l
	P3	15,8 ng/ μ l	8,5 ng/ μ l	10,3 ng/ μ l

Kontr.	Kontr. Röntgenstr.	Kontr. Protonen	Kontr. Lithium-I.
P1	32,1 ng/μl	9,9 ng/μl	*
P2	10,8 ng/μl	10,9 ng/μl	11,4 ng/μl
P3	18,8 ng/μl	10,4 ng/μl	10,6 ng/μl

Tab. 2: *m*-RNA Konzentrationsbestimmung nach Isolierung; * diese Kontrolle erhielt eine falsche Dosis und musste daher ausgeschlossen werden

Da die Quantifizierung der Expressionsergebnisse der RT-PCR mittels Detektion des Farbstoffes SYBR Green durchgeführt wurde, erfolgte im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse. Alle Schmelzkurven erfüllten die erforderlichen Kriterien, sodass die Spezifität der Amplifikation gewährleistet ist. Abbildung 17 zeigt exemplarisch eine Schmelzkurvenanalyse nach der Vervielfältigung von ATM.

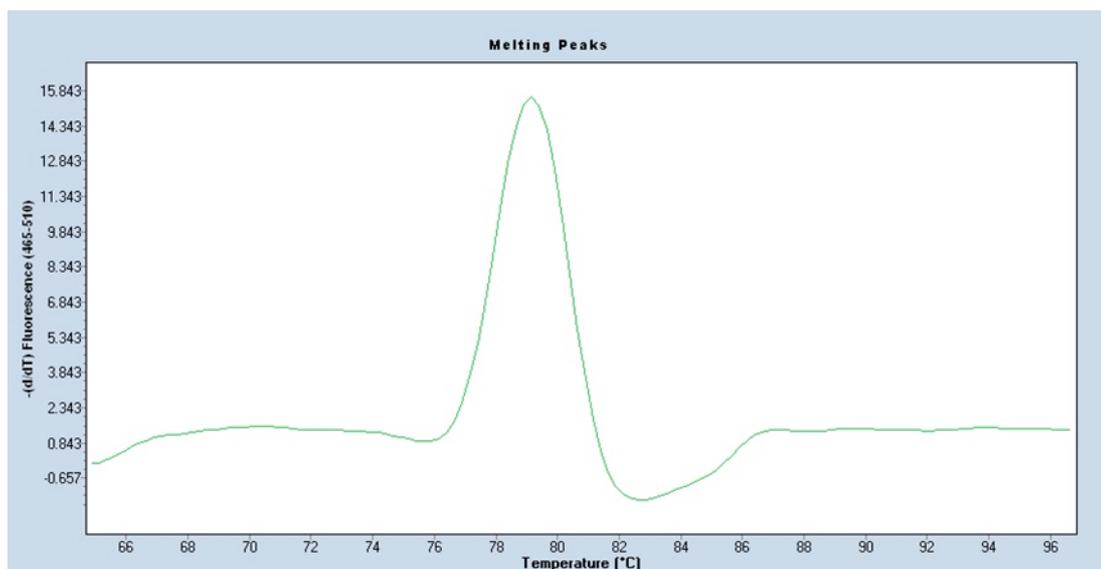


Abb. 17: Schmelzkurve, ATM, Probe mit 2 Gy Protonen bestrahlt

Bei der Auswertung der Crossing Points nach der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode wurde aus den erhaltenen drei Ratios je Probe und Gen ein Mittelwert gebildet. Die Abbildungen 18-23 zeigen eine Aufstellung der Ergebnisse anhand des jeweils untersuchten Gens.

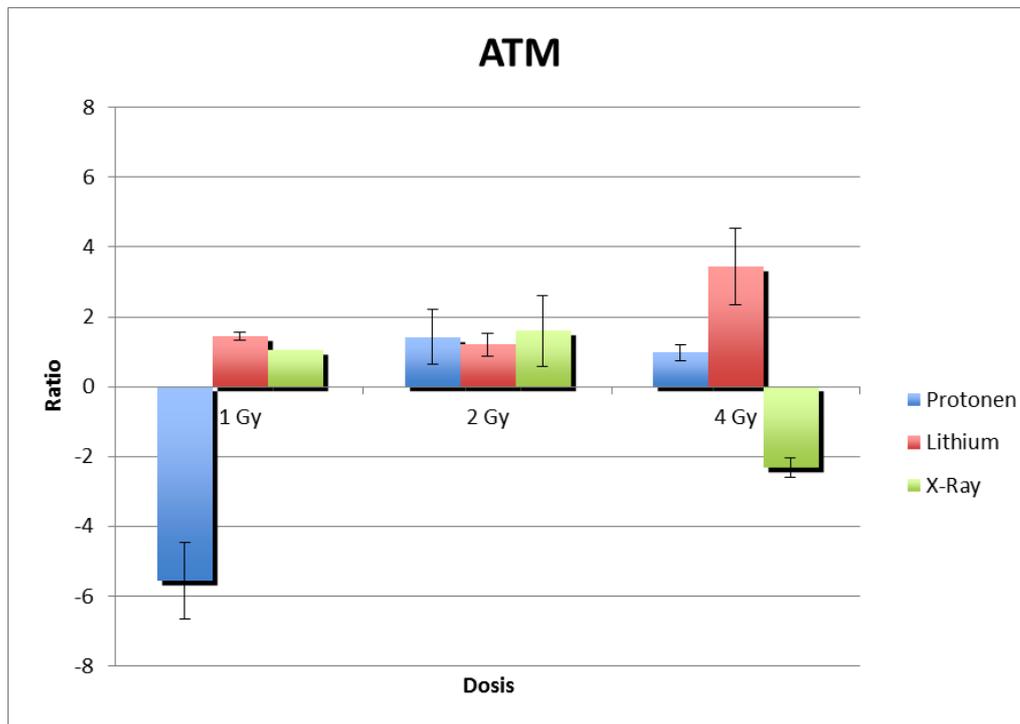


Abb.18: Relative Expressionsunterschiede ATM

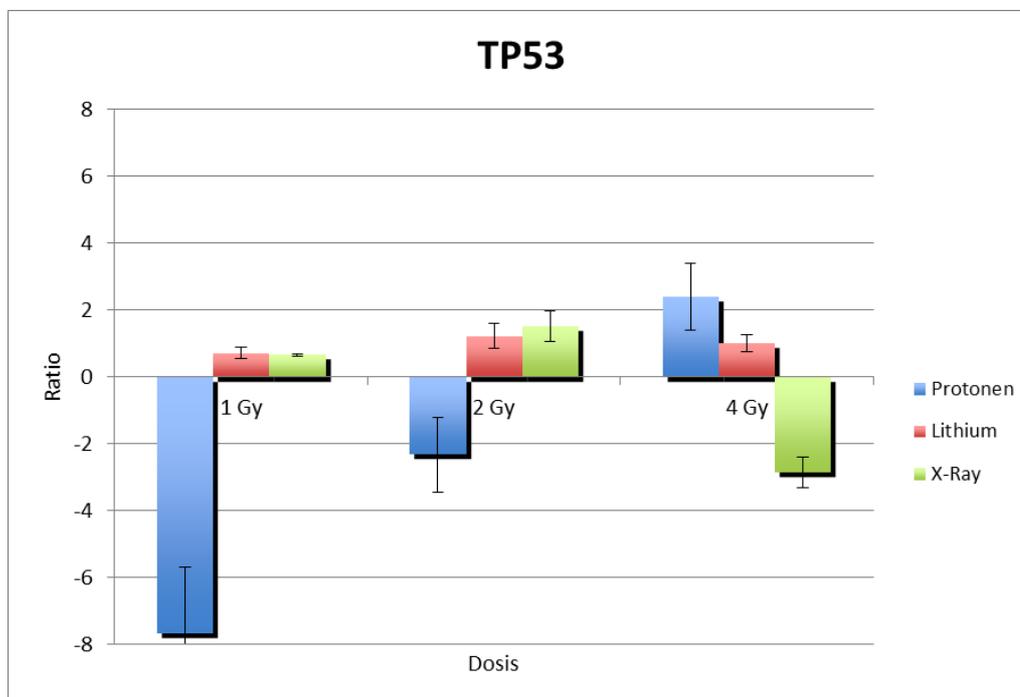


Abb.19: Relative Expressionsunterschiede TP53

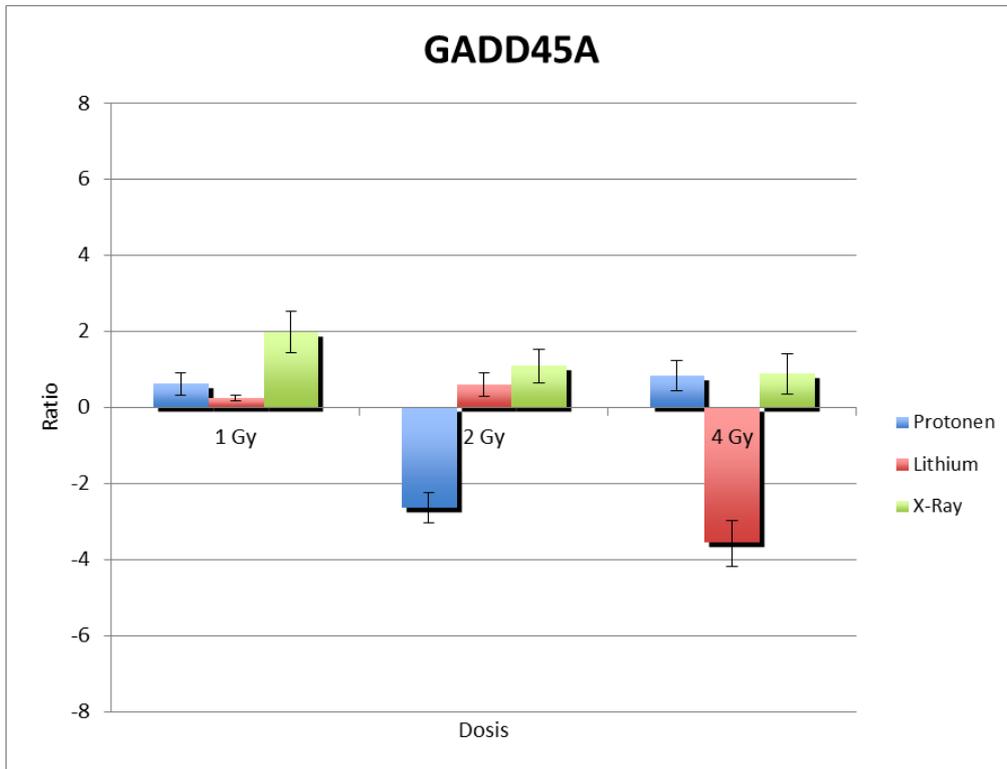


Abb. 20: Relative Expressionsunterschiede GADD45A

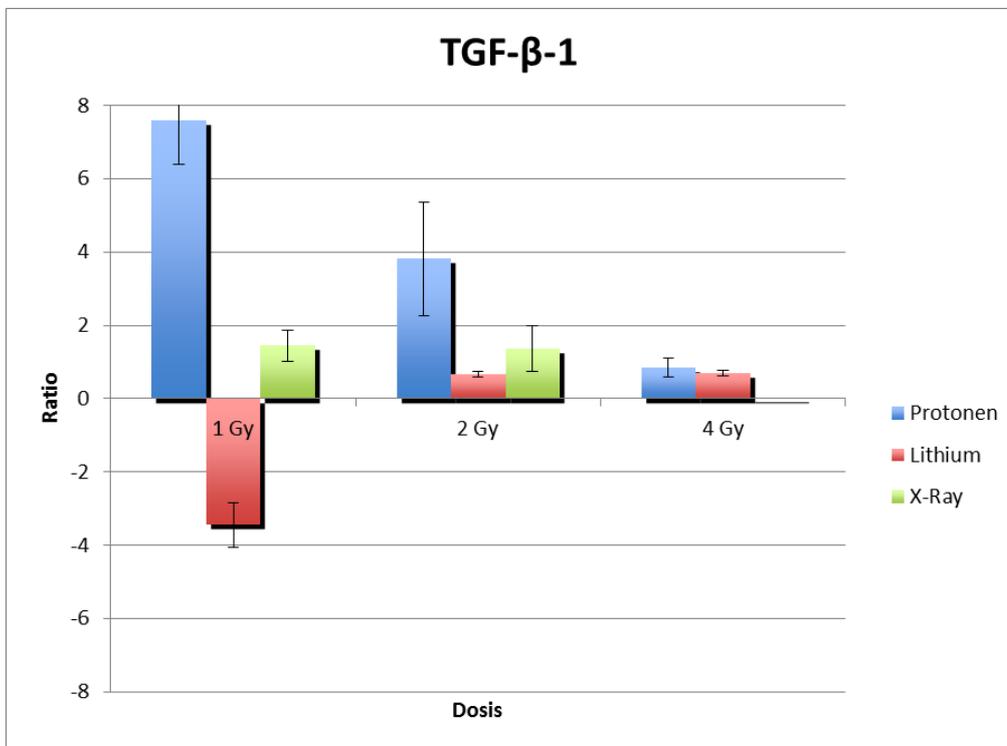


Abb. 21: Relative Expressionsunterschiede TGF- β -1

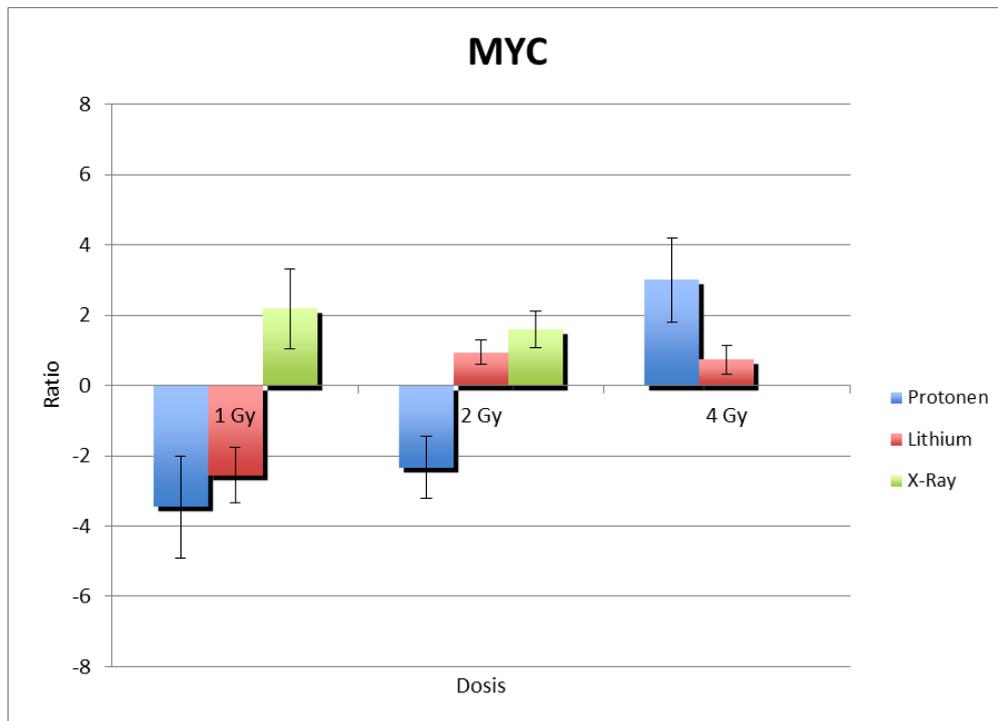


Abb. 22: Relative Expressionsunterschiede MYC

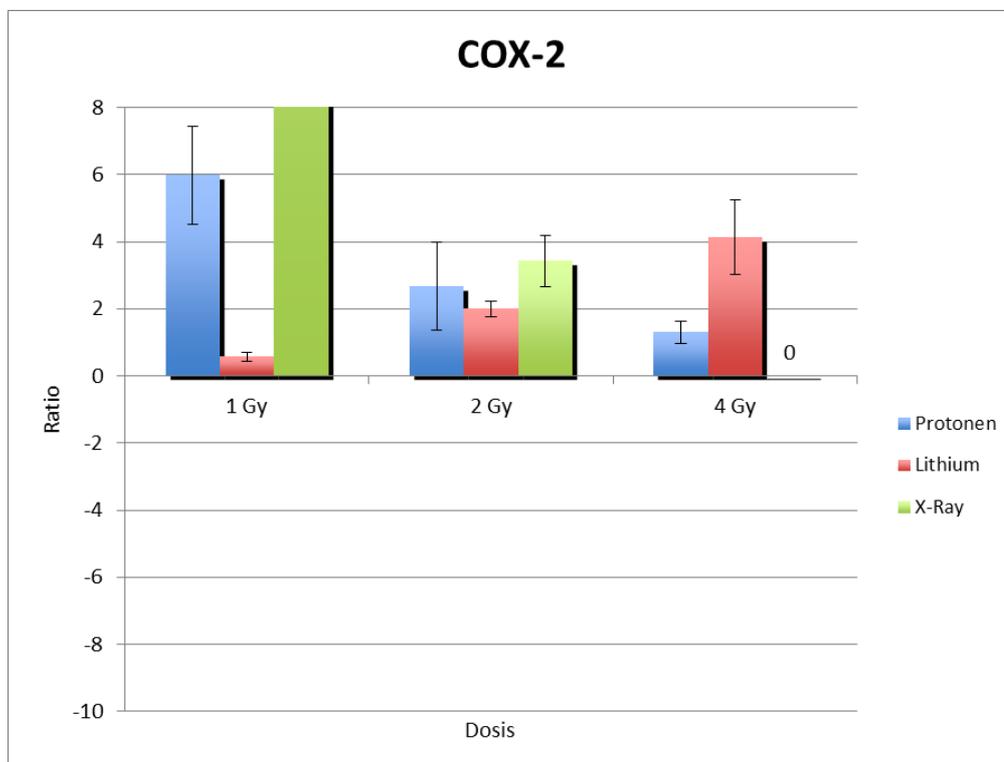


Abb. 23: Relative Expressionsunterschiede COX-2

Die Ratios in den Abbildungen 18-23 zeigen eine Herauf- oder Herunterregulierung um ein Vielfaches bezogen auf die nichtbestrahlte Kontrolle. Ab einem Wert von über 2 besteht eine signifikante Heraufregulierung, unterhalb von -2 eine signifikante Herunterregulierung. In Abbildung 24 werden die Ergebnisse nochmals zusammenfassend illustriert und signifikante Unterschiede hervorgehoben. Dafür wurden hier sogenannte äquivalente Dosen einander gegenübergestellt, nämlich 2 Gy für Röntgen- und Protonenstrahlung und 1 Gy für Lithiumionen. Dieses Konzept basiert auf Unterschieden in den relativen biologischen Wirksamkeiten der verschiedenen Strahlenarten.

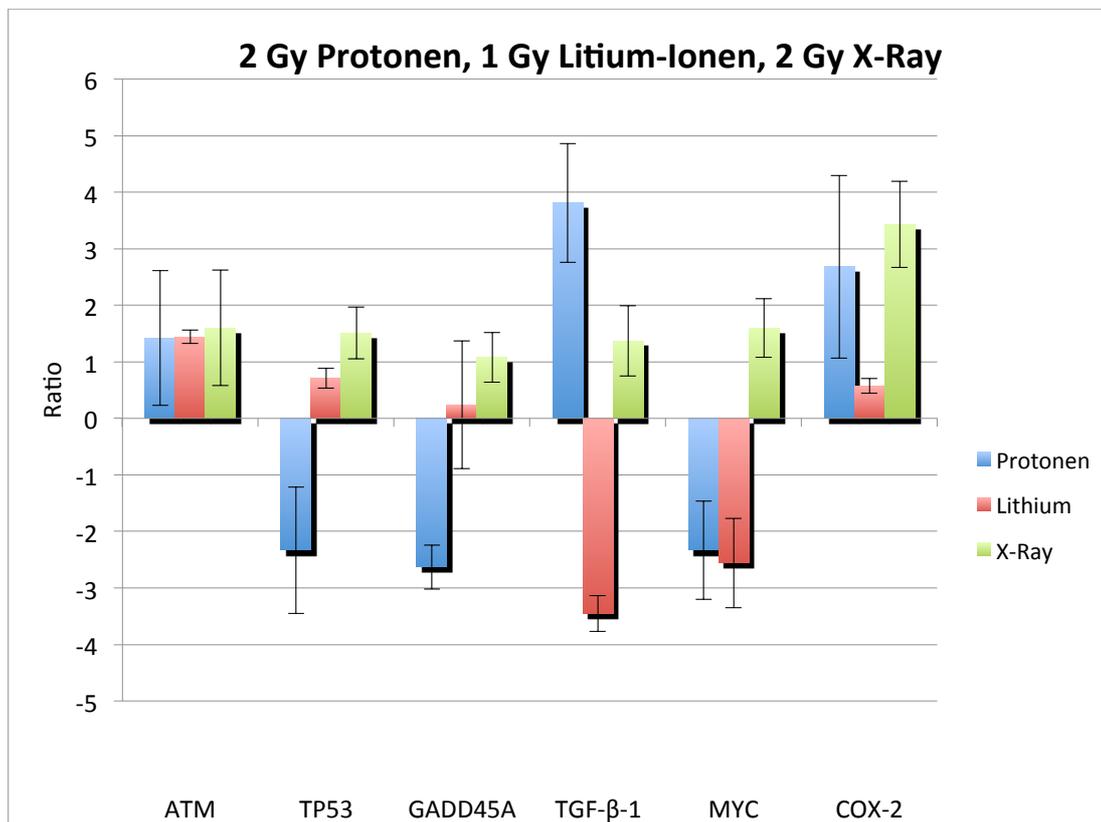


Abb. 24: Relative Expressionsunterschiede ATM, TP53, GADD45A, TGF-β-1, MYC, COX-2 nach Bestrahlung mit äquivalenten Dosen

Wie in Abbildung 24 dargestellt, gibt es bei den Genen ATM, TP53, GADD45A und MYC nur geringe Unterschiede zwischen den Strahlenarten. Der Entzündungsfaktor TGF-beta-1 ist bei Protonen hochreguliert, bei Lithiumionen herunterreguliert, während es bei Röntgenstrahlung zu keiner Änderung kommt. Der zweite Entzündungsfaktor COX-2 zeigt eine signifikante Hochregulation bei Protonen und Röntgenstrahlung, aber nicht bei Lithiumionen.

5.2 ELISA

Aus dem Medium, das die Epi-Derm-201TM – Hautmodelle mit Nährstoffen versorgte, wurden die Konzentrationen bestimmter Interleukine und Chemokine mittels ELISA bestimmt. Zunächst wurde nur das Medium konserviert, in welchem die Hautmodelle vor Bestrahlung kultiviert wurden sowie das nach Bestrahlung neu zugegebene Medium, das für eine Dauer von 24h die Versorgung sicherstellte. Die Bestrahlung erfolgte wie schon bei den Proben für die Genexpressionsanalyse jeweils mit 1, 2 und 4 Gy Röntgenstrahlen, Protonen und Lithium-Ionen.

Die erhaltenen Daten stellen aufgrund der meist sehr kurzen Halbwertszeit immer eine Momentaufnahme der Interleukin- bzw. Chemokin-Ausschüttung zum Zeitpunkt der Konservierung des Mediums dar. Jeder Wert geht auf eine Doppelbestimmung zurück. Interleukin-6 (IL-6) konnte nicht detektiert werden, sodass davon auszugehen ist, dass dieses Interleukin nicht bzw. nur in sehr geringer Menge sezerniert wurde.

5.2.1 Ergebnisse 14-Tage-ELISA

Nach Testung der passenden Verdünnungsfaktoren sowie Sicherstellung der Detektierbarkeit verschiedener Interleukine bzw. Chemokine wurden Matrix-Metalloproteinase-1- (MMP-1), Interleukin-1-alpha- (IL-1-alpha) und Interleukin-8- (IL-8 bzw. CXCL8) -ELISAs durchgeführt. Dabei umfasste der Beobachtungszeitraum 14 Tage. Die Abnahmezeitpunkte lagen bei 0h, 2, 4, 6, 8, 10 und 14 Tagen. Das Medium wurde alle 48 Stunden erneuert. Jedem Datenpunkt liegt die Doppelbestimmung dreier gleich behandelter Proben zu Grunde. Die jeweilige Standardabweichung ist gekennzeichnet durch einen vertikalen hellgrauen Balken.

Während der stärkste Anstieg der MMP-Konzentration nach X-Ray-Bestrahlung am Tag 2 nach Applikation der Dosis 2 Gy zu beobachten ist (Abb. 25), lässt sich nach Bestrahlung mit Protonen bezogen auf die Kontrolle keine Veränderung beobachten (Abb. 26). Nach Applikation von Lithium-Ionen der Dosis 4 Gy zeigen die Hautmodelle in Relation zum 0h-Wert den deutlichsten und kontinuierlichsten Anstieg der MMP-Ausschüttung (Abb. 27).

Die IL-1-alpha-Ausschüttung ist nach 4-Gy-X-Ray-Bestrahlung besonders ausgeprägt (Abb. 28). Auf die 4 Gy-Bestrahlung mit Protonen folgt eine geringere IL-1-alpha-Sezernierung (Abb. 29). Der zunächst auffallend ähnliche Wert beim Vergleich von 2 Gy-Röntgen- und 2 Gy-Protonen-Bestrahlung wird im Falle der Röntgenstrahlen-Applikation durch den parallelen Anstieg des Interleukins bei den Kontrollen relativiert, sodass der Effekt bei Röntgenbestrahlung geringer zu sein scheint. Bei Betrachtung der Dosis 1 Gy verzeichnet die Lithium-Bestrahlung den höchsten IL-1-alpha-Anstieg, zeigt aber nach Applikation von 2 und 4 Gy überwiegend fallende Werte (Abb. 30).

Die Ergebnisse der IL-8 ELISAs (Abb. 31 und 32) sind vergleichbar mit denen der IL-1-alpha-Essays.

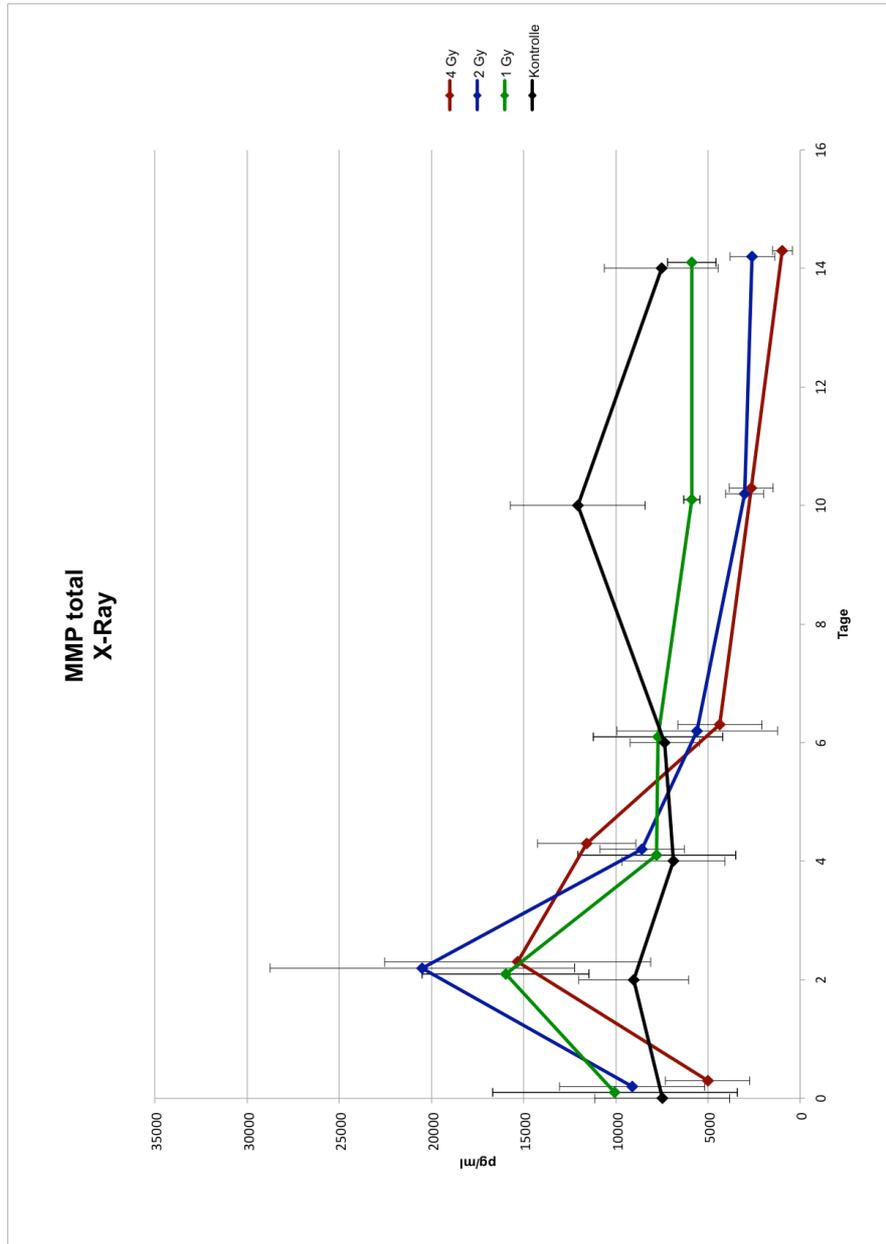


Abb. 25: Konzentrationen der Matrix-Metallo-Proteinase-1 (MMP-1) nach Röntgenbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

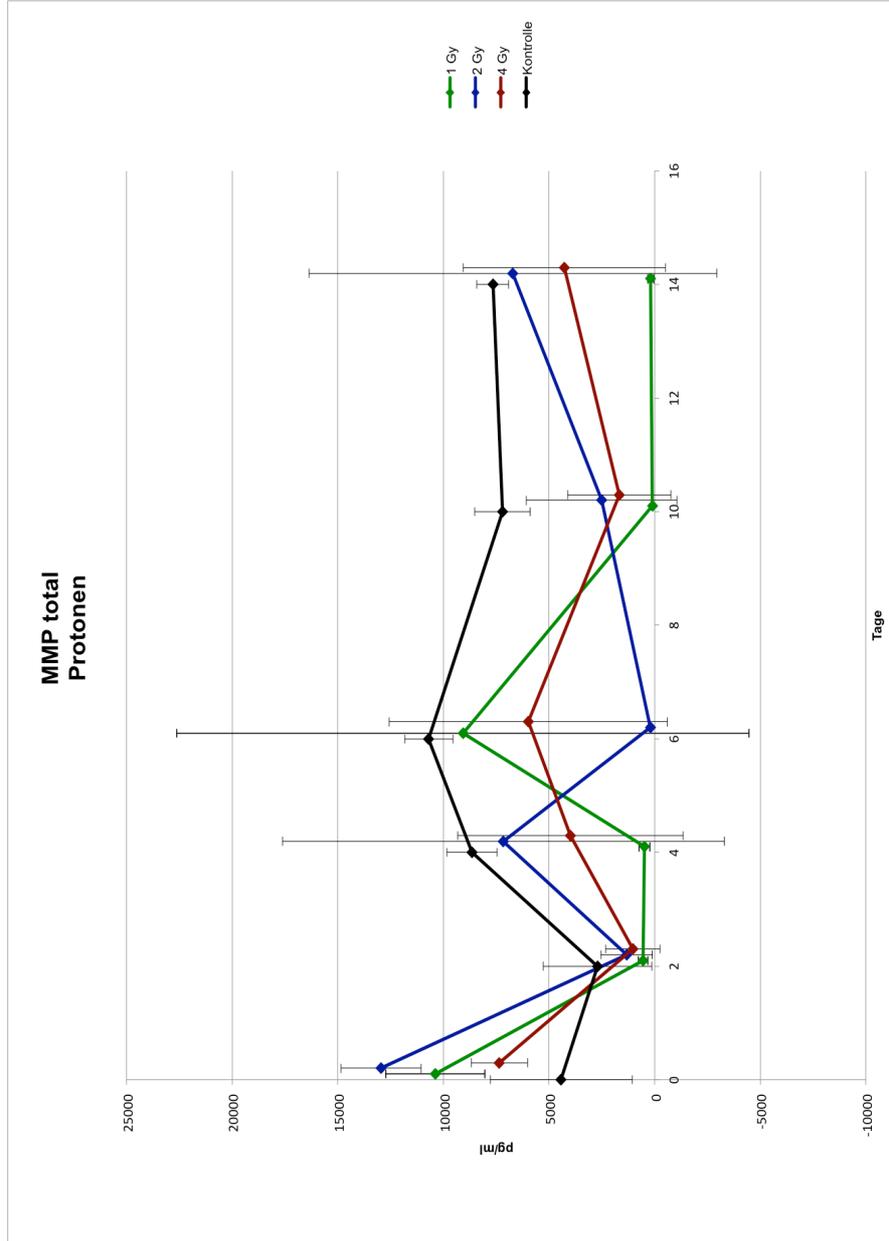


Abb. 26: Konzentrationen der Matrix-Metallo-Proteinase-1 (MMP-1) nach Protonenbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

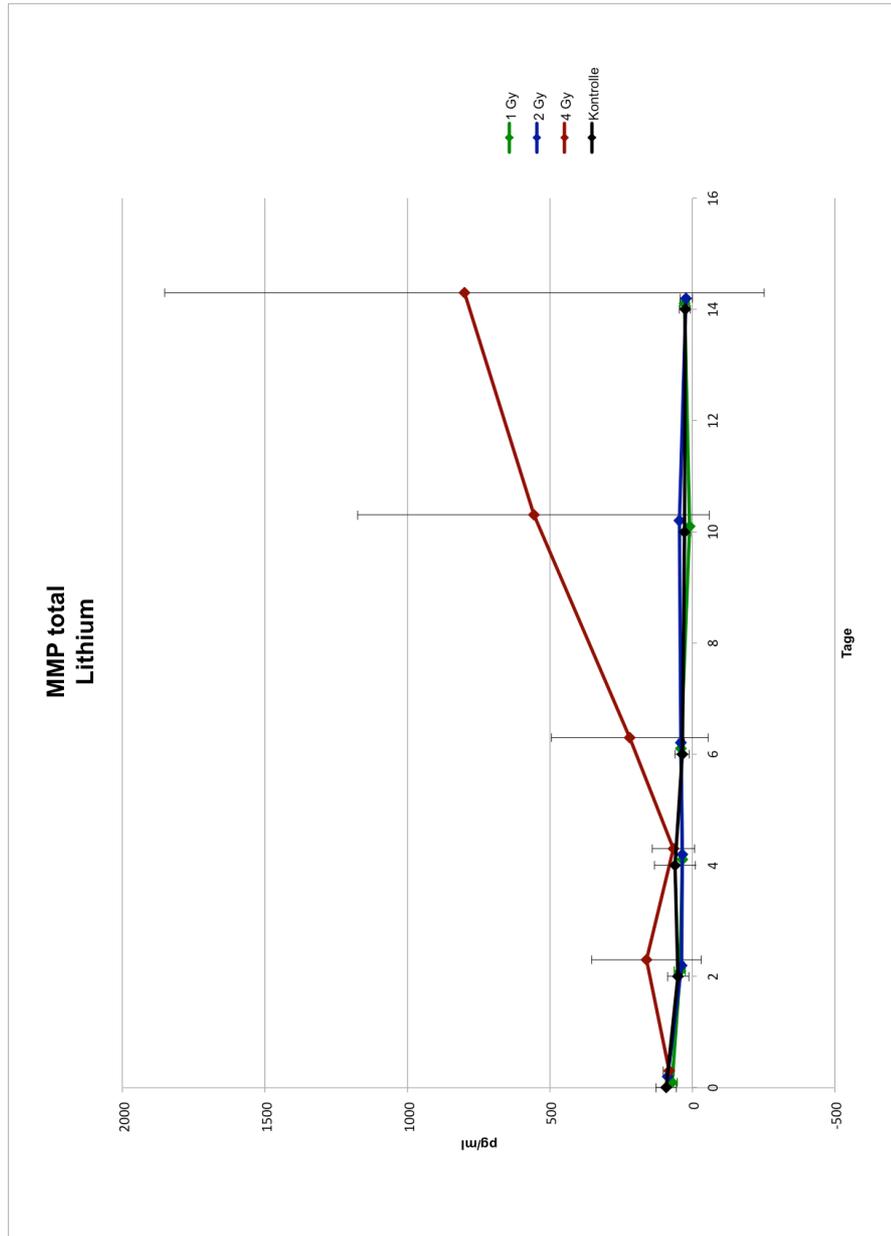


Abb. 27: Konzentrationen der Matrix-Metallo-Proteinase-1 (MMP-1) nach Lithiumbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

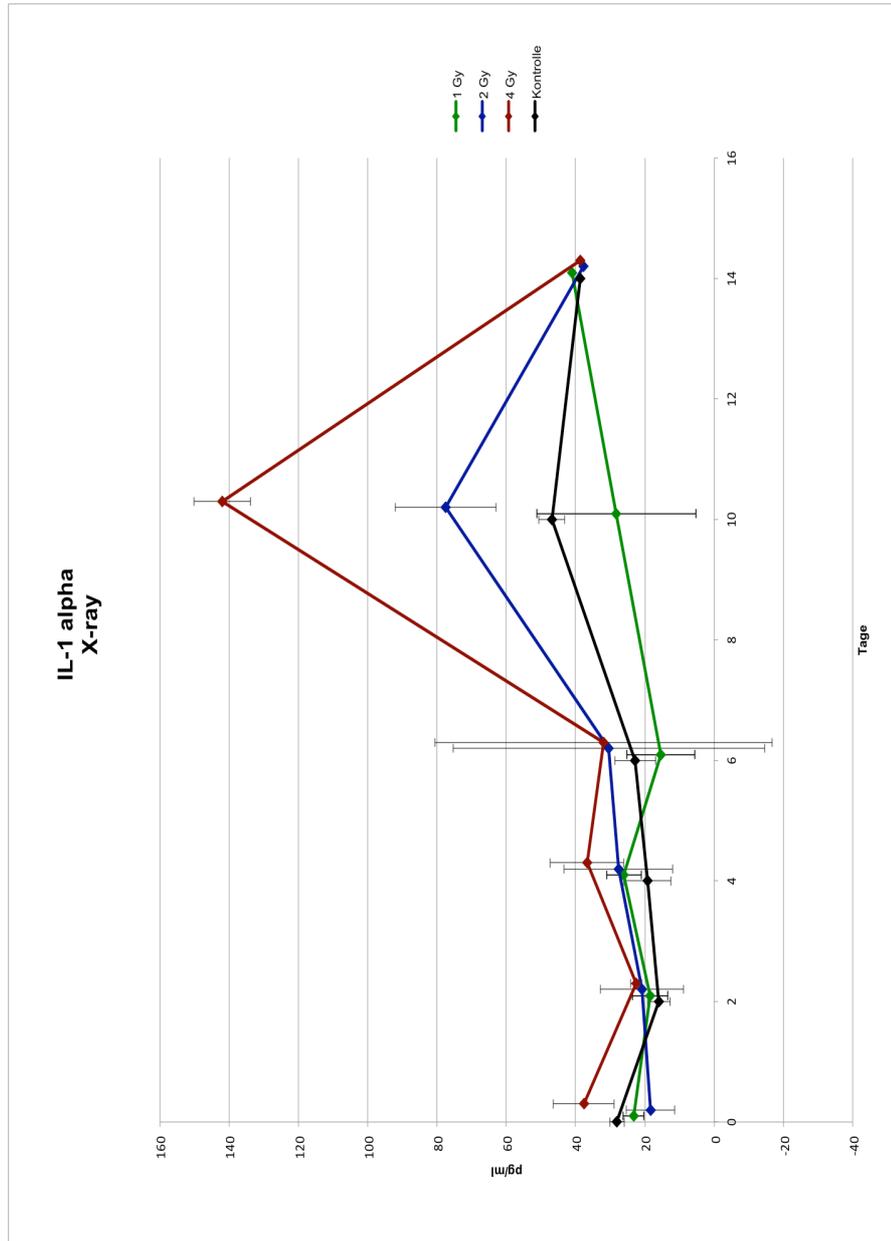


Abb. 28: Konzentrationen Interleukin-1-alpha (IL-1-alpha) nach Röntgenbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

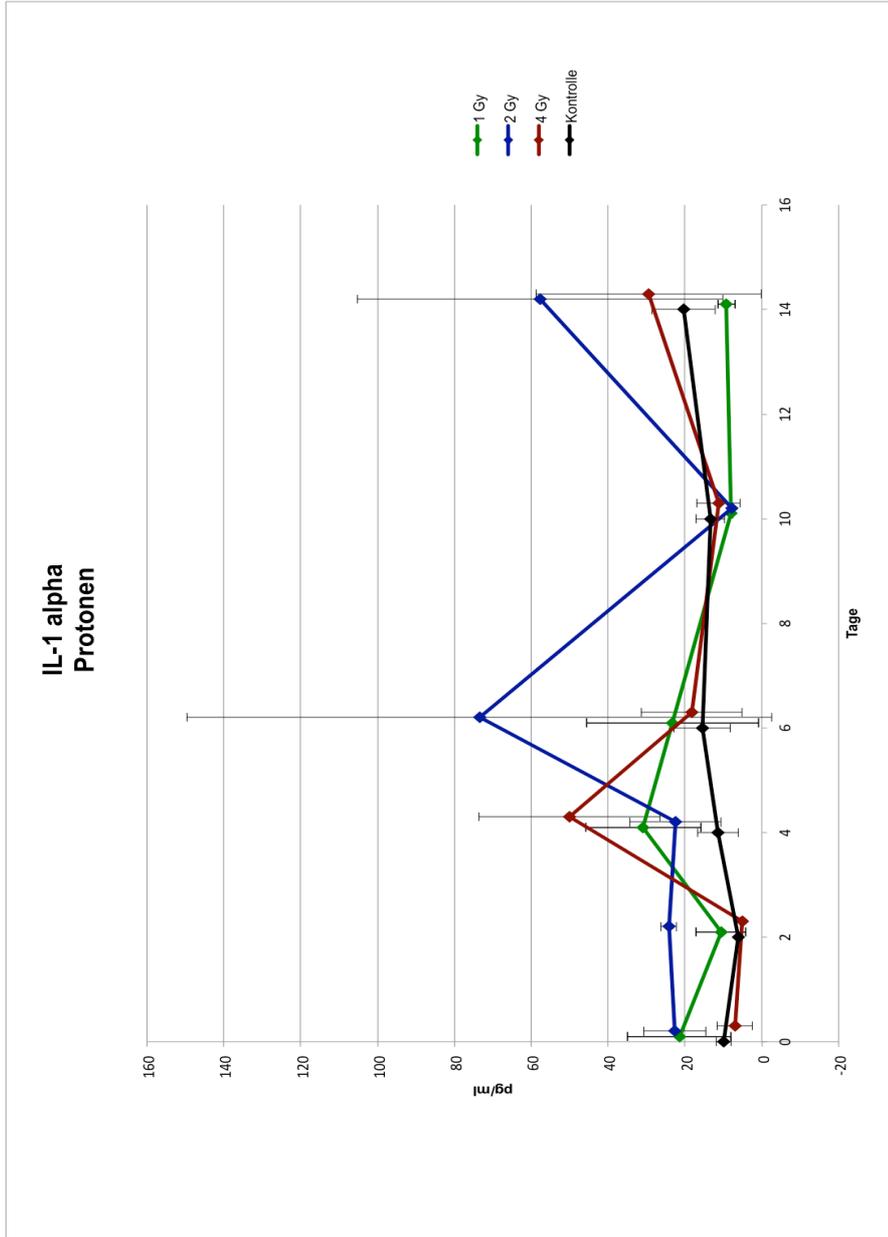


Abb. 29: Konzentrationen Interleukin-1-alpha (IL-1-alpha) nach Protonenbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

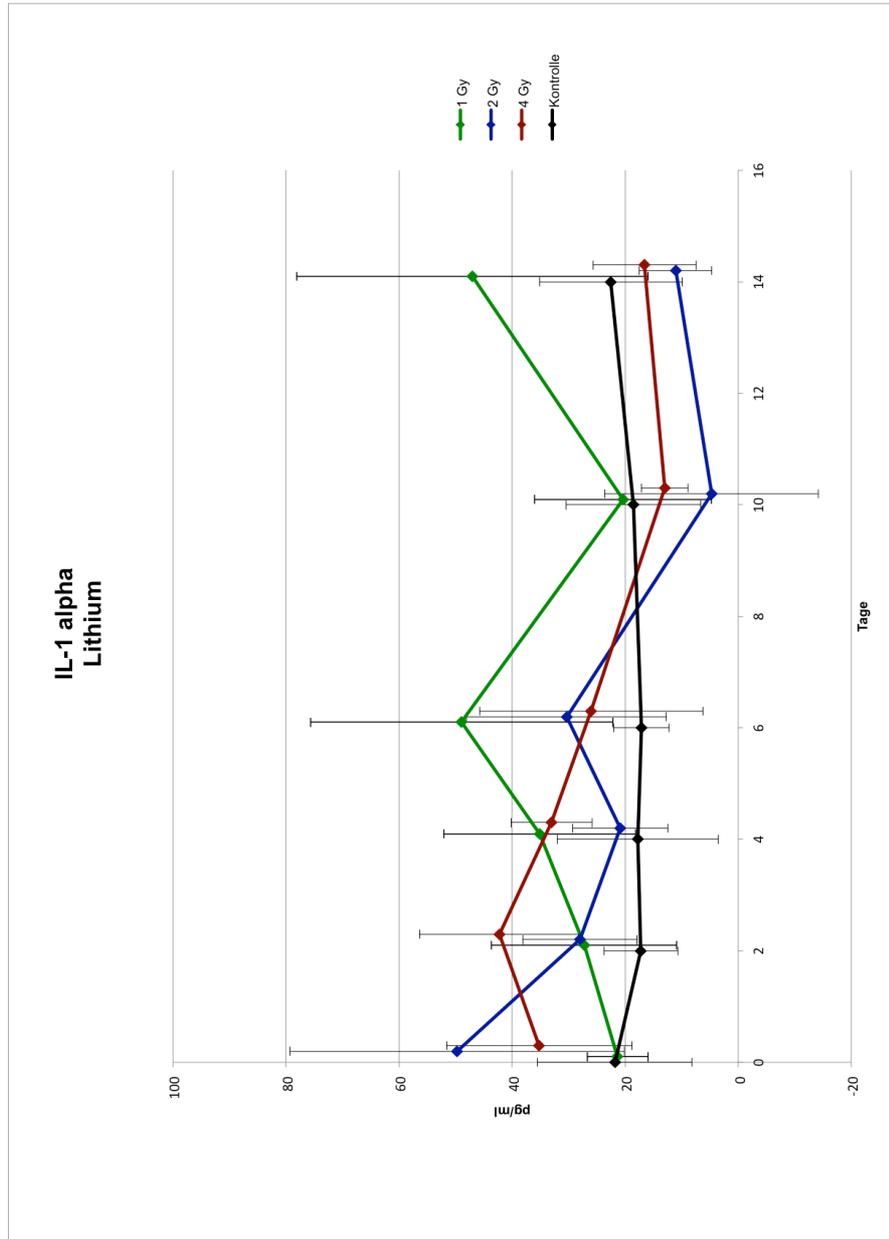


Abb. 30: Konzentrationen Interleukin-1-alpha (IL-1-alpha) nach Lithiumbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

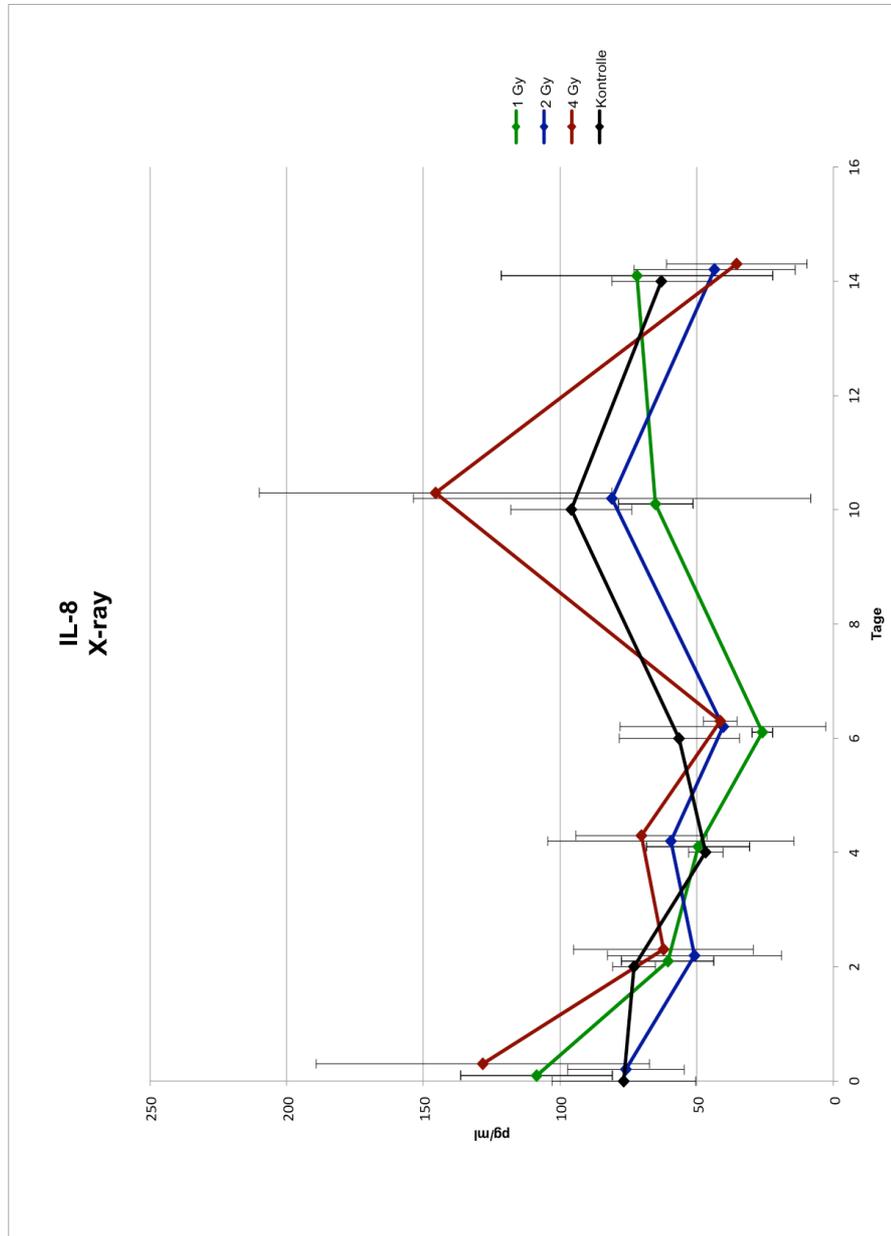


Abb. 31: Konzentrationen Interleukin-8 (IL-8) nach Röntgenbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

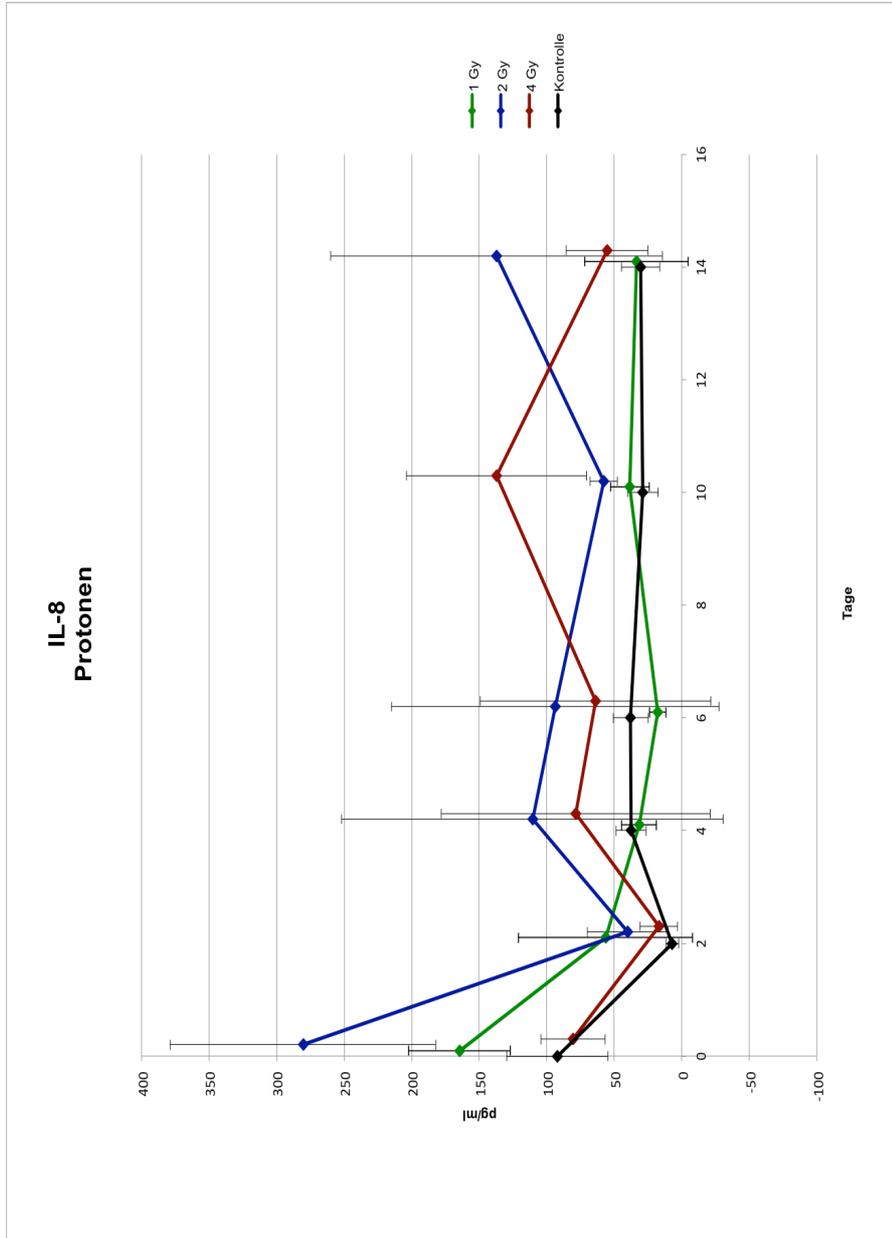


Abb. 32: Konzentrationen Interleukin-8 (IL-8) nach Protonenbestrahlung mit 1, 2, und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ELISA)

In Abbildung 33 werden die IL-1-Ergebnisse nochmals zusammenfassend illustriert und signifikante Unterschiede hervorgehoben. Dafür wurden sogenannte äquivalente Dosen einander gegenübergestellt, nämlich 2 Gy für Röntgen- und Protonenstrahlung und 1 Gy für Lithiumionen. Dieses Konzept basiert auf der unterschiedlichen relativen biologischen Wirksamkeit der verschiedenen Strahlenarten.

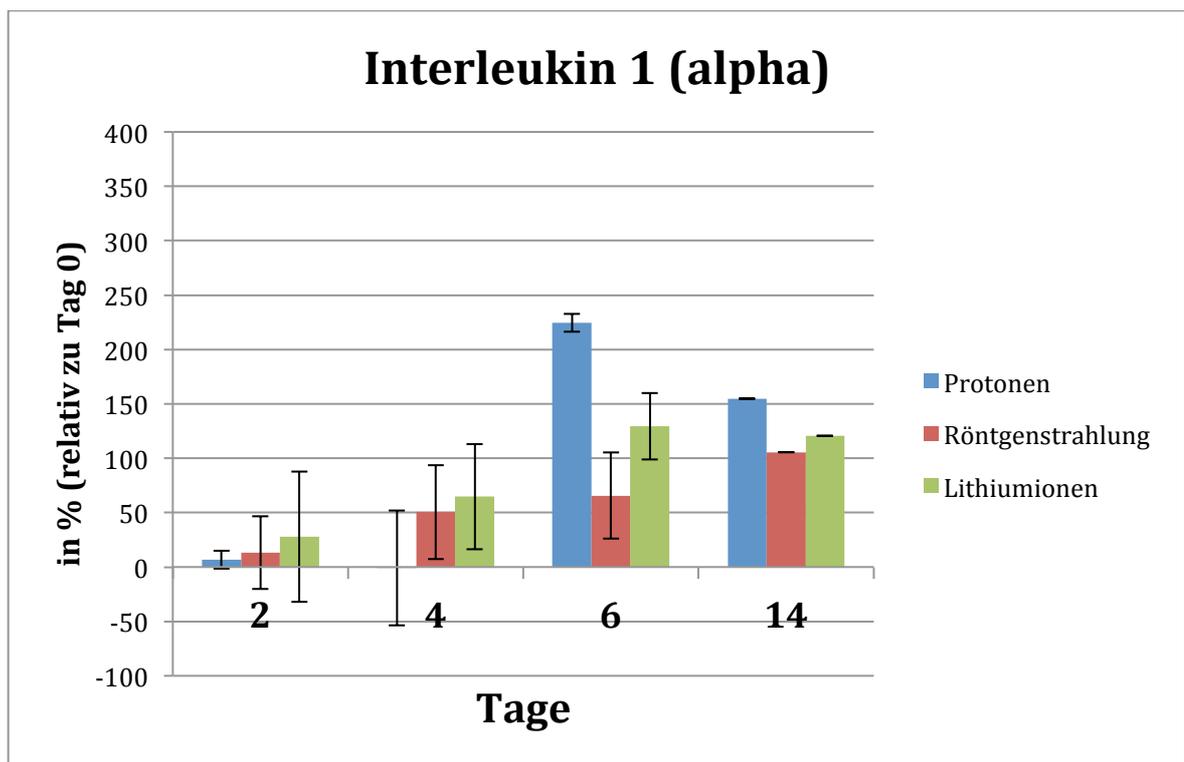


Abb. 33: Relative Unterschiede von Interleukin-1 (IL-1) nach Bestrahlung mit äquivalenten Dosen

Wie in Abbildung 33 dargestellt, gibt es bei allen Strahlenarten einen Anstieg der Interleukin-1-Menge im Vergleich zu Tag 0 (vor der Bestrahlung). Der Anstieg erfolgt am schnellsten bei Lithiumionen gefolgt von Röntgenstrahlen an den Tagen 2 und 4. Zu den späteren Zeitpunkten (Tage 6 und 14) erfolgt die größte IL-1-Sezernierung nach Protonenbestrahlung.

5.2.2 Reliabilität der ELISA-Daten

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus zwei identisch durchgeführten ELISA-Versuchen wird am Beispiel der Abbildung 34 demonstriert: In beiden Versuchen liegt die Kontrolle oberhalb der bestrahlten Proben. Die Bestrahlung mit 2 Gy führt jeweils zu einem höheren maximalen Wert als 4 Gy und der Vergleich an Tag 14 zeigt in beiden Diagrammen die gleiche relative Anordnung der Messergebnisse zueinander. Die bestehenden Unterschiede sprechen für die Betrachtung des gesamten Verlaufs (über 14 Tage) eines Versuches bei Bewertung der Ergebnisse.

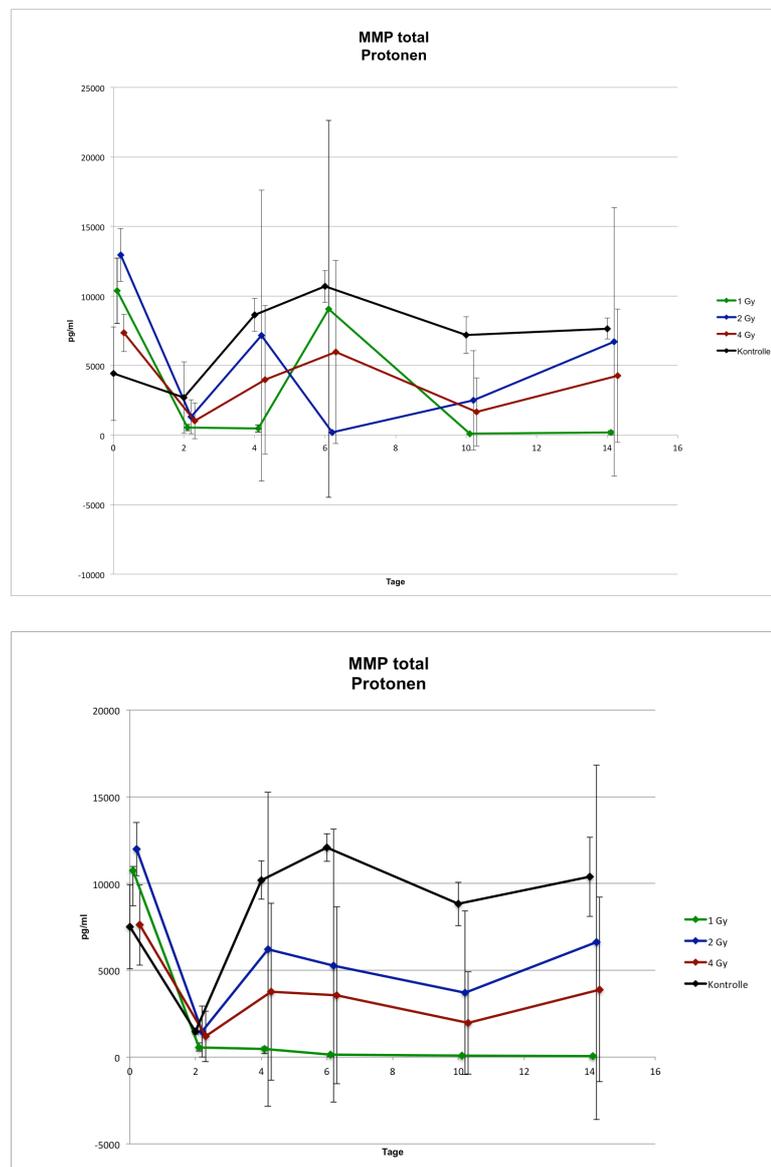


Abb. 34: Konzentrationen der Matrix-Metallo-Proteinase-1 (MMP-1) nach Protonenbestrahlung mit 1, 2 und 4 Gy im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe vom 05.03. und 23.03.2012

6 Diskussion

Die gegenwärtig in der Strahlentherapie verfügbaren Verfahren erlauben eine hohe räumliche Präzision der Strahlenapplikation. Der limitierende Faktor jeder kurativ geplanten Strahlentherapie besteht aber in der Mitbestrahlung gesunden Gewebes (Normalgewebes), sodass eine optimale Therapie hohe Effektivität mit bestmöglicher Verträglichkeit verbindet. In der vorliegenden Arbeit wurden biologische Reaktionen gesunder Hautproben auf die Einwirkung von Bestrahlungen mit unterschiedlichem LET untersucht.

6.1 Hautmodell Epiderm-201TM

Zur genaueren Untersuchung der im Zuge einer Strahlentherapie auftretenden Nebenwirkungen stellt die menschliche Haut mit ihrer hohen Strahlensensibilität ein sehr geeignetes Testsystem dar. Das gewählte Hautmodell Epiderm-201TM bietet den Vorzug der dreidimensionalen Struktur (dies ist besonders für die interzelluläre Kommunikation relevant) bei gleichzeitig sehr geringer Dicke. Letzteres ist eine Voraussetzung für die technische Durchführbarkeit verschiedener Bestrahlungsmodalitäten mit Ionen. Einschränkend auf die Vergleichbarkeit mit der Situation *in vivo* wirkt sich die fehlende Gefäßversorgung aus, wodurch vor allem Mechanismen der erworbenen Immunität auf humoraler Ebene entfallen. Zwar ist die Epidermis auch *in vivo* nicht durchblutet, profitiert jedoch von der Diffusion aus der gefäßreichen Dermis. Darüber hinaus könnten dem Kultivierungs-Medium üblicherweise zugesetzte Hormone und Wachstumsfaktoren Einfluss auf Zell-Zyklus-Regulation, Stressantwort und Apoptose nehmen. Ebenso scheint das *in vivo* innerhalb der Epidermis vorhandene Temperaturgefälle über temperatursensitive Signalwege bei der epidermalen Morphogenese eine Rolle zu spielen [Gibbs, 1998]. Die vom Hersteller beworbene Homogenität der Hautmodelle einer Charge konnte in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung besteht in der niedrigen Zellzahl der Epidermis-Äquivalente,

wodurch die Schwankungsbreite der gemessenen Ergebnisse im Verhältnis zu den vor Bestrahlung erhobenen Werten in vielen Fällen als relativ groß erscheint. Diese Annahme wird durch Beobachtungen an einem anderen Hautmodell gestützt (Arbeitsgruppe Prof. Multhoff). Dieses Hautmodell hatte eine zusätzliche Dermis und die Zellzahl war darum um ein Vielfaches höher, wodurch die gemessene Schwankungsbreite bezogen auf die Ausgangswerte niedriger war. Diese Einschränkung sowie die durch organisatorische Rahmenbedingungen erforderliche Beschränkung auf je drei gleich behandelte Hautmodelle begründen den Verzicht auf eine weiterführende statistische Auswertung.

6.2 Bestrahlungsmodalitäten

Nachdem es an der Microbeam Facility SNAKE in Garching wegen der zu geringen Energie experimentell nicht möglich war mit Kohlenstoffionen die Haut vollständig zu durchzudringen, fiel die Wahl neben Low-LET-Protonen auf die Lithium-Ionen als Vertreter der High-LET-Strahlung. Die Applikation von Röntgenstrahlung erlaubte die Generierung von Referenzwerten. Den Ergebnissen einer Bestrahlung mit 2 Gy kommt besondere Bedeutung zu, da diese Dosis in der klinischen Anwendung für eine Einzelfraktion üblich ist.

6.3 Genexpressions-Analysen

Eine Reihe von Genen wurde in Hinblick auf mögliche strahlenbedingte Veränderung ihrer Expression untersucht.

ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) codiert für eine Proteinkinase und zählt zur Familie der „PI3-like protein-kinases“ [Abraham, 2004]. In Gegenwart von Doppelstrangbrüchen wird die ATM-Kinase durch Autophosphorylation und Dimer-Dissoziation aktiviert [Bakkenist, 2003] und kann so im Sinne einer Sensorfunktion auch Hinweise auf das Ausmaß der DNA-Schäden liefern, die durch die Applikation ionisierender Strahlung entstanden sind. ATM steht am Beginn einer Vielzahl von

Signalkaskaden: ATM-abhängige Signalwege greifen in die Steuerung aller Zell-Zyklus-Checkpoints ein, initiieren DNA-Reparatur-Mechanismen, sind in der Lage Apoptose auszulösen und beeinflussen durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren Genexpression und Wachstumsprozesse. Das Protein p53, dessen Gen ebenfalls auf Veränderungen der Expression untersucht wurde, ist prominentes Beispiel für die zahlreichen Interaktionspartner der ATM-Kinase [Shiloh, 2006]. Aufgrund seiner zentralen Rolle sind die mit einer Mutation des ATM-Gens in homozygoter Form verbundenen gesundheitlichen Folgen erheblich. Die zwei Symptome Ataxie und Teleangiektasie führten zu der entsprechenden Krankheitsbezeichnung „Ataxia teleangiectasia“. Hinweise auf eine mögliche Involvierung weiterer Parameter in das ATM-Netzwerk – darunter die Proteinphosphatase PP2A, die die ATM-Aktivierung durch Dephosphorylierung zu verhindern scheint und ihrerseits im Kontext mit DNA-Schädigung gesehen wird [Shiloh, 2006] – könnten eine Erklärung für gleichbleibende oder verminderte Expression des ATM-Gens nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlung darstellen. Eventuell treten derartige Einflüsse bei der Bestrahlung mit Lithium-Ionen aufgrund charakteristischer physikalischer Eigenschaften dieser High-LET-Teilchen in den Hintergrund, sodass hier eine Zunahme der ATM-Expression nach 4 Gy zu beobachten ist. Der Vergleich der Expressionsunterschiede nach Lithium- und Protonenbestrahlung deckt sich in der vorliegenden Arbeit mit der Vorstellung, nach welcher High-LET-Strahlung zu komplexeren DSB führt als Low-LET-Strahlung.

Als Tumorsuppressorgen an zentraler Stelle innerhalb des vielschichtigen Netzwerkes der Signalwege zur Regulierung von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose verhindert **TP53** das unkontrollierte Wachstum genomisch geschädigter Zellen und erfüllt auf diese Weise eine Kontrollfunktion bei der Wahrung genomischer Stabilität [Vousden, 2002]. Bei mehr als 50% aller Krebserkrankungen können Mutationen dieses Genes nachgewiesen werden [Levine, 1997]. Die Konzentration und Aktivität des zugehörigen Proteins p53 variiert unter dem Einfluss verschiedener zellulärer Stressfaktoren. Neben DNA-Doppelstrangbrüchen

führen u. a. auch die Verminderung von Ribonukleosid-Triphosphaten, Störungen der mitotischen Spindel, Hypoxie, Glucosemangel und die Aktivierung von Onkogenen zur posttranslationalen Aktivierung des Proteins [Levine, 2006]. Eine ebenfalls in Folge dieser Stressfaktoren deutlich verlängerte Halbwertszeit führt zur schnellen Akkumulation [Levine, 1997]. Das in vielen Fällen durch Phosphorylation aktivierte Protein p53 reguliert als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl weiterer Gene, ist aber auch in der Lage transkriptionsunabhängig Apoptose zu induzieren und Autophagie zu hemmen [Green, 2009]. Zu den zahlreichen Downstream-Effekten von p53 (siehe Abb. 35) zählt u. a. die Aktivierung von GADD45A (qRT-PCR durchgeführt). Stresssignale führen auch zu einer Hemmung von MDM2, einer Ubiquitinligase, die ungehemmt den Abbau des p53-Proteins einleitet. So stehen TP53 und MDM2 über eine negative Rückkopplungsschleife miteinander in Verbindung. Da p53 in Reaktion auf die Schädigung der DNA einen Zell-Zyklus-Stopp induzieren kann, hat die Zelle die Möglichkeit den Schaden entweder zu reparieren oder Apoptose bzw. Seneszenz einzuleiten. Dadurch würde die Weitergabe genetischer Defekte verhindert. Dies könnte einen wirksamen Mechanismus gegen die Entstehung von Krebs darstellen. Bisherige Publikationen zu diesem Thema sind aber uneinheitlich [Levine, 2006]. Im Mausmodell konnten darüber hinaus Hinweise auf eine aktivierende Funktion des p53-Proteins auf die Zellalterung gefunden werden. So zeigten heterozygote $Trp53^{+/-}$ (ein Allel mutiert) Mäuse Resistenz gegen Tumoren bis ins Alter von 18 Monaten bei gleichzeitiger Verkürzung der Lebenszeit um bis zu 30% [Tyner, 2002]. Anhaltspunkte für eine ähnliche Funktion des p53-Proteins auf die Zellalterung beim Menschen konnten in populationsgenetischen Studien gefunden werden [Bonafé, 2004]. Die Untersuchung der TP53-Gen-Expression zeigt für keine der drei Dosisapplikationen der Bestrahlung mit Lithium-Ionen eine Regulierung. Bisherige Veröffentlichungen stützen diese Beobachtung. Allerdings ist zu beachten, dass die Mehrzahl dieser Daten auf den Untersuchungen an *in-vitro*-Keratinocytenmodellen basiert, die nur aus einer Zellschicht bestehen. Enk et al. konnten durch den Vergleich von Genexpressionsprofilen einer solchen *in-vitro*-Anordnung mit Profilen, die sie aus

einem *in-vivo*-Modell generierten, zeigen, dass die Genregulierung modell-abhängig erhebliche Unterschiede aufweisen kann. So beobachteten die Untersucher nach UVB-Bestrahlung *in-vitro* insgesamt pro-apoptotische TP53-Downstream-Effekte, während *in-vivo* die Zellzyklusprogression fördernde Effekte im Vordergrund standen [Enk, 2006]. Vor diesem Hintergrund scheint die Durchführung weiterer Experimente unter Anwendung der bisher verwendeten Bestrahlungsmodalitäten an verschiedenen Epidermis-Modellen einen sinnvollen Weg darzustellen, um den Einfluss physikalischer Unterschiede zwischen den Strahlenarten auf die zu erwartenden Therapieergebnisse differenzierter abschätzen zu können.

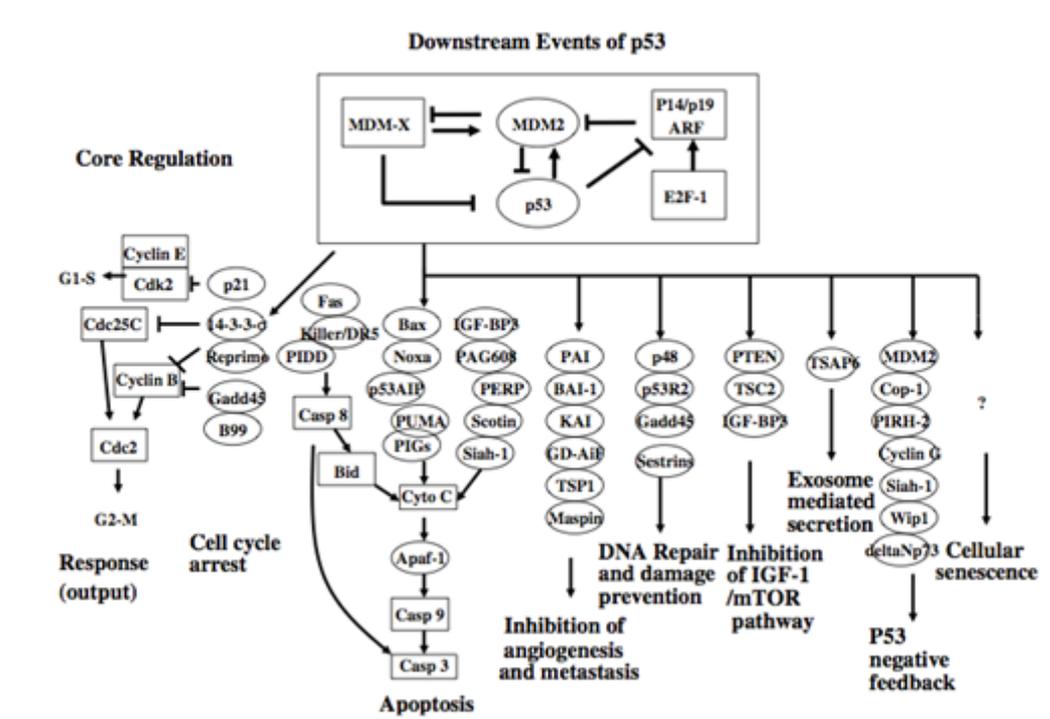


Abb. 35: Hauptfunktionen von p53, von p53 regulierte Downstream-Gene und p53-Signalwege. Das Protein p53 aktiviert die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen und induziert auf diese Weise Zell-Zyklus-Arrest, Seneszenz oder Apoptose. Darüber hinaus führen weitere p53-regulierte Genfunktionen zu interzellulärer Kommunikation, DNA-Reparatur oder positiven und negativen Feedback-Mechanismen, die ihrerseits den Aktivitätsgrad des p53-Proteins regulieren und die Verbindung zu anderen Signalwegen herstellen (nach: Levine, 2006)

GADD45A (Growth arrest and DNA-damage inducible) codiert für das Protein GADD45- α . Zur Familie der GADD45-Proteine gehören neben GADD45- α GADD45- β und GADD45- γ . Alle drei Proteine werden durch genotoxische Stressoren, terminale Differenzierung und Apoptose-vermittelnde Cytokine induziert, aktivieren jedoch unterschiedliche Signalwege. Ausschließlich GADD45- α kann durch p53 aktiviert werden. Ebenso möglich ist eine p53-unabhängige Aktivierung. GADD45- α ist involviert in Zell-Zyklus-Arrest, DNA-Reparatur, Seneszenz und Apoptose. Aktuell besteht noch Unklarheit darüber, welche Faktoren als richtungsweisend bezüglich der „Reparatur-“ bzw. „Apoptose-Funktion“ angesehen werden können [Liebermann, 2008]. Barreto et al. fanden in ihren Untersuchungen Hinweise, dass GADD45- α durch DNA-Demethylation Gene aktiviert. Bei einer Inaktivierung von Gadd45A wurden die Tumorzellen durch ionisierende Strahlung sensibilisiert. Ein anderer Bericht beschreibt einen klaren Zusammenhang zwischen dem Gadd45- α -Expressionsniveau und der Strahlentherapie-Prognose bei Patienten mit Gebärmutterhalskrebs. Patienten mit relativ niedriger Gadd45- α -Expression zeigten eine deutlich bessere Prognose als Patienten nach Strahlentherapie, die ein hohes Expressionsniveau von Gadd45- α hatten (Lu et al., 2008).

Vor diesem Hintergrund könnten die mRNA-Ergebnisse, die nach 4 Gy Lithium-Bestrahlung eine starke Herunterregulierung des GADD45- α zeigten, ein positives Argument für die Anwendung von High-LET-Strahlung liefern, da ein niedriges GADD45- α -Expressionsniveau die Strahlensensibilität steigern könnte.

TGF- β -1 ist eine von drei Isoformen eines Proteins aus der Familie der *Transforming growth factors beta*. Nahezu jede Körperzelle sezerniert dieses Cytokin und verfügt über entsprechende Rezeptoren. Über den *SMAD Pathway* induziert TGF- β die Transkription einer Vielzahl von Genen und reguliert auf diese Weise Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Wundheilung und Angiogenese [Ten, 2004]. In gesunden Zellen hemmt TGF- β u. a. durch Inhibition zyklin-abhängiger Proteinkinasen sowie durch Stimulierung von Proteinkinase-Inhibitoren

die Zellproliferation. Damit verbunden ist der Zell-Zyklus-Arrest in der G1-Phase. Auch das Protein C-Myc, welches die Expression anderer Gene verstärkt, unterliegt unter physiologischen Bedingungen dem hemmenden Einfluss von TGF- β . In Tumorzellen lassen sich verschiedenste Mutationen des TGF β -Signalweges nachweisen, die die proliferationshemmende Wirkung außer Kraft setzen bzw. zur Resistenz gegenüber TGF- β führen. In diesem Stadium lässt sich häufig eine gesteigerte TGF- β -Synthese durch die entarteten Zellen beobachten. Die TGF- β -vermittelte Stimulation der Angiogenese und der Zellmobilität sowie die ebenfalls durch TGF- β getriggerte Suppression des Immunsystems fördert nun die Tumorprogression (Abb. 36). Über die fehlerfreie Funktion aller an dem jeweiligen Signalweg beteiligten Komponenten hinaus, ist auch die Menge des synthetisierten Proteins von entscheidender Bedeutung. So kann eine Überproduktion z. B. ausgeprägte Narbenbildung und Fibrose bedingen [Blobe, 2000]. Zahlreiche Publikationen zum Wirkungsmechanismus von TGF- β kommen zu uneinheitlichen Schlussfolgerungen. Dies betrifft u. a. die Frage, ob TGF- β -1 Apoptose induziert oder inhibiert. Aktuell berichteten An et al. hierzu von Apoptose-reduzierenden Effekten in γ -bestrahlten Zellen nach der Einführung funktionierender TGF- β -Rezeptoren in die untersuchten Zelllinien [An, 2012]. Bezüglich eventueller Nebenwirkungen einer Strahlentherapie, wie z. B. der Entstehung von Fibrosen, wäre ein Bestrahlungsmodus mit möglichst geringer Anhebung der TGF- β -Expression zu bevorzugen. Auch verringert die Reduktion von Apoptose die Notwendigkeit der Synthese von Ersatz- bzw. Narbengewebe. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte mRNA-Expressionsanalyse für TGF- β -1 zeigt für die Applikation von Röntgenstrahlung keine Veränderungen, wohingegen nach Protonenbestrahlung mit 1 und 2 Gy ein Anstieg der Expressionsrate beobachtet werden konnte. Lithiumionen dagegen zeigen bei 1 Gy eine Herunterregulation und bei 2 und 4 Gy keine Regulation. Dies könnte geringere Nebenwirkungen bei Applikation von High-LET-Strahlung in der Strahlentherapie zu Folge haben.

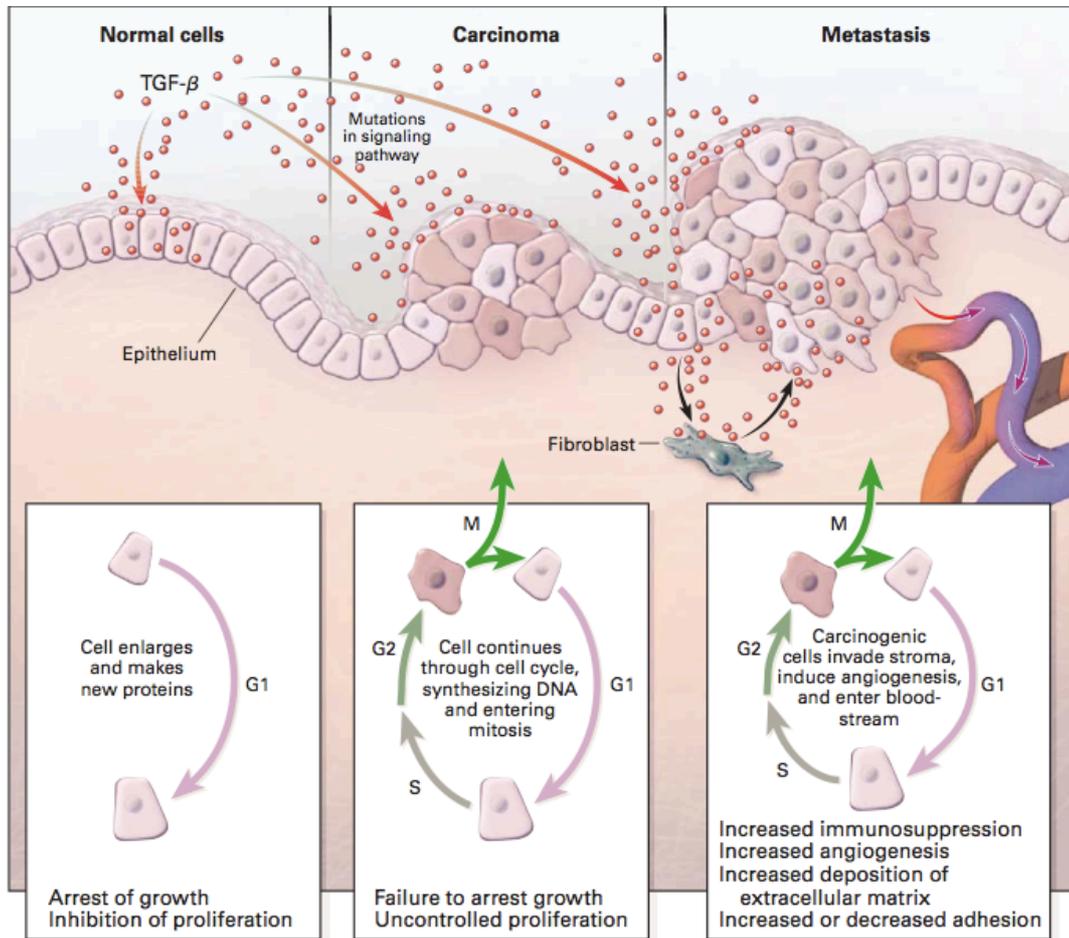


Abb. 36: Die Rolle des Transforming-Growth-Faktor- β in gesunden sowie entarteten Zellen
 "Reproduced with permission from (scientific reference citation),
 Copyright Massachusetts Medical Society" (aus Blobe, 2000)

Das Proto-Onkogen **MYC** codiert u. a. für die Proteine c-Myc, N-Myc und L-Myc aus der Gruppe der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren. Da die Myc-Proteinmenge in einer Vielzahl von Tumorgewebe im Vergleich zu dem umgebenden gesunden Gewebe deutlich erhöht ist, ist das MYC-Gen seit seiner Entdeckung Gegenstand intensiver Forschung. Die Schätzung der Anzahl der *in-vivo*-Bindungsstellen beläuft sich mittlerweile auf ca. 25.000. Dabei nimmt das Protein Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose und Seneszenz [Adhikary, 2005].

Neuere Erkenntnisse weisen auf eine zusätzliche Rolle im Rahmen der Replikation hin [Dominguez-Sola, 2007]. Myc kann sowohl Transkriptions-fördernd als auch Transkriptions-hemmend wirken. Dabei ist für die aktivierende Funktion die Komplexbildung mit dem Partnerprotein Max erforderlich. Erst das entsprechende Heterodimer ermöglicht die Bindung an DNA-Enhancer-Boxes [Adhikary, 2005; Mao, 2003]. Erfolgt die Bindung an die DNA nicht direkt, wie im Komplex mit Max, sondern über weitere Proteine, wie etwa Miz1, wird die Transkription dagegen gehemmt. Myc selbst unterliegt mehrfachen Kontroll- und Regulationsmechanismen, sodass eine alleinige Fehlregulierung des Proteins nicht in der Lage ist unkontrollierte Proliferation auszulösen. In vielen Tumoren wird eine Kombination hoher Myc-mRNA-Konzentrationen und defekter Kontrollmechanismen beobachtet. Eines der mit Zellproliferation direkt in Verbindung stehenden downstream-targets von Myc ist p21^{CIP1}, ein Inhibitor zyklin-abhängiger Kinasen. In gesunden Zellen induziert p53 in Folge einer DNA-Schädigung die Hochregulierung von p21^{CIP1}. Die übermäßige Suppression von p21^{CIP1} durch Myc in Zellen mit unkontrollierter Myc-Expression verhindert den unter physiologischen Umständen eintretenden G1-Arrest nach Schädigung des Erbguts [Adhikary, 2005]. In diesem Kontext erscheint eine Interpretation des MYC-Expressionsergebnisses ohne die Einbeziehung entsprechender Untersuchungsergebnisse zu regulierenden Faktoren schwierig. Ein einheitlicher Zusammenhang der PCR-Daten von TGF- β und MYC kann nicht beobachtet werden.

COX-2 codiert für die Cyclooxygenase-2, welche u. a. Arachidonsäure zu Prostaglandin-H2 oxidiert. Im Gegensatz zu COX-1, wird COX-2 nicht konstitutiv exprimiert. Die Induktion der Cyclooxygenase-2 erfolgt durch eine Vielzahl inflammatorischer sowie mitogener Stimuli, darunter auch NF- κ B. Während der NF- κ B-Signalweg im Normalfall gesunde Immunzellen vor Apoptose in entzündetem Gewebe schützt, kann eine Überaktivierung und die damit verbundene Hochregulierung der COX-2-Expression die Progression eines Tumors fördern. COX-2 ist in vielen Tumoren überexprimiert und korreliert mit einer schlechten

Prognose sowie schlechtem Ansprechen auf gängige Tumorbehandlungen einschließlich der Strahlentherapie. Ionisierende Strahlung führt zu einem Anstieg von NF- κ B und in Folge zu einer erhöhten Expression von COX-2. Das von COX-2 synthetisierte PGE2 kann zur Radioprotektion von Zellen beitragen (Ashida *et al.*, 2003). Ein die Strahlen- oder auch Chemotherapie-begleitender Einsatz selektiver COX-2-Inhibitoren steigert die Sensitivität des Gewebes gegenüber Strahlung und Chemotherapeutika [Simmons, 2004; Ghosh, 2010; Multhoff, 2012].

In der vorliegenden Arbeit zeigten Röntgenstrahlung und Protonen eine Hochregulierung der COX-2-Expression, was mit den bisher in der Literatur publizierten Studien in Einklang steht. Interessanterweise führten Lithiumionen aber erst bei höherer Dosis (2 und 4 Gy) zu einer Regulation von COX-2, während Röntgenstrahlen und Protonen schon bei 1 Gy eine Hochregulierung zeigten. Darin könnte ein weiterer Vorteil der Hoch-LET-Strahlung bestehen, da dies zu einer höheren Strahlensensitivität der Tumorzellen während der Strahlentherapie mit Schwerionen führen würde.

6.4 14-Tage ELISAS

Mit der Durchführung von ELISAs der Matrixmetalloprotease-1 (MMP-1), des Akute-Phase Proteins IL-1 sowie des IL-1 induzierbaren Zytokins IL-8 wurden strahlenbedingte Veränderungen auf Proteinebene untersucht.

Zur Familie der **Matrix-Metalloproteasen (MMPs)** zählen aktuell über 20 Mitglieder. Unterschieden werden zwei Formen: eine, die in den Extrazellularraum sezerniert wird und eine membrangebundene Form, die durch das zusätzliche Kürzel „MT-“ für *membrane-type* gekennzeichnet wird [Raza, 2000]. Zu den Substraten der MMPs gehören viele Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM). Über die Degradation der ECM hinaus, wird zunehmend deutlich, dass auch die Spaltung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Zell-Adhäsions-Molekülen Teil des Wirkungsspektrums dieser Enzyme ist [Seiki, 2002]. Die Regulation der Aktivität

der MMPs erfolgt in dreifacher Weise, zunächst auf transkriptioneller Ebene, dann durch Aktivierung der erst als Proenzym vorliegenden Form (pro-MMP) und schließlich durch die Interaktion mit Inhibitoren der Metalloproteasen, den sog. „TIMPs“ (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). MMP-1 wird innerhalb der Familie der MMPs der Gruppe der Kollagenasen zugeordnet, innerhalb dieser ist MMP-1 wiederum Vertreter der interstitiellen Form [Hartung, 2000]. Nach einer Hautverletzung ist der Abbau von Kollagen I durch MMP-1 Voraussetzung für die Wanderung der Keratinozyten. MMP-1 bindet dazu an das in der Zellmembran der Keratinozyten lokalisierte $\alpha 2\beta 1$ -Integrin. Die Bindung an die Kollagenase erfolgt ebenfalls über das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin [Seiki, 2002]. Dieser im Rahmen der Wundheilung nützliche Prozess erscheint im Kontext mit malignen Vorgängen von Nachteil. Blackburn et al. konnten die Bedeutung des Kollagenabbaus durch die Matrix-Metalloproteinase-1 für die Progression des malignen Melanoms zeigen [Blackburn, 2009]. Durch Entzündung begleitete oder charakterisierte Krankheitsbilder gehen darüber hinaus mit erhöhten bzw. von physiologischen Situationen abweichenden MMP-Leveln einher [Parks, 2004]. Letzteres konnte kürzlich ebenso für die strahlenbedingte Entzündungsreaktion anhand der Sekretion des MMP-1-Vorläufers pro-MMP-1 durch ein *in-vitro* Vollhaut-Modell bestätigt werden [Zlobinskaya, 2012]. Die MMP-1-ELISA-Daten des Modells Epiderm-201TM zeigten bezüglich der drei Strahlenqualitäten deutliche Unterschiede. Während, bezogen auf die Applikation aller drei Dosen die Protonenbestrahlung keinerlei strahlenbedingte Erhöhung der MMP-1-Menge bedingte, sind die nach Röntgenstrahlung beobachteten Anstiege deutliche Indizien für entzündliche Vorgänge. Die Behandlung mit Lithiumionen der Dosen 1 und 2 Gy zeigte keine Veränderung in der MMP-1-Ausschüttung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Der für 4 Gy dokumentierte Anstieg um ein Vielfaches spricht für das höhere Schädigungspotenzial dieser Dosis der High-LET-Strahlung.

Interleukin-1 (IL-1) stellt ein pro-inflammatorisches Zytokin dar, welches in der Epidermis im Verhältnis zu anderen Geweben verstärkt exprimiert wird und eine

entscheidende Rolle innerhalb einer Vielzahl von entzündlichen sowie autoimmunologischen Erkrankungen spielt. Während IL-1 β häufig in einer inaktiven Vorstufe vorliegt, ist das zumeist intrazellulär lokalisierte Vorläuferprotein von **IL-1 α** bereits biologisch aktiv. In dieser Form wird IL-1 α auch unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich in geringer Menge synthetisiert, ist an Differenzierungsprozessen beteiligt und trägt durch die Stimulation der Expression von *antimicrobial peptides (AMPs)* zur immunologischen Barrierefunktion der Haut bei. Die Protease Calpain spaltet das Vorläuferprotein. Neben seiner intrazellulären Funktion interagiert IL-1 α mit membranständigen Rezeptoren. Wird die Membran der Zelle zerstört, werden große Mengen des Zytokins freigesetzt [Dinarello, 1997]. IL-1 α aktiviert indirekt TNF α und induziert direkt die IL-8-Synthese. Als Entzündungsmarker regt IL-1 α regelmäßig zur Entwicklung und Erprobung entsprechender Inhibitoren an [Braddock, 2004; Bando, 2007; Elkon 2007]. Da die Proteinkonzentrationsmessungen in der vorliegenden Arbeit an den Medium-Überständen vorgenommen wurden, können die Ergebnisse Anhaltspunkte für den Umfang der Entzündungsreaktion liefern. Wie in Abbildung 33 dargestellt, konnte bei allen drei Strahlenarten im Vergleich zu den Ausgangswerten ein Anstieg des IL-1 im Medium beobachtet werden. Obwohl der Anstieg am schnellsten bei den Lithiumionen erfolgte, sind bei Vergleich der drei Strahlenqualitäten die Werte der im Medium detektierbaren IL-1 α -Menge insgesamt bei Lithium niedriger als bei Protonen und Röntgenstrahlen. Dieser Befund ist für die Bewertung der High-LET-Strahlung in der Strahlentherapie als positiv anzusehen, da von einer reduzierten Entzündungsreaktion ausgegangen werden kann.

IL-8 (auch CXCL8) gehört zu den CXC-Chemokinen. Die Einteilung der Chemokine erfolgt entsprechend ihres strukturellen Aufbaus und basiert auf der unterschiedlichen Anordnung und Anzahl von Aminosäuren und Cystein-Resten. Insgesamt werden vier Gruppen unterschieden – CXC, CC, C und CX₃C. IL-8, auch bekannt als *neutrophil chemotactic factor*, ist beteiligt an Entzündung, Infektion,

sowie verschiedensten Krankheitsbildern [Apostolakis, 2009]. Mit vergleichbar hoher Affinität bindet IL-8 an die beiden Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 [Singh, 2010], woraufhin u.a. die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, die Phospholipase C, Akt, PKC und die MAPK-Signalkaskade aktiviert werden. NF- κ B und IL-1 regulieren die IL-8-Expression [Steude, 2002; Waugh, 2008]. Eine Überexpression in Gegenwart von Tumorzellen wirkt pro-angiogenetisch, fördert die Progression und erleichtert durch Verstärkung der Invasivität die Metastasenbildung. In Melanomzellen ist auch UVB-Strahlung in der Lage IL-8 Expression zu induzieren [Singh, 1995]. Wie für IL-1 wird auch für IL-8 an der Entwicklung passender Inhibitoren gearbeitet [Waugh, 2008]. In der vorliegenden Arbeit konnten, wie aufgrund des Zusammenhanges der Expression von IL-1 und IL-8 zu erwarten, ähnliche ELISA-Ergebnisse erzielt werden. Auch wenn das Probenmaterial nicht in ausreichender Menge akquiriert werden konnte um auch den Einfluss der Bestrahlung mit Lithium-Ionen auf IL-8 zu untersuchen, bestätigen die für Röntgen- und Protonenstrahlung vorliegenden Daten die mittels der IL-1-ELISAs erhobenen Werte.

7 Zusammenfassung

Es wurden insgesamt 71 *in-vitro* Hautmodelle Epiderm-201TM in die Untersuchungen eingeschlossen, davon wurden 54 Proben zu je gleichen Teilen mit Protonen (Low-LET), Lithiumionen (High-LET) und Röntgenstrahlen (Referenzstrahlung) bestrahlt, 17 Exemplare dienten als Kontrolle und wurden bei sonst gleichen Bedingungen keiner Bestrahlung ausgesetzt. Jede Strahlenart wurde in den Dosen 1, 2 und 4 Gy appliziert – von jeder Dosis wurden 3 Replikate generiert. 36 Proben wurden 24h nach Bestrahlung (bzw. Kontrollen ohne Bestrahlung jedoch zum gleichen Zeitpunkt) fixiert. Nach Isolierung der RNA wurden mittels quantitativer Real-Time PCR strahlenbedingte Veränderungen der Expression der Gene MYC, TGF- β , ATM, GADD45A, TP53 und COX-2 detektiert. 35 Proben (davon 8 Kontrollen) wurden nach Bestrahlung weitere 14 Tage kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und dabei zu den Zeitpunkten 0h (direkt vor

Bestrahlung), 2, 4, 6, 10 und 14 Tage (nach Bestrahlung) bei -20°C eingefroren und später einer ELISA-Auswertung (MMP-1, IL-1 und IL-8) zugeführt. Eine tabellarische Übersicht zur Aufteilung der Proben und Kontrollen ist auf Seite 41 wiedergegeben.

Vor dem Hintergrund der diskutierten Zusammenhänge erscheinen vor allem die ELISA-Ergebnisse nach Lithiumbestrahlung (High-LET) vielversprechend. Die High-LET-Strahlung zeigt hier sowohl für IL-1 α als auch für MMP-1 niedrigere Werte als nach Applikation der Röntgenstrahlen, sodass von einer geringeren Entzündung sowie von nur geringen Umbauprozessen in der extrazellulären Matrix auszugehen ist. Für IL-1 α konnte dieser Vorteil ebenso im Vergleich mit den Resultaten nach Protonenstrahlung gezeigt werden. Im Falle von MMP-1 konnte sowohl nach der Bestrahlung mit Protonen als auch mit Lithiumionen kein strahlenbedingter Effekt dokumentiert werden.

Die Veränderungen in der Genexpression vermitteln ein Bild, das in seiner Vielgestaltigkeit im Einklang mit der Komplexität des Netzwerkes beteiligter Interaktionspartner steht. Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigten sich bei den Genen ATM, TP53, MYC und GADD45- α keine signifikanten Unterschiede, wenn äquivalente Dosen eingesetzt wurden. Werden beim Gen GADD45- α , welches unter anderem in Zell-Zyklus-Arrest nach Bestrahlung involviert ist, bei High-LET-Strahlung höhere Dosen eingesetzt, zeigt sich eine starke Herunterregulierung nach der Bestrahlung mit 4 Gy Lithium im Vergleich zur Low-LET-Strahlung (Abb. 20). Dies ist ein wichtiges Argument für die Anwendung von High-LET-Strahlung. Denn durch Einwirkung von High-LET-Strahlen werden mehr komplexe Doppelstrangbrüche gebildet als bei Low-LET-Strahlen. Diese komplexen DNA-Schäden überfordern das Reparatursystem und die Zelle stirbt ab. Eine Herunterregulierung des GADD45- α ist also positiv, da es dann nicht zu einer Zellzyklusverlängerung und damit zu einer höheren Chance die komplexen Schäden zu reparieren kommt. Für TGF-beta-1 zeigte Protonenstrahlung mit 2 Gy einen Anstieg der Expressionsrate, Lithiumionen-Strahlung dagegen bei der äquivalenten

Dosis von 1 Gy eine Herunterregulation. Dies könnte ein Indiz für reduzierte Akutnebenwirkungen von High-LET-Strahlung in der Strahlentherapie sein. Bei COX-2 führen Röntgenstrahlen und Protonen zu einer Hochregulierung der Expression, dagegen hatten Lithiumionen bei isoeffektiven Dosen (1Gy) keinen Einfluss. Dies könnte theoretisch auch eine höhere Strahlensensitivität während der Strahlentherapie mit Schwerionen zur Folge haben und damit ein weiteres Argument für den Einsatz von Hoch-LET-Bestrahlung darstellen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Einsatz von High-LET-Strahlung in der Strahlentherapie von Tumoren nicht zu verstärkten Nebenwirkungen im Hautgewebe führt und möglicherweise sogar Vorteile hinsichtlich der Strahlenwirkung hat. Weiterführende Untersuchungen von anderen Strahlenqualitäten mit hohem linearem Energietransfer (z.B. Kohlenstoffionen) sollten folgen um diese Ergebnisse zu bestätigen.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, R.T.** PI3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 883-887
- Adamietz, I.A.** Strahlendermatitis. *Der Onkologe* 17 (2011) 61-74
- Adhikary, S., Eilers, M.** Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 635-645
- An, Y.S., Kim, M.R., Lee, S.S., Lee, Y.S., Chung, E., Song, J.Y., Lee, J., Yi, J.Y.** TGF- β signaling plays an important role in resisting γ -irradiation. *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 466-473
- Ando, K., Kas, Y.** Biological characteristics of carbon-ion therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 85 (2009) 715-728
- Apostolakis, S., Vogiatzi, K., Amanatidou, V., Spandidos, D.A.** Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 84 (2009) 353-360
- Ashida, M., Bito, T., Budiyo, A., Ichihashi, M., Ueda, M.** Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp. Dermatol.* 4 (2003) 445-452
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B.** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421 (2003) 499-506
- Bando, M., Hiroshima, Y., Kataoka, M., Shinohara, Y., Herzberg, M.C., Ross, K.F., Nagata, T., Kido, J.** Interleukin-1 α regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. *Immunol. Cell Biol.* 85 (2007) 532-537
- Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., Niehrs, C.** Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445 (2007) 671-675
- Blackburn, J.S., Liu, I., Coon, C.I., Brinckerhoff, C.E.** A matrix metalloproteinase-1/protease activated receptor-1 signaling axis promotes melanoma invasion and metastasis. *Oncogene* 28 (2009) 4237-4248
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F.** Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 1350-1358
- Bonafé, M., Salvioli, S., Barbi, C., Trapassi, C., Tocco, F., Storci, G., Invidia, L., Vannini, I., Rossi, M., Marzi, E., Mishto, M., Capri, M., Olivieri, F., Antonicelli, R., Memo, M., Uberti, D., Nacmias, B., Sorbi, S., Monti, D., Franceschi, C.** The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death Differ.* 11 (2004) 962-973

Braddock, M., Quinn, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: New opportunities for therapeutic intervention. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3 (2004) 330-339

Budach, V. Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO): Stellungnahme zur Strahlentherapie mit Protonen in Deutschland vom 30. Juli 2008 (http://www.degro.org/dav/html/download/pdf/Protonen_Stellungnahme_010808.pdf), Stand 13.02.2013

Dinarello, C.A. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8 (1997) 253-265

Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., Dalla-Favera, R. Non-transcriptional control of DANN replication by c-Myc. *Nature* 448 (2007) 445-451

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4008

Durante, M., George, K., Gialanella, G., Grossi, G., La Tessa, C., Manti, L., Miller, J., Pugliese, M., Scampoli, P., Cucinotta, F.A. Cytogenetic effects of high-energy iron ions: Dependence on shielding thickness and material. *Radiat. Res.* 164 (2005) 571-576

Elkon, K.B. IL-1 α responds to necrotic cell death. *Nat Med.* 13 (2007) 778-780

Elsässer, T., Scholz, M. Improvement of the local effect model (LEM) – Implications of clustered DNA damage. *Radiat. Prot. Dosimetry* 122 (2006) 475-477

Enghardt, W., Debus, J., Haberer, T., Hasch, B.G., Hinz, R., Jakel, O., Kramer, M., Lauckner, K., Pawelke, J. The application of PET to quality assurance of heavy-ion tumor therapy. *Strahlenther. Onkol.* 175, Suppl 2 (1999) 33-36

Engvall, E., Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8 (1971) 871-874

Ewing, D. The oxygen fixation hypothesis: a reevaluation. *Am. J. Clin. Oncol.* 21 (1998) 355-361

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

Furusawa, Y., Fukutsu, K., Aoki, M., Itsukaichi, H., Eguchi-Kasai, K., Ohara, H., Yatagai, F., Kanai, T., Ando, K. Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams. *Radiat. Res.* 154 (2000) 485-496

Furusawa, Y., Fukutsu, K., Aoki, M., Itsukaichi, H., Eguchi-Kasai, K., Ohara, H., Yatagai, F., Kanai, T., Ando, K. Corrections: in the article "Inactivation of Aerobic and Hypoxic Cells from Three Different Cell Lines by Accelerated ^3He -, ^{12}C - and ^{20}Ne -Ion Beams" by Furusawa et al. *Radiat. Res.* 177 (2012) 129-131

- Ghosh, N., Chaki, R., Mandal, V., Mandal, S.C.** COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Reports* 62 (2010) 233-244
- Gibbs, S., Boelsma, E., Kempenaar, J., Ponec, M.** Temperature-sensitive regulation of epidermal morphogenesis and the expression of cornified envelope precursors by EGF and TGF- α . *Cell Tissue Res.* 292 (1998) 107-114
- Goldstein, L.S., Phillips, T.L., Ross, G.Y.** Biological effects of accelerated heavy ions. II. Fractionated irradiation of intestinal crypt cells. *Radiat. Res.* 86 (1981) 542-558
- Goodhead, D.T., Munson, R.J., Thacker, J., Cox, R.** Mutation and inactivation of cultured mammalian cells exposed to beams of accelerated heavy ions. IV. Biophysical interpretation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 37 (1980) 135-167
- Goodhead, D.T., Belli, M., Mill, A.J., Bance, D.A., Allen, L.A., Hall, S.C., Ianzani, F., Simone, G., Stevens, D.L., Stretch, A.** Direct comparison between protons and alpha-particles of the same LET: I. Irradiation methods and inactivation of asynchronous V79, HeLa and C3H 10T1/2 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 61 (1992) 611-624
- Goretzki, G.** Strahlenbiologische Begriffe. In „Medizinische Strahlenkunde -Physikalisch-technische Grundlagen“, Goretzki, G., Urban und Fischer, München, 2004, 2. Auflage, 45-46
- Green, d. R., Kroemer, G.** Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. *Nature* 458 (2009) 1127-1130
- Hall, E.J., Giaccia, A.J.** Linear energy transfer. ICRU Report 16 (1970)
- Hall, E.J., Giaccia, A.J.** Oxygen Effect and Reoxygenation. In “Radiobiology for the radiologist“, Hall, E.J., Giaccia, A.J., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006, sixth edition, 85-105
- Hall, E.J., Giaccia, A.J.** Linear Energy Transfer and Relative Biologic Effectiveness. In “Radiobiology for the radiologist“, Hall, E.J., Giaccia, A.J., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006, sixth edition, 106-116
- Hartung, H.P., Kieseier, B.C.** The role of matrix metalloproteinases in auto-immune damage to the central and peripheral nervous system. *J. Neuroimmunol.* 107 (2000) 140-147
- Hirayama, R., Ito, A., Tomita, M., Tsukada, T., Yatagai, F., Noguchi, M., Matsumoto, Y., Kase, Y., Ando, K., Okayasu, R., Furusawa, Y.** Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High-LET Radiations. *Radiat. Res.* 171 (2009) 212-218
- ICRU Report 40 – The Quality Factor in Radiation Protection, ICRU Report 40, Washington 1986

- Khanna, K.K., Jackson, S.P.** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27 (2001) 247-254
- Kraft, G.** Tumor Therapy with heavy Charged Particles. *Prog. Part. Nucl. Phys.* 45 (2000) 473-544
- Levine, A.J.** p53 the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88 (1997) 323-331
- Levine, A.J., Hu, W., Feng, Z.** The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1027-1036
- Liebermann, D.A., Hoffman, B.** Gadd45 in stress signaling. *J. Mol. Signal.* 3 (2008) Heft Nr. 15 - keine Seitenangabe
- Lu, X., Yang, C., Hill, R., Yin, C., Hollander, M.C., Fonace, A.J., Van Dyke, T.,** Inactivation of gadd45a sensitizes epithelial cancer cells to ionizing radiation in vivo resulting in prolonged survival. *Cancer Res.* 10 (2008) 3579-3583
- Mao, D.Y., Watson, J.D, Yan, P.S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W.W., Farnham, P.J., Huang, T.H., Penn, L.Z.** Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr. Biol.* 13 (2003) 882-886
- Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P.** High-LET ion radiolysis of water: oxygen production in tracks. *Radiat. Res.* 171 (2009) 379-386
- Moll, I.** Unsere dynamische Haut – Aufbau und Funktionen. In: „Duale Reihe Dermatologie“, Moll, I., Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, 7. Auflage, 3-14
- Multhoff, G., Radons, J.** Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. *Front. Oncol.* 2 (2012) Artikel 58 - keine Seitenangabe
- Munro, T.R.** The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.* 42 (1970) 451-470
- Nordmark, M., Overgaard, M., Overgaard, J.** Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiather. Oncol.* 41 (1996) 31-39
- Park, S.H., Kang, J.O., Hee, K.** Basics of particle therapy I: Physics. *Radiat. Oncol. J.* 29 (2011) 135-146
- Parks, W.C., Wilson, C.L., Lopez-Boado Y.S.** Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 617-629
- Parodi, K., Paganetti, H., Casico, E., Flanz, J.B., Bonab, A.A., Alpert, N.M., Lohmann, K., Bortfeld, T.** PET/CT imaging for treatment verification after proton therapy: a study with plastic phantoms and metallic implants. *Med. Phys.* 34 (2007) 419-435

- Pfaffl, M.W.** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, (2004) 92-95
- Potthoff, K., Fetzner, L., Häfner, M., Debus, J.** „R1 und R2“ zur Prophylaxe und Therapie der akuten Radiodermatitis (http://www.radiotherapytreatment.com/DE/clinical-evaluation/R1R2_Bericht_Universitätsklinikum_Heidelberg_15022011.pdf), Stand 14.12.2012
- Powell, S., McMillian, T.J.** DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother. Oncol.* 19 (1990) 95-108
- Raza, S.L., Cornelius, L.A.** Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5 (2000) 47-54
- Roche**, LightCycler 480 Sybr Green I Master, Version 2011.
(https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04887352001_en_12.pdf),
Stand 10.02.2013
- Rossi, H.H.** Fundamental quantities and units for ionizing radiation.
ICRU Report 60 (1998)
- Rydberg, B., Cooper, B., Cooper, P.K., Holley, W.R., Chatterjee, A.** Dosedependent misrejoining of radiation-induced DANN double-strand breaks in human fibroblasts: Experimental and theoretical study for high- and low-LET radiation. *Radiat. Res.* 163 (2005) 526-534
- Salter, E.P., Eilers, M.** Zellteilung, Zellzykluskontrolle und Apoptose.
In: „Lehrbuch Vorklinik. Teil A“, Schmidt, R.F., Unsicker, K.,
Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 2003, 1. Auflage, 477-488
- Sauer, R.** Strahlenchemie. In: „Radiologie“, Kauffmann, H., Sauer, R., Weber, W., Urban & Fischer Verlag/Elsevier, München, 2006, 3. Auflage, 37-39
- Seiki, M.** The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 624-632
- Scholz, M., Kraft-Weyrather, W., Ritter, S., Kraft, G.** Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 59-75
- Schulz-Ertner, D., Jakel, O., Schlege, W.** Radiation therapy with charged particles. *Semin. Radiat. Oncol.* 16 (2006) 249-259
- Shiloh, Y.** The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 402-410
- Simmons, D.L., Botting, R.M., HLA, T.** Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 387-437

Singh, R.K., Gutman, M., Reich, R., Bar-Eli, M. Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Res.* 55 (1995) 3669-3674

Singh, S., Singh, A.P., Sharma, B., Owen, L.B., Singh, R.K.
CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis.
Future Oncol. 6 (2010) 111-116

Sørensen, B.S., Overgaard, J., Bassler, N. In vitro RBE-LET dependence for multiple particle types. *Acta Oncol.* 50 (2011) 757-762

Sterry, W. Anatomische, physiologische und immunologische Grundlagen der Haut. In: „Kurzlehrbuch Dermatologie“, Sterry, W., Thieme Verlag, Stuttgart, 2011, 1. Auflage, 3-8

Stuede, J., Kulke, R., Christophers, E. Interleukin-1-stimulated Secretion of Interleukin-8 and Growth-related Oncogene- α Demonstrates Greatly Enhanced Keratinocyte Growth in Human Raft Cultured Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 1254-1260

Suzuki, M., Kase, Y., Kanai, T., Ando, K. Correlation between cell killing and residual chromatin breaks measured by PCC in six human cell lines irradiated with different radiation types. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000) 1189-1196

Suzuki, M., Kase, Y., Yamaguchi, H., Kanai, T., Ando, K. Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 48 (2000) 241-250

Ten, D. P., Hill, C.S. New insights into TGF-beta-Smad signalling.
Trends. Biochem. Sci. 29 (2004) 265-273

Tuffs, A. Homepage des Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT).
(<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Heidelberger-Ionenstrahl-Therapie-HIT.112189.0.html>), Stand 13.02.2013

Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebraniouk, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Parks, S.H., Thompsons, T., Karsenty, G., Bradley, A., Donehower, L.A. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415 (2002) 45-53

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell. Prolif.* 36 (2003) 131-149

Wagener, C., Müller, O. Die Tumorzelle. In: „Molekulare Onkologie“, Wagener, C., Müller, O., Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, 3. Auflage, 177-199

Ward, J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35 (1998) 95-125

Waugh, D.J., Wilson, C. The interleuin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6735-6741

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

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e103

Zirkle, R. E. Radiobiological additivity of various ionizing radiations. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther.* 63 (1950) 170-175

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

Zlobinskaya, O., Girst, S., Greubel, C., Hable, V., Siebenwirth, C., Walsh, D.W., Multhoff, G., Wilkens, J.J., Schmid, T.E., Dollinger, G. Reduced side effects by proton microchannel radiotherapy: study in a human skin model. *Radiat. Environ. Biophys.* 52 (2013) 123-133

9 Anhang

RealTime ready Custom Panels

EPI-200 Jeannine

Layout: RealTime ready Custom Panel 96 - 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TP53 <small>H. sapiens</small>											
B	GADD45A <small>H. sapiens</small>											
C	ATM <small>H. sapiens</small>											
D	PTGS2 <small>H. sapiens</small>											
E	MYC <small>H. sapiens</small>											
F	TGFB1 <small>H. sapiens</small>											
G	B2M <small>H. sapiens</small>											
H	GAPDH <small>H. sapiens</small>											

Abb. 37: Plattenlayout am Beispiel Lithium 2 Gy und Auftragung der Proben:
Spalte 1-3: 2 Gy, Replikat 1, Spalte 4-6: Replikat 2, Spalte 7-9: Replikat 3, Spalte 10-12: Kontrolle

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Gabriele Multhoff, der Leiterin der Experimentellen Radioonkologie und Strahlenbiologie an der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die freundliche Überlassung des Themas bedanken, für ihre konstruktive Kritik und ihre Anregungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Schmid danke ich sehr für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Meiner Mentorin, Frau Dr. Sabrina Astner, ohne die der Kontakt zu Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Schmid nicht zu Stande gekommen wäre, danke ich vielmals für ihre Vermittlung.

Auch bei den anderen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie möchte ich mich herzlich bedanken. Für die Einführung in die zu Grunde liegenden molekularbiologischen Techniken gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Olga Zlobinskaya und Frau Dörte Michalski. Herrn Dr. Matthias Gehrman, Frau Dr. Daniela Schilling und Frau Dr. Christine Bayer danke ich für ihre Anregungen und zahlreichen Hilfestellungen.

Herrn Prof. Dr. Günther Dollinger, Leiter des Instituts für Angewandte Physik und Messtechnik LRT2 der Universität der Bundeswehr München, danke ich für die freundliche Erlaubnis die Microbeam Facility SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente) für die Durchführung der Bestrahlungen mit Protonen und Lithiumionen zu nutzen.

Herrn Dr. Volker Hable und Herrn Christoph Greubel danke ich für die kompetente technische Unterstützung und die immer schnelle Klärung meiner physikalischen Fragen. Herrn Christoph Greubel danke ich darüber hinaus für die Durchsicht des entsprechenden Kapitels dieser Arbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Anna Friedl und ihren Mitarbeitern danke ich vielmals für die Möglichkeit der Präsentation erster Ergebnisse im Rahmen der Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung 2012 in München und ihre Anregungen im Rahmen der strahlenbiologischen Seminare.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die zu jeder Zeit gegebene Unterstützung.

Das Projekt wurde durch das DFG-Cluster of Excellence „Munich Center of Advanced Photonics“ sowie das Maier Leibnitz Laboratorium München gefördert.