

Aus dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Onkologisches Zentrum
Direktor Prof. Dr. Winfried Alberti

**Bedeutung der Expression des p53- und des p21-Proteins für
die Strahlenempfindlichkeit von humanen Fibroblasten**

zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristina Gahr

aus Elmshorn

Hamburg, 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg: 08.01.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Lorenzen

1	ARBEITSHYPOTHESE	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	DNA-Schäden nach ionisierender Bestrahlung	4
2.2	Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen	4
2.3	Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit und der Doppelstrangbruch-Reparatur, dem mitotischen Zelltod und dem G1-Arrest	7
2.4	Bedeutung von p53 für die Zellzyklusregulation und die Doppelstrangbruch-Reparatur	8
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	Zelllinien und Kultivierung der Zellen	14
3.2	Wachstumskinetik	15
3.3	Bestrahlung der Zellen	15
3.4	Prinzip und Durchführung des spezifischen Proteinnachweises	15
3.4.1	Proteinextraktion	16
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	16
3.4.3	SDS – Polyacrylamid Gelelektrophorese	17
3.4.4	Durchführung des Western-Blots	18
3.4.5	Auswertung der Proteinsignale	20
4	RESULTATE	21
4.1	Wachstumskinetik	21
4.2	Immunologischer Nachweis von p53 und p21	22
4.3	Reproduzierbarkeit des Proteinnachweises	23
4.3.1	Vergleich der Proteinsignale nach mehrfacher Messung desselben Proteinextraktes	23
4.3.2	Vergleich der Proteinsignale zweier unabhängiger Extraktionen	24
4.4	Basallevel von p53 und p21 in humanen Fibroblasten	25
4.4.1	Zusammenhang zwischen dem p53- und p21-Proteinbasallevel und der Ausprägung des G1-Arrests	27

4.4.2	Zusammenhang zwischen dem p53- und p21-Proteinbasallevel und der Doppelstrangbruch – Reparaturkapazität	28
4.4.3	Zusammenhang zwischen dem p53- und p21-Proteinbasallevel und dem Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy	29
4.5	Stabilisierung, bzw. Induktion des p53- und p21-Proteins in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	30
4.6	Kinetik der p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten	31
4.6.1	p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung: Langzeitkinetik	31
4.6.2.	p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung: Kurzzeitkinetik	34
4.7	Ausmaß der p53- und p21-Proteinexpression nach Bestrahlung	37
4.7.1	Ausmaß der p53-/p21-Proteinexpression nach Bestrahlung	37
4.7.2	Korrelation zwischen der p53- und p21-Proteinexpression nach Bestrahlung	38
4.8	Bedeutung der strahleninduzierten p53-Proteinakkumulation und der p21-Proteininduktion	39
4.8.1	Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg der p53- und p21-Proteinexpression und der Ausprägung des G1-Arrests	39
4.8.2	Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg der p53- und p21-Proteinexpression und der Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität	40
4.8.3	Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg der p53- und p21-Proteinexpression und dem Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy	41
5	DISKUSSION	42
5.1	Variation des p53-/p21-Proteinbasallevels	43
5.2	p53-Regulation nach Bestrahlung	43
5.3	p21-Induktion in Abhängigkeit von der p53-Regulation	46
5.4	Zusammenhang zwischen dem p53-/p21-Basallevel bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung und der Ausprägung des G1-Arrests	47
5.5	Zusammenhang zwischen dem p53-/p21-Basallevel bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung und der Doppelstrangbruch -Reparaturkapazität	49
5.6	Zusammenhang zwischen dem p53-/p21-Basallevel bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung und der Strahlenempfindlichkeit	51
6	ZUSAMMENFASSUNG	53

7	LITERATUR	54
8	ANHANG	63
8.1	Materialien	63
8.1.1	Geräte	63
8.1.2	Software	63
8.1.3	Verwendete Puffer und Lösungen	64
8.1.4	Antikörper	67
8.2	Abkürzungen	67
9	DANKSAGUNG	69
10	LEBENS LAUF	70
11	ERKLÄRUNG	71

1 Arbeitshypothese

Ein großes und die einsetzbare Dosis limitierendes Problem der Strahlentherapie sind die durch die Strahlung hervorgerufenen Nebenwirkungen. Dabei wird beobachtet, dass das Ausmaß auftretender Normalgewebsreaktionen trotz gleichen Behandlungsschemata bei verschiedenen Patienten stark unterschiedlich ausgeprägt ist (Johansen et al., 1994). Die Ursachen dieser individuellen Strahlenempfindlichkeit (SE) sind bisher nur teilweise aufgeklärt. Bisherige Daten zeigen, dass der zellulären Doppelstrangbruch (DSB)-Reparaturkapazität große Bedeutung zukommt, da gezeigt wurde, dass die Anzahl falsch- oder nicht-reparierter DSBS mit der Strahlenempfindlichkeit von Zellen korreliert (Dikomey et al., 1998, Dikomey et al., 2000, Kasten-Pisula et al. 2005). Das Ausmaß der Expression wichtiger an der DSB-Reparatur beteiligter Gene/Proteine sowie deren Aktivität scheint dafür jedoch nicht ursächlich zu sein (Kasten et al., 1999; Kasten-Pisula et al., eingereicht). Auch das Ausmaß des strahleninduzierten G1-Arrestes scheint die SE von Normalzellen zu beeinflussen (Brammer et al., unveröffentlicht). Es wäre ein bedeutender Schritt zu klären, welche Parameter das Ausmaß der DSB-Reparatur, des G1-Arrestes und damit auch der zellulären SE bestimmen, um entsprechende Therapiestrategien etablieren zu können, die eine individuell ausgerichtete Therapie erlauben würden.

Das p53-Protein ist in Normalzellen für die Regulation des Zellzyklus von essentieller Bedeutung. Zusätzlich ist es auch sowohl indirekt als Co-Faktor als auch direkt an der Reparatur von DSBS beteiligt. Aus diesem Grund stellen p53 und das davon transaktivierte p21-Protein potentiell wichtige Kandidaten mit Wirkung auf die SE dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte dementsprechend geklärt werden, welche Bedeutung die beiden Proteine p53 und p21 für die Regulation des Zellzyklus, die zelluläre DSB-Reparaturkapazität als auch die SE haben. Hierzu wurden 10 humane Normalfibroblastenlinien eingesetzt, die sich (wie zuvor ermittelt, Dikomey et al., 2000; Brammer et al., unveröffentlicht) ganz deutlich in den drei oben genannten Parametern unterscheiden. Für den Nachweis der Proteine sollte die Methode des Western-Blots zunächst etabliert und anschließend optimiert eingesetzt werden.

Insbesondere sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1.) Werden die zuvor beobachteten Unterschiede in G1-Arrest, DSB-Reparatur und SE durch einen unterschiedlich hohen Basallevel der Proteine p53 und p21 hervorgerufen ?
oder

2.) Werden die zuvor beobachteten Unterschiede in G1-Arrest, DSB-Reparatur und SE eher durch eine unterschiedlich starke strahleninduzierte p53-Proteinakkumulation, bzw. p21-Proteininduktion bestimmt ?

2 Einleitung

Bösartige Neubildungen stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt, 2006). Je nach betroffenem Organsystem sowie Stadium der Erkrankung ergeben sich unterschiedliche Therapieoptionen. Eine Therapiemöglichkeit stellt die Bestrahlung der Tumoren dar. Prinzip der Strahlentherapie ist es, durch ionisierende Strahlen eine starke Schädigung der DNA der Tumorzellen herbeizuführen. Je größer die Strahlendosis, desto wahrscheinlicher ist es, alle Tumorzellen letal zu schädigen. Das Problem hierbei ist jedoch, dass das im Bestrahlungsfeld liegende tumorumgebende Normalgewebe ebenfalls eine Schädigung erfährt, die sich in Form von Akut- oder Spätschäden äußern kann. Die einzelnen Gewebe des Organismus unterscheiden sich entsprechend ihrer Proliferationsrate und dem Differenzierungsgrad in ihrer SE. Im Allgemeinen gilt, dass Zellen mit hohen Teilungsraten und niedrigem Differenzierungsgrad am strahlenempfindlichsten sind (Herrmann und Baumann, 1997). Akutschäden z.B. der Haut können in Form eines Erythems oder einer Dermatitis auftreten, mögliche Spätwirkungen sind z.B. Hautatrophie, Fibrosierung, Ulcerationen und Narbenbildung. Das Ausmaß der zu erwartenden Akut- und Spätwirkung legt dabei die Limitierung der Strahlendosis fest.

Bei der Ausprägung der Normalgewebsreaktion nach Bestrahlung zeigen sich allerdings trotz gleichem Behandlungsschema deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten (Johansen et al., 1994). Welche Ursachen dieser individuellen Strahlenempfindlichkeit zugrunde liegen, ist bisher nur teilweise geklärt. Bisherige Daten zeigen, dass der zellulären DSB-Reparaturkapazität große Bedeutung zukommt, da gezeigt wurde, dass die Anzahl falsch- oder nicht-reparierter DSBS mit der Strahlenempfindlichkeit von Zellen korreliert (Dikomey et al., 1998, Dikomey et al., 2000, Kasten-Pisula et al., 2005). Das Ausmaß der Expression wichtiger an der DSB-Reparatur beteiligter Gene / Proteine sowie deren Aktivität scheint dafür jedoch nicht ursächlich zu sein (Kasten et al., 1999; Kasten-Pisula et al., eingereicht). Auch das Ausmaß des strahleninduzierten G1-Arrestes scheint die SE von Normalzellen zu beeinflussen (Brammer et al., unveröffentlicht). Es wäre ein bedeutender Schritt zu klären, welche Parameter das Ausmaß der zellulären SE bestimmen, um entsprechende Therapiestrategien etablieren zu können, die eine individuell ausgerichtete Therapie erlauben würden.

2.1 DNA-Schäden nach ionisierender Bestrahlung

Im Laufe der Entwicklungsgeschichte haben sich viele komplexe zelluläre DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, um Zellen vor DNA-Schäden und ggf. nachfolgenden Mutationen zu schützen. Bereits während der Bestrahlung beginnen Reparaturvorgänge, die Stunden bis Tage nach Bestrahlung andauern können und eine Erholung des Organismus bewirken.

Gelingt die Reparatur der DNA-Schäden jedoch nicht, kann es durch die Bildung von Chromosomenaberrationen zum Verlust genetischer Informationen kommen, die eine bleibende Schädigung der Zelle oder sogar den Zelltod bewirken können (Herrmann und Baumann, 1997).

Eine Bestrahlung mit 1 Gy verursacht ca. 4000-5000 DNA-Schäden in einer Zelle (Herrmann und Baumann, 1997). Die Schäden können alle DNA-Bausteine betreffen, jedoch variiert die Häufigkeit und vor allem die biologische Bedeutung (Kaufmann et al., 2001). Die häufigsten Läsionen stellen die Basenschäden mit ca. 3000 erzeugten Schäden pro Zelle und Gy dar, gefolgt von Einzelstrangbrüchen mit etwa 1000 Schäden pro Zelle und Gy. Gehäufte Läsionen (50-160 / Zelle und Gy) und DNA-Protein-Vernetzungen (160 / Zelle und Gy) treten weniger häufig auf. DSBS sind mit ca. 40 Schäden pro Zelle und Gy ein sehr seltenes Ereignis (Kaufmann et al., 2001). Ihnen kommt jedoch trotz der viel geringeren Häufigkeit die größte biologische Bedeutung zu.

2.2 Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen

DNA-DSBS werden in Säugerzellen vor allem über zwei Mechanismen repariert, zum einen über das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und zum anderen über die homologe Rekombination (HR) (Hoeijmakers, 2001; Christmann et al., 2003).

Das NHEJ ist der dominante Mechanismus, vor allem in der G1-Phase des Zellzyklus (Lieber, 2003). Die HR ist in der S- und G2-Phase aktiv (Takata et al., 1998). Die beiden Reparaturmechanismen unterscheiden sich zudem in ihrer Genauigkeit sowie der Beteiligung verschiedener Reparaturproteine, bzw. Proteinkomplexe (Lieber, 2003).

Beim NHEJ werden die Enden des DSB direkt miteinander verknüpft. Hierfür werden keine Homologien oder nur Mikrohomologien von einigen Nukleotiden benötigt (Hoeijmakers,

2001). Die Bruchenden werden durch den Proteinkomplex bestehend aus Ku70 und Ku80 erkannt und zusammengehalten. Durch Anlagerung der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs wird die Kinaseaktivität des Komplexes aktiviert. Es erfolgt die Prozessierung der Bruchenden mit Hilfe des MRE11/Rad50/NBS1(MRN)-Proteinkomplexes an den 3'-Enden sowie mit Hilfe des Proteins FEN1 an den 5'-Enden. Das Protein Artemis ist wahrscheinlich komplexiert mit der DNA-PK ebenfalls an diesem Prozeß beteiligt (Moshous et al., 2001). Durch die Prozessierung der Enden kann es zum Verlust von wenigen Nukleotiden kommen, so dass das NHEJ zu einer fehlerhaften Reparatur des DNA-DSB führen kann (Pfeiffer et al., 2000; Hoeijmakers, 2001). Zuletzt erfolgt die Ligation der bereinigten Bruchenden durch den XRCC4/LigaseIV-Proteinkomplex.

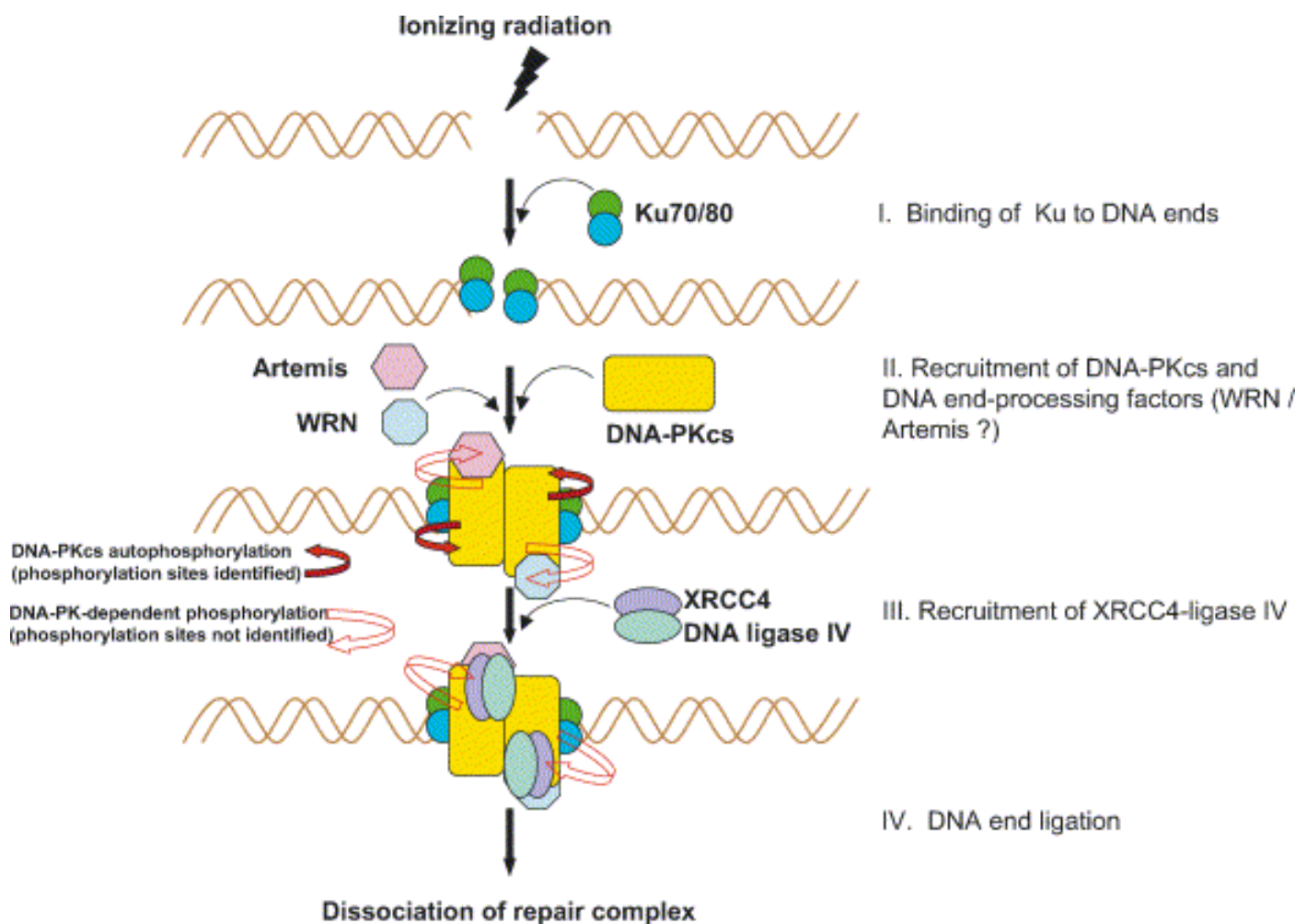


Abbildung 1: Nicht homologes Endjoining

Schematischer Ablauf des nicht homologen Endjoinings (nach Burma und Chen, 2004).

Bei der HR wird eine Matrize in Form des Schwesterchromatids oder des homologen Chromosoms benötigt, so dass dieser Reparaturvorgang ausschließlich in der späten S- oder G2-Phase stattfinden kann (Takata et al., 1998). An diesem Prozess sind u.a. RAD51 und dessen Homologe, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2, XRCC2, XRCC3 und der MRN-Komplex als Reparaturenzyme beteiligt (Karran, 2000).

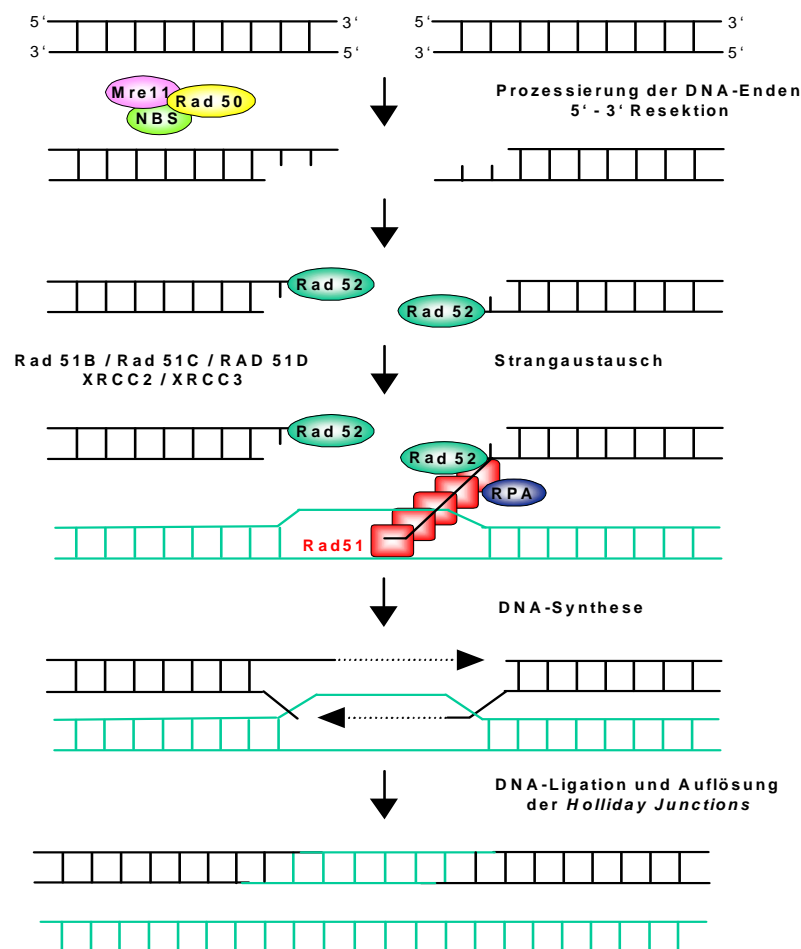


Abbildung2: Homologe Rekombination

Schematischer Ablauf der homologen Rekombination (nach Christmann et al., 2003).

Als erster Schritt werden durch den MRN-Komplex die DNA-DSB-Enden resiziert, so dass einzelsträngige Überhänge resultieren (Valerie und Povirk, 2003). Rad51 lagert sich an die Einzelstrangüberhänge an und bewirkt die Ausbildung eines Nukleofilamentes, das die Invasion des Einzelstranges in den homologen unbeschädigten Doppelstrang des

Schwesterchromatides ermöglicht. Dieser Schritt erfordert neben RAD51 und dessen Homologen ein koordiniertes Zusammenspiel von RAD52, RAD54, RAD55/57 und dem Replikationsprotein A (Sung, 1994). Es kommt zur Ausbildung einer Heteroduplex, deren Zweigstellen Holliday Junctions genannt werden. Die dabei entstandenen einzelsträngigen Bereiche des unbeschädigten Stranges werden durch Polymerasen korrekt zu Doppelsträngen aufgefüllt. Abschließend werden die Holliday Junctions mit Hilfe einer Endonuklease aufgelöst und die Enden wieder zusammengefügt.

2.3 Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit und der Doppelstrangbruch-Reparatur, dem mitotischen Zelltod und dem G1-Arrest

Bezüglich des Zellüberlebens nach Bestrahlung kommt vor allem den DSBS große Bedeutung zu, da zwischen nicht-reparierten DSBS und zellulärer SE eine Korrelation festgestellt wurde (Dikomey et al., 2000). Auch für Zelllinien mit verschiedenen genetischen Defekten konnte gezeigt werden, dass die DSB-Reparaturkapazität das Ausmaß der SE bestimmt (Kasten-Pisula et al., 2005).

Wenn strahleninduzierte DSBS nicht oder falsch repariert werden, können diese während der Replikation in Chromosomenaberrationen überführt werden (Pfeiffer et al., 2000; Dikomey et al., 2003), die sich nicht letal oder letal auswirken. Nicht-letale Chromosomenaberrationen wie z.B. Translokationen bewirken Funktionsstörungen und Fehlregulationen, während letale Chromosomenaberrationen wie terminale oder interstitielle Deletionen und dizentrische Chromosomen über die Bildung sog. azentrischer Fragmente den mitotischen Zelltod herbeiführen. Diese Aberrationen führen zu einem Verlust von DNA, so dass die darauf codierten essentiellen Proteine nicht mehr synthetisiert werden können und es aufgrund des Proteinmangels zur Zellinaktivierung, dem mitotischen Zelltod, kommt (Borgmann et al., 2004). Ca. 50% der Inaktivierung von Normalzellen ist auf den mitotischen Zelltod zurückzuführen, während der Rest durch p53-abhängige Prozesse wie z.B. dem permanenten G1-Arrest ausgelöst wird (Borgmann et al., 2004).

DSBS führen ebenfalls zur Stabilisierung des p53-Proteins und hierüber zu dessen Aktivierung und zur Transaktivierung von p21, das über cyclinabhängige Kinasen (CDKS) ein Vorschreiten des Zellzyklus verhindert (Dahm-Daphi, 2000). Je nach Schwere der Schädigung kommt es zu einem transienten oder permanenten G1-Arrest, der die Replikation von Schäden verhindern und Zeit zur Reparatur gewährleisten soll, bzw. bei Permanenz eine Zellinaktivierung bewirkt (Bristow et al., 1998). Auch zwischen der DSB-Reparaturkapazität

und dem Anteil arettierter Zellen in der G1-Phase wurde eine Korrelation festgestellt (Brammer et al., unveröffentlicht).

2.4 Bedeutung von p53 für die Zellzyklusregulation und die Doppelstrangbruch-Reparatur

Das p53-Protein ist eines der meist untersuchten Proteine in der Tumorforschung. Bei der Regulation der Zellantwort auf DNA-Schäden nimmt es eine zentrale Stellung ein. Die Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose wird nach DNA-Schädigung durch p53 gesteuert, so dass es maßgeblich zur Stabilität des Genoms der Zelle beiträgt und daher auch als Tumorsuppressor bezeichnet wird (Lane, 1992). Das p53-Protein ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 codiert und besteht aus 393 Aminosäuren. Es konnten mehrere Domänen identifiziert werden, die hochkonserviert sind. Am N-Terminus (Aminosäuren 1-59) befindet sich eine Transaktivierungsdomäne. Nach Bindung an DNA induziert p53 die Transkription von Genen, die in ihren Promotoren eine p53-Bindungsregion aufweisen (Selivanova und Wiman, 1995). Die spezifische DNA-Bindungsdomäne befindet sich zwischen den Aminosäuren 115 bis 295 und stellt den zentralen Bereich des Proteins dar. P53 erfüllt somit die Voraussetzung als Transskriptionsfaktor, die Synthese bestimmter Proteine zu induzieren. Da ein Transkriptionsfaktor seine Funktion im Zellkern ausübt, verfügt p53 im Bereich des C-Terminus über eine Lokalisierungssequenz, die ein Einschleusen in den Zellkern ermöglicht (Albrechtsen et al., 1999). Am C-Terminus ist ebenfalls eine Oligomerisierungsdomäne lokalisiert, die für die Ausbildung stabiler p53-Tetramere verantwortlich ist (Bristow et al., 1996). P53 kann eine Interaktionen mit vielen anderen Proteinen eingehen, die z.B. auch an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, und somit indirekten Einfluss auf verschiedene zelluläre Proteine und Prozesse nehmen (Dahm-Daphi, 2000; siehe Abb. 3).

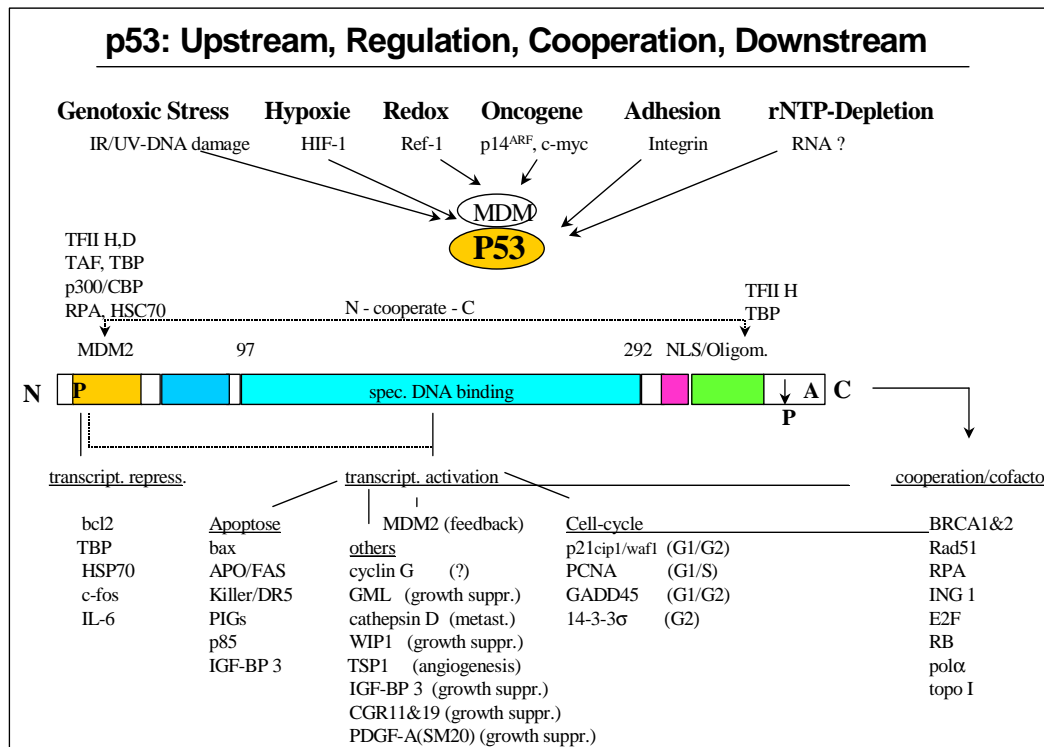


Abbildung 3: Struktur des p53-Proteins und dessen Funktionen

Das p53-Protein besitzt verschiedene Domänen, über die spezifische Funktionen reguliert werden. Oben sind verschiedene Stimuli gezeigt, die die p53-Aktivität verstärken. Unten sind verschiedene Proteine aufgeführt, die durch p53 reguliert werden oder in Kooperation mit p53 die nachfolgenden Effekte bewirken (nach Dahm-Daphi, 2000).

Da das p53-Protein vor allem genomstabilisierende Funktionen ausübt, muss es nach DNA-Schädigung schnell verfügbar sein. In der Zelle ist daher permanent latentes p53 vorhanden, so dass es im Falle einer DNA-Schädigung lediglich aktiviert werden muss (Fritsche et al., 1993; Nelson und Kastan, 1994). In einem solchen Fall werden eine ATM-abhängige Phosphorylierung sowie weitere posttranslationale Modifizierungen induziert, die zu einer Stabilisierung und Akkumulation des Proteins führen (Fei und El-Deiry, 2003). Hierdurch verlängert sich die Halbwertszeit des p53, es kommt zu einer gesteigerten nukleären Anreicherung (Midgley und Lane, 1997) und das Protein wird in seine tetramere Form überführt (Sakaguchi et al., 1997), die als Transskriptionsfaktor die Synthese verschiedener Proteine induzieren kann (Morris et al., 1996). Über diese aktivierten Proteine entfaltet p53 seine Wirkung. Seine Hauptfunktionen stellen die Regulation des Zellzyklus, die Induktion der Apoptose und die DNA-Reparatur dar.

Zellzyklus

Proliferierende Zellen durchlaufen einen Zyklus, der sich in Interphase und Mitosephase gliedert und zur Reproduktion identischer Chromosomen führt, die in Tochterzellen aufgeteilt werden.

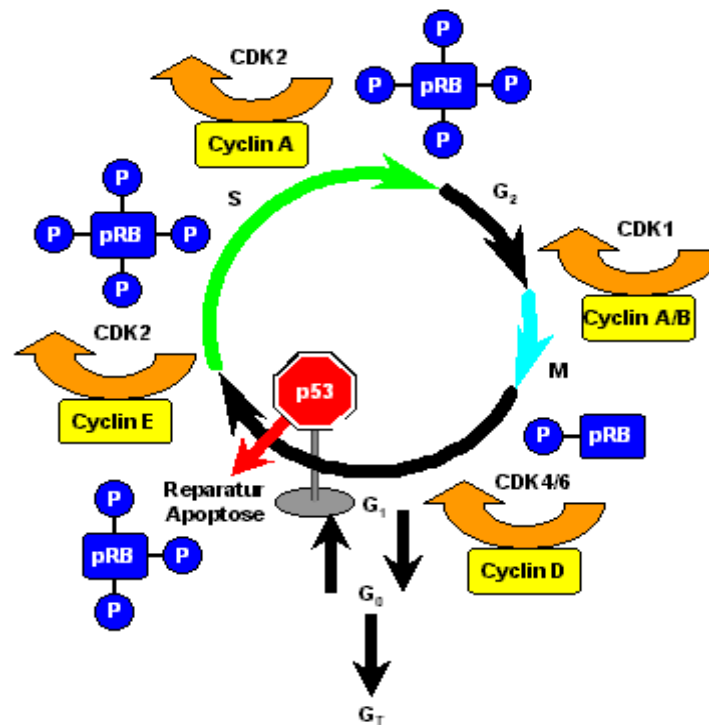


Abbildung 4: Aktivität von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKS) im Verlauf des Zellzyklus

In jeder Zellzyklusphase sind spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKS) interagieren und diese hierdurch aktivieren. Diese CDK-Komplexe phosphorylieren RB (Retinoblastom-Protein) und ermöglichen den Fortschritt der Zelle durch den Zellzyklus bis RB gegen Ende des Zellzyklus durch Phosphatasen dephosphoryliert wird und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen nach Ende der M-Phase erneut in der G₁-Phase sind (nach Wagener, 1999).

Die G₁-Phase liegt zwischen Mitose- und Synthesephase. In dieser Phase können die Zellen wachsen, bzw. sich auf den Eintritt in die DNA-Synthesephase vorbereiten. Am Ende dieser Phase liegt der G₁-Kontrollpunkt, hier wird das Vorliegen von DNA-Schäden kontrolliert und geprüft, ob die Zelle bereit ist, in die Synthesephase einzutreten (Wagener, 1999). Ist der G₁-Kontrollpunkt passiert, tritt die Zelle in die Synthesephase ein, in der es zur Duplikation der DNA kommt. Nach Durchlaufen dieser Phase besteht jedes Chromosom aus zwei

Schwesterchromatiden. Anschließend beginnt die G₂-Phase. Hier erfolgt die Überprüfung der erfolgreichen DNA-Replikation. Bevor die Zellen nun in die Mitosephase eintreten, muss der G₂-Kontrollpunkt passiert werden, den nur Zellen nach vollständiger Replikation überwinden können. In der Mitosephase werden die Chromosomen kondensiert und es erfolgt die Trennung der Schwesterchromatiden und des Zytoplasmas, so dass zwei Tochterzellen entstehen.

Neben diesen vier Phasen gibt es noch die G₀-Phase. In dieser Ruhephase können Zellen über Jahre bei vermindertem Stoffwechsel verharren, bevor sie wieder in den Zyklus eintreten (Herrmann und Baumann, 1997). Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKS) reguliert. CDKS garantieren das ungestörte Durchlaufen der Zellzyklusphasen, indem extra- und intrazelluläre Signale wahrgenommen und koordiniert werden. Die CDKS sind nur in Verbindung mit ihrer regulatorischen Untereinheit, den Cyclinen, aktiv. Im Verlauf des Zellzyklus treten die unterschiedlichen CDKS (CDK 1,2,4,5,6) mit den verschiedenen Cyclinen (A,B,D,E) zu definierten Komplexen zusammen (siehe Abb.4). Die Aktivität der CDKS, bzw. der Komplexe kann zum einen durch Phosphorylierung an Threoninresten gesteigert oder durch Phosphorylierung eines Thyrosin- und Threoninrests herabreguliert werden oder durch inhibitorische Proteine gehemmt werden (Wagener, 1999).

P53-abhängige Zellzyklusregulation nach DNA-Schädigung

P53 beeinflusst den Zellzyklus an verschiedenen Punkten, indem das Protein andere Gene transaktiviert, nachfolgend Proteine synthetisiert werden und diese wiederum in den Zellzyklus eingreifen.

Der G₁-Arrest gehört zu den p53-abhängigen Stopps des Zellzyklus. Durch DNA-Schäden kommt es zur Stabilisierung und Aktivierung von p53, welches wiederum zur Induktion von p21 führt. Das p21-Protein ist ein Inhibitor der CDKS (Harper et al., 1993). Am Übergang von der G₁- zur S-Phase inaktiviert p21 den Cyclin E/CDK2- Komplex, der normalerweise das RB-Protein phosphoryliert und den Transkriptionsfaktors E2F-1 stabilisiert und so das Vorschreiten des Zellzyklus in die S-Phase bewirkt (Dahm-Daphi, 2000). Durch die Inhibierung des Cyclin E/CDK2-Komplexes verweilt die Zelle jedoch weiter in der G₁-Phase (G₁-Arrest).

Der G₁-Arrest kann bereits durch einen einzigen DSB ausgelöst werden (Di Leonardo et al., 1994). Es wird angenommen, dass hierdurch Zeit für Reparaturvorgänge gewonnen wird und

somit mögliche Mutationen verhindert werden (Hoeijmakers, 2001). Können nahezu alle DNA-Schäden repariert werden, wird der G1-Arrest wieder aufgelöst (transienter G1-Arrest). Ist die Zelle jedoch stark oder irreversibel geschädigt, ist der Übergang je nach Zellart und extrazellulären Bedingungen in einen permanenten G1-Arrest oder in die Apoptose möglich (Bristow et al., 1998). Die Apoptose wird durch die p53-induzierten Proteine der BCL-2/BAX-Familie gesteuert (Dahm-Daphi, 2000). Es erfolgt das Herunterregeln des apoptosehemmenden BCL-2 und die vermehrte Induktion des BAX-Proteins, das über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose einleitet (Dahm-Daphi, 2000).

Neben der Beteiligung des p21-Proteins am G1-Arrest wurde auch eine Interaktion zwischen p21 und dem Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) festgestellt (Waga et al., 1994). PCNA und p21 bilden Komplexe (Chen et al., 1995), die wiederum den Elongationsschritt der DNA-Replikation blockieren (Waga et al., 1994). Somit werden die Zellen nach strahleninduzierter Schädigung einerseits über die Hemmung der CDKS und andererseits über die Blockierung der DNA-Synthese am Eintritt, bzw. am Fortschreiten in der S-Phase gehindert.

Durch das Auslösen von Zellzyklusarresten oder der Apoptose wird das Übertragen von Mutationen verhindert und somit die Erhaltung der genetischen Stabilität gewahrt.

Einfluss von p53 auf die Doppelstrangbruch-Reparatur

Die Beteiligung von p53 an den verschiedenen Reparaturmechanismen ist Gegenstand intensiver Forschung. Die DSB-Reparatur stand dabei bisher im Mittelpunkt, da die Anzahl nicht-reparierter DSBS das Ausmaß der SE von Zellen bestimmt (Dikomey et al., 2000; Rothkamm und Löbrich, 2002). Beide DSB-Reparaturmechanismen, NHEJ und HR, wurden in Hinsicht auf eine direkte oder indirekte Beteiligung von p53 untersucht. Für das NHEJ gibt es nur relativ wenige Daten, die zeigen, dass p53 Einfluss auf diesen Prozess zu haben scheint. In Plasmid-basierten Assays konnte gezeigt werden, dass p53 die Verknüpfung von DSBS stimuliert. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass diese Fähigkeit nur für kurze Strangüberhänge besteht (Tang et al., 1999). Ebenso konnte mit Hilfe von Plasmid-Substraten, in die DSBS mit Hilfe einer Endonuklease induziert wurden, gezeigt werden, dass Wildtyp p53 die Deletion von DNA-Sequenzen beim NHEJ hemmt und im Vergleich zu p53-Null-MEF-Zellen deutlich weniger (250fach) fehlerhafte Ereignisse beim Zusammenfügen der DNA-Enden auftraten (Dahm-Daphi et al., 2005). P53 könnte daher eine wichtige Rolle für die Genauigkeit des NHEJ spielen (Dahm-Daphi et al., 2005).

Zum Einfluss von p53 auf die HR gibt es weitaus mehr Daten. Wildtyp p53 inhibiert in Zusammenwirken mit RAD51 und RAD54 die HR, während mutiertes p53 die HR stimuliert (Stürzbecher et al., 1996; Linke et al., 2003). Ein Verlust der p53 Wildtyp-Funktion führt in Zellen zu einer 3-100fach erhöhten Rekombinationsrate (Wiesmüller et al., 1996; Mekeel et al., 1997; Dudenhöffer et al., 1998; Willers et al., 2000). Eine erhöhte Aktivität der HR führt zur fehlerhaften Rekombination mit Translokationen, Deletionen oder anderen Chromosomenschäden.

Ebenso konnten direkte Interaktionen zwischen p53 und den HR-Reparaturproteinen BRCA1, BRCA2, RAD51 und RPA festgestellt werden (Chai et al., 1999; Dutta et al., 1993; Marmorstein et al., 1998; Stürzbecher et al., 1996), so dass von einer Cofaktor-Aktivität des p53 bei der HR ausgegangen wird. Neben der Beteiligung als Cofaktor gibt es Hinweise, dass p53 selbst Reparaturfunktionen ausübt. P53 besitzt eine 3'-5' Exonuleaseaktivität (El-Deiry, 2003). Da Exonukleasen für DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination erforderlich sind und ihnen eine Erhöhung der Genauigkeit zugeschrieben wird, wird bei der 3'-5' Exonuleaseaktivität des p53-Proteins ebenfalls ein Mitwirken beim Proofreading vermutet (Janus et al., 1999).

Neuere Daten zeigen, dass neben den DSBS auch Basenschäden das Ausmaß der SE beeinflussen können, da sowohl einzelne als auch vor allem gehäufte (geclusterte) Basenschäden durch einsetzende Reparaturvorgänge in sekundäre DSBS umgewandelt werden können und diese sich entsprechend auswirken können (Sutherland et al., 2000; Sutherland et al., 2002; Friedberg, 2003). Verschiedene Autoren zeigten, dass das p53-Protein die Reparaturkinetik von Basenschäden positiv beeinflussen kann (Offer et al., 1999; Offer et al., 2001; Zhou et al., 2001). Diese Daten wurden *in vitro* mit Hilfe von Oligonukleotiden ermittelt, wobei die Reparatur von künstlich erzeugten Basenschäden gemessen wurde. Untersuchungen an p53-profizienten und defizienten embryonalen Mausfibroblasten zeigten zudem, dass p53 die Reparatur von strahlen-induzierten Basenschäden (8-OH-G) auch in intakten Zellen stimuliert. Die p53 profizienten Zellen wiesen eine um den Faktor 2,3 schnellere Reparatur der Basenschäden gegenüber den p53 defizienten Zellen auf und zeigten parallel dazu ein besseres Überleben nach Bestrahlung (Kasten-Pisula et al., unveröffentlicht).

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien und Kultivierung der Zellen

Folgende humane Normalfibroblasten wurden untersucht:

Normalfibroblasten AF Nr.: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12

Die 10 verschiedenen Fibroblastenlinien wurden ursprünglich aus Hautbiopsien von rezidivfreien Brustkrebspatientinnen etabliert und freundlicherweise von Prof. Dr. J. Overgaard (Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

Diese 10 Patientinnen gehören zu einer Gruppe von 41 Patientinnen, bei denen eine Bestrahlungstherapie nach Mastektomie im Zeitraum von 1978-1982 am Universitätskrankenhaus Aarhus, Dänemark, durchgeführt wurde. Die Hautbiopsien wurden aus einem unbestrahlten Gebiet am Oberarm entnommen. Diese Fibroblastenlinien zeigen deutliche Unterschiede in ihrer SE (SF 3,5 Gy = 0,03–0,28; Dikomey et al., 2000), die mit der Ausprägung der subkutanen Fibrose als strahleninduzierte Spätreaktion des Normalgewebes (Johansen et al., 1994) sowie mit dem Ausmaß der zellulären DSB-Reparaturkapazität (95% - 98%) (Dikomey et al., 2000) korreliert.

HSF 1:

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Fibroblasten, die aus einer Hautbiopsie eines Normalspenders an der Uni-Klinik Tübingen (Prof. H.-P. Rodemann, Tübingen) etabliert wurden.

NFHH₂:

Die NFHH₂-Fibroblasten wurden aus einer Hautbiopsie eines Normalspenders an der Uni-Klinik Hamburg-Eppendorf etabliert. Diese Fibroblasten sind durch einen extrem starken G1-Arrest gekennzeichnet (Brammer et al., unveröffentlicht).

Alle Zelllinien wachsen als Monolayer bis zur Konfluenz. Die Kultivierung aller oben genannten Zelllinien erfolgte in T-75 Gewebekulturflaschen (Greiner Labortechnik). Als Kulturmedium diente DMEM (Gibco BRL) mit 15% FKS (Gibco BRL) und mit Zusatz von

Penicillin/ Streptomycin (Gibco BRL). Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 100%iger Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Zur pH-Stabilisierung wurden sie mit 5 % CO₂ begast.

Bei allen Zellkulturen erfolgte alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 0,25% EDTA-Trypsin (Gibco BRL) abgelöst und in geringerer Zellzahl zur Weiterzuchtung neu ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml erfolgte mittels eines Zählgerätes (Coulter Electronics, Modell F). Für Experimente wurden konfluente Kulturen eingesetzt.

3.2 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten näher charakterisieren zu können, wurde eine Wachstumskurve von HSF1 erstellt. Hierfür wurden $2,2 \times 10^5$ Zellen pro Zellkulturflasche (T25, Greiner) ausgesät. Im Abstand von 24 Stunden wurde die Zellzahl in den Kulturflaschen bestimmt.

3.3 Bestrahlung der Zellen

Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Plateauphase. Sie wurden mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt. Die verwendete Röntgenröhre (RT 200, Fa. C.H.F. Müller) wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 200keV, einem Röhrenstrom von 20mA und einer 0,5 mm Kupferfilterung betrieben.

Die Eichung der Röntgenröhre erfolgte mit Hilfe eines Duplex-Dosimeters (PTW), das mit einem Strontium-Präparat geeicht wurde.

3.4 Prinzip und Durchführung des spezifischen Proteinnachweises

- I. Proteinextraktion / Gesamtzellextrakte nach Finnie et al. (1995)
- II. Proteinbestimmung nach Bradford
- III. SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
- IV. Western-Blot
- V. Detektion und Auswertung der Proteinsignale

3.4.1 *Proteinextraktion*

Gesamtzellextrakte enthalten alle Proteine, sowohl aus dem Kern als auch aus dem Cytoplasma. Die Extraktion erfolgte nach einem modifizierten Verfahren nach Finnie et al. (1995) durch mechanisches Aufbrechen der Membranen. Nach Absaugen des Mediums und Waschen des Zellmonolayers mit 20 ml PBS (T75, Greiner) wurden die Zellen trypsinisiert und in 20 ml PBS aufgenommen. Danach erfolgte eine Zentrifugation (8 min bei 4°C mit 1000 U/min). Anschließend wurden die Zellen noch zweimal im Wechsel mit PBS gewaschen, um Trypsinreste zu entfernen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Volumen des Zellpellets bestimmt und in einer äquivalenten Menge Lysispuffer, der zuvor mit PMSF und Glycerol komplementiert wurde, resuspendiert. Durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im 30°C warmen Wasserbad wurden die Kern- und Zellmembranen der Zellen aufgebrochen. Die freigesetzten Proteine wurden durch die Protease-Inhibitoren im Lysispuffer sowie der Temperatur von 4°C vor Spaltung geschützt. Mittels Zentrifugation (10 min bei 4°C mit 11000 U/min) wurden Membranfragmente vom Proteinextrakt getrennt. Der Überstand (= Proteinextrakt) wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.4.2 *Proteinbestimmung nach Bradford*

Um definierte Proteinmengen in der nachfolgenden Gelelektrophorese einsetzen zu können, musste zunächst der Proteingehalt der Extrakte bestimmt werden. Hierzu wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976; Bio-Rad Protein Assay Manual) verwendet.

Bei diesem Verfahren bindet ein Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G-250) an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von ursprünglich 465 nm auf 595 nm verschiebt. Durch Vergleich der Bindung des Farbstoffes an ein Standardprotein bekannter Konzentration kann die Proteinkonzentration des Extraktes bestimmt werden.

Die Extrakte wurden von 1:500 bis 1:4000 mit sterilem und neutralem Aqua bidest verdünnt. Anschließend wurden 800 µl verdünnte Proteinlösung mit 200 µl Biorad-Farbreagenz in einer Einweg-Photometerküvette (Ratio Lab) vermischt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach zehnmütiger Inkubation (bei Raumtemperatur) am Photometer (Bio-Photometer, Eppendorf) bei 595 nm.

Zur Erstellung einer Eichreihe wurde Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0-20µg/ml, ausgehend von einer Stammlösung (1mg/ml), ebenfalls mit sterilem, neutralem

Aqua bidest angesetzt und wie oben beschrieben am Photometer gemessen. Es wurden jeweils 3 Ansätze von jeder Probe gemessen. Die Steigung der Eichgeraden wurde mit der Formel

$$m = \Sigma x \cdot y / \Sigma x^2$$

berechnet. x ist die eingesetzte Proteinkonzentration einer gemessenen Eich-Probe, y die dazugehörige Extinktion und m die Steigung der Eichgeraden. Die Konzentration der Extrakte ließ sich dann mit der Formel

$$K = E/m \cdot VF$$

bestimmen, wobei K die zu errechnende Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ war, E die Extinktion und VF der Verdünnungsfaktor der Probe.

3.4.3 SDS – Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS–PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) ermöglicht es, die im Gesamtzellextrakt enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Im alkalischen Milieu führt SDS zu einer negativ geladenen Umhüllung der Proteine. Diese wandern im elektrischen Feld Richtung Anode mit einer zu ihrem Molekulargewicht umgekehrt proportionalen Geschwindigkeit.

Verwendet wurden eine Mini-Gelkammer (BioRad) und Fertiggele (BioRad). Die entsprechenden Mengen Proteinextrakt wurden mit 10 μl SDS-Ladepuffer gemischt und mit sterilem Aqua bidest auf 22 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden nochmals durchmischt, kurz zentrifugiert (10000 U/min für 20 sec) und anschließend für 8 Minuten auf 100°C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen.

Nach dem Aufkochen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, nochmals durchmischt und zentrifugiert (20 sec bei 4°C mit 10000 U/min). Im Anschluß daran wurden die Proben in die einzelnen Taschen des Gels pipettiert, welches sich nun in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer befand. Um das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden bestimmen zu können, wurde pro Gel eine Tasche mit einem ECL-Protein-Molekulargewichtsmarker oder einem Farb-Protein-Molekulargewichtsmarker (MW 14,4-97 kDa, Amersham Pharmacia Biotech oder Prestained SDS-PAGE Standards, BioRad, MW 7,6-206 kDa) beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in zwei Phasen. Zu Beginn wurden die Proteine in der Sammelphase (4% Polyacrylamid) bei einem konstanten Strom von 10mA über 10 Minuten in den Geltaschen gesammelt. Darauf folgte die

Trennphase (12% Polyacrylamid) bei einem konstanten Strom von 25mA für 60 Minuten (bei 2 Gelen gleichzeitig, Sammelphase 20mA, Trennphase 50 mA).

3.4.4 Durchführung des Western-Blots

Das *Prinzip* des Western-Blots besteht darin, Proteine durch eine spezifische Antigen-Antikörperbindung nachzuweisen. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden hierfür auf eine Träger-Membran (PVDF) übertragen. Hierfür werden Filterpapier (BioRad), Schwämme (BioRad), Polyacrylamidgel und PVDF-Membran (Amersham Pharmacia Biotech) geschichtet und zusammengepresst. Dieses Paket wird zwischen die Elektroden einer Blotkammer (BioRad) gesteckt. Die zur Anode wandernden Proteine werden von der direkt anliegenden PVDF-Membran auf der Oberfläche gebunden und können dort von Antikörpern detektiert werden.

Der immunologische Nachweis des Proteins verläuft in zwei Schritten. Als erstes wird das nachzuweisende Protein mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, der mit diesem einen Komplex bildet. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem gegen den 1. Antikörper gerichteten Zweitantikörper, der somit den Antigen-Antikörperkomplex identifiziert. Die Detektion erfolgt mittels Chemilumineszenz, da am 2. Antikörper ein Enzym gekoppelt ist, das die Oxidation von Luminol (Enhanced Chemiluminescence, ECL) unter Lichtemission katalysiert. Dieses ermöglicht die Belichtung des Filmes oder die Auswertung mittels einer lichtempfindlichen Kamera.

Die *Durchführung* des Western-Blots erfolgte, indem zunächst die Gele für 20 Minuten in 200ml Transferpuffer unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur äquilibriert wurden. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, 5 Minuten in Aqua bidest gewaschen und 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert.

Der Transfer der Proteine erfolgte über Nacht bei einer konstanten Spannung von 15 V und einer Temperatur von 4 °C. Im Anschluss an den Transfer wurde eine Kontrollfärbung des Gels durchgeführt. Das Gel wurde mit Isopropanol-Fixierlösung fixiert, mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung behandelt, wodurch sich im Gel zurückgebliebene Proteine darstellen ließen. Parallel dazu wurde die Membran mit Milchprotein blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Dazu wurde die Membran in PBS / Tween mit 15 % Magermilchpulver für zwei Stunden bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Nach dem Blockieren wurde die Membran zweimal für 5 Minuten mit PBS/Tween-Lösung gewaschen.

Danach erfolgte die Detektion der Proteine. Als Primär-Antikörper wurden folgende Antikörper eingesetzt: Anti-p53-Antikörper aus der Maus (Clone DO-7, Novo Castra, Konzentration 1:1500 in 5% Magermilchpulver-PBS/Tween), Anti-p21-Antikörper aus der Maus (WAF 1 (Ab-1), Oncogene Research, Konzentration 1:250 in 5% Magermilchpulver-PBS/Tween) und Anti- β -Actin-Antikörper aus der Maus (Clone AC-15, Sigma, Konzentration 1: 4000 in 5% Magermilchpulver-PBS/Tween). Als Sekundär-Antikörper wurde ein Anti-Maus-IgG-Antikörper (Amersham, Konzentration 1:4000 in 5% Magermilchpulver-PBS/Tween) eingesetzt.

Die Membran bzw. der jeweils interessante Bereich wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln in 12-15ml Primär-Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran in PBS/Tween viermal für 15 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Der ECL-Marker (Amersham Pharmacia Biotech) wurde mit Avidin-HRP-Konjugat (BioRad, Konzentration 1:20000 in PBS/Tween) inkubiert. Nach dem erneuten Waschen mit PBS/Tween (4x15 min) wurde die Membran mit 6 ml ECL-Reagenz (Lösung 1 und Lösung 2, Mischungsverhältnis 1:1) überschichtet, für 1 Minute inkubiert und nach dem Abtropfen des Reagenz in Folie eingeschweißt. Anschließend wurden lichtempfindliche Filme (ECL-Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) mit der Membran exponiert, bzw. erfolgte die Auswertung über eine lichtempfindliche Kamera (Night Owl, Berthold/Winlight Software).

Zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Geltaschen wurde β -Actin auf derselben Membran nachgewiesen. β -Actin ist ein konstitutiv exprimiertes Strukturprotein, das nach Bestrahlung keine Induktion zeigt. Hierfür wurde die Membran nach der ersten ECL-Reaktion (p53/p21) mit PBS/Tween für 2x10 Minuten gewaschen und über Nacht in 100ml PBS/Tween mit 15% Magermilchpulver bei 4°C erneut blockiert. Danach wurde 2x10 Minuten mit PBS/Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem Anti- β -Actin-Antikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren Waschgängen und der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgte die ECL-Reaktion.

Die Zuordnung der Proteinsignale zu den jeweiligen Proteinen konnte anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden. Das p21-Protein war bei 21 kDa, das p53-Protein bei 53 kDa und das β -Actin-Protein bei 45 kDa lokalisiert.

3.4.5 *Auswertung der Proteinsignale*

Für die Auswertung der Proteinsignale wurde die Intensität der Chemilumineszenz mittels einer lichtempfindlichen Kamera (Night Owl, Berthold/Winlight Software) aufgenommen und bestimmt. Dafür wurden identisch große Rahmen um die einzelnen Proteinsignale sowie um den entsprechenden Hintergrund gelegt, in denen die abgegebene Lichtemission pro Fläche bestimmt wurde. Das stärkste Signal wurde mit 100% angegeben.

Um eine Vergleichbarkeit der Proteinbandensignale zu erreichen, wurden folgende Korrekturberechnungen durchgeführt. Die Signale wurden um das Hintergrundsignal korrigiert. Zur Berücksichtigung unterschiedlicher Gelbeladungen wurden anschließend die korrigierten Signale durch die entsprechenden korrigierten β Actin-Signale dividiert.

4 Resultate

4.1 Wachstumskinetik

Das Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten wurde mit Hilfe einer Wachstumskurve der Normalfibroblasten HSF1 bestimmt. Hierfür wurden $2,2 \times 10^5$ Zellen pro Zellkulturflasche (25 cm^2) angesetzt. Im Abstand von 24 Stunden wurde die Zellzahl bestimmt.

Abbildung 5 zeigt die Wachstumskinetik der humanen Normalfibroblasten HSF1. In den ersten 4 Tagen nimmt die Zellzahl nahezu exponentiell zu. Ab dem 5. Tag ist ein verlangsamtes Wachstum zu verzeichnen. Ab dem 6. Tag bleibt die Zellzahl relativ konstant, bzw. nimmt nur noch geringfügig zu. Die eingestellte Zellteilung wird als sogenannte Plateau-Phase bezeichnet. Diese wird infolge der Kontaktinhibierung ab einer bestimmten Zelldichte hervorgerufen.

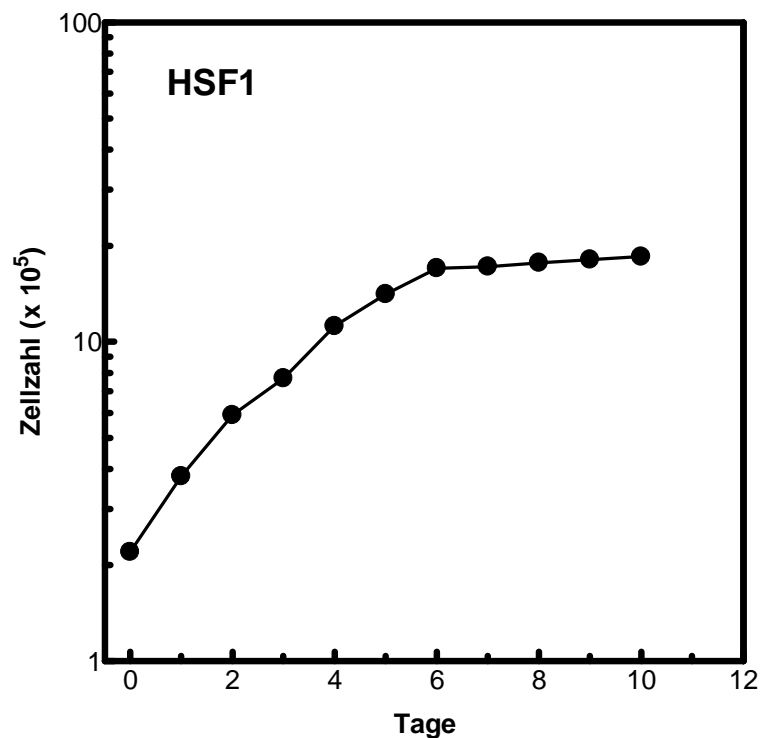


Abb.5: Wachstumskinetik humaner Normalfibroblasten (HSF1)

Es wurden $2,2 \times 10^5$ HSF1-Fibroblasten zum Zeitpunkt 0 ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte anschließend alle 24 h.

4.2 Immunologischer Nachweis von p53 und p21

Der Nachweis des p53- sowie des p21- Proteins mittels Western-Blot wurde in diesem Labor neu etabliert. Die Wahl der Antikörper erfolgte in Anlehnung an Böhnke et al., (2004).

Um eine optimale Proteindetektion zu gewährleisten, wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen ausgetestet. Hierzu wurden Western-Blots mit HSF1-Zellextrakten durchgeführt, die entweder aus unbestrahlten HSF1-Zellen oder 3h nach Bestrahlung mit 15 Gy hergestellt wurden. Die nach dem Blot auf die Membran transferierten Proteine wurden mit p53-Antikörperkonzentrationen von 1:1000, 1:1500 und 1:2000 detektiert (Abb.6). Für den Nachweis des p21-Proteins wurden p21-Antikörperkonzentrationen von 1:100, 1:250 und 1:500 eingesetzt (Abb.6).

Die besten Ergebnisse in Form eines scharf begrenzten Proteinsignals zeigten sich für p53 bei einer Antikörperkonzentration von 1:1500, für p21 bei einer Konzentration von 1:250. Bei höheren Antikörperkonzentrationen kam es zu einer Zunahme des Untergrundsignals, bei niedrigeren Konzentrationen war die Signalstärke sehr schwach.

Die mit 15 Gy bestrahlten Proben zeigen für p53 aufgrund der strahleninduzierten Akkumulation ein stärkeres Signal als die unbestrahlten Proben, beim p21-Signal sind zu diesem Zeitpunkt keine deutlichen Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben erkennbar.

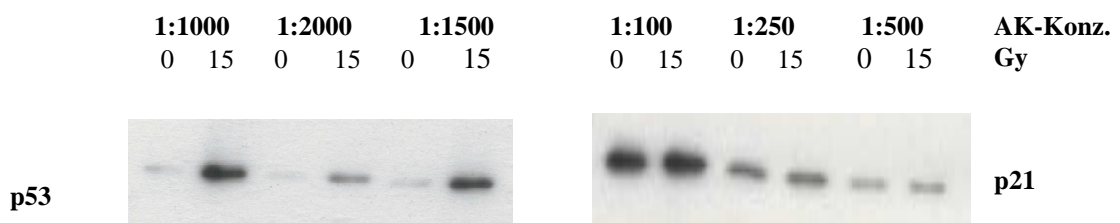


Abb.6: Optimierung der Konzentration des Primär-Antikörpers gegen p53 und p21

Gesamtzellextrakte (20 µg) von unbestrahlten und mit 15 Gy/3h bestrahlten HSF1-Zellen wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Tank-Blot auf eine Trägermembran übertragen. Der p53-Nachweis erfolgte mit dem Klon DO-7 in einer Konzentration von 1:1000, 1:1500 und 1:2000. Der p21-Nachweis wurde mit dem Klon Ab-1 in den Konzentrationen 1: 100, 1: 250 und 1: 500 durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper sowie die Detektion mittels Chemilumineszenz.

4.3 Reproduzierbarkeit des Proteinnachweises

4.3.1 Vergleich der Proteinsignale nach mehrfacher Messung desselben Proteinextraktes

Unabhängige Doppelbestimmungen desselben Proteinextraktes wurden zum Ausschluss größerer methodischer Variationen durchgeführt. Hierzu wurden jeweils unbestrahlte Extrakte aus unterschiedlichen humanen Fibroblasten-Zelllinien verwendet und die p21-/p53-Proteinsignale mit Hilfe des Western-Blots bestimmt. Die um den Hintergrund und die Gelbeladung korrigierten Ergebnisse für das p53- (Abb.7A) und das p21-Protein (Abb.7B) der zwei Versuche wurden gegeneinander aufgetragen.

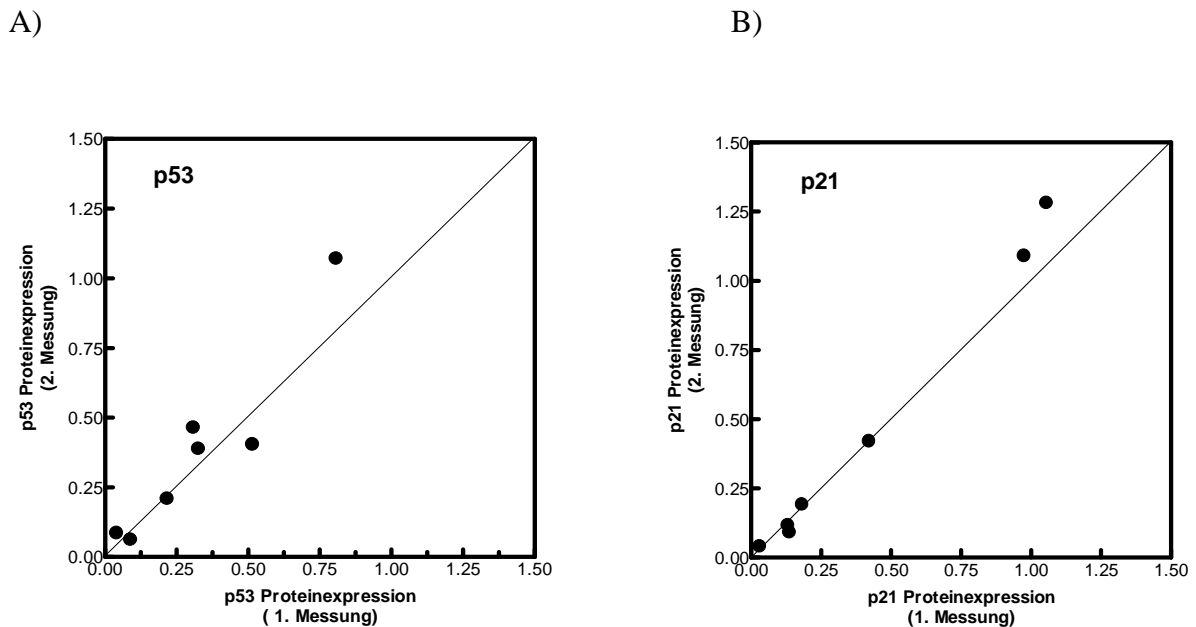


Abb.7: Reproduzierbarkeit des Proteinnachweises – Doppelbestimmung desselben Proteinextraktes

20 µg Gesamtzellextrakt unbestrahlter humaner Fibroblasten (AF 2,3,4,6,7,9,11) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine p53 (A) und p21(B) mittels Western-Blot nachgewiesen. Gegeneinander aufgetragen sind die Ergebnisse zweier Messungen jeweils desselben Proteinextraktes.

Die Ergebnisse der beiden Messungen zeigen für das p53-Protein jeweils nur geringe Abweichungen. Es wird deutlich, dass bei geringen, bzw. großen Proteinmengen in der 1. Messung auch geringe, bzw. große Mengen in der 2. Messung ermittelt wurden. Der Nachweis von p53 ist demnach gut reproduzierbar. Beim p21-Nachweis sind die Werte der 1. und 2. Messung nahezu identisch und liegen auf der entsprechenden Linie, wodurch die gute

Reproduzierbarkeit bestätigt wird. Methodische Schwankungen bezüglich der Durchführung des Western-Blots konnten daher als minimal eingeschätzt werden.

4.3.2 Vergleich der Proteinsignale zweier unabhängiger Extraktionen

Die Reproduzierbarkeit der mittels Western-Blot gewonnenen Daten wurde weiterhin überprüft, indem 2 unabhängige Proteinextrakte derselben Normalfibroblasten (unbestrahlt) in der Plateau-Phase hergestellt und die Proteine mittels Western-Blot nachgewiesen wurden.

Die Signale des p53-Proteins der 1. Extraktion und die der 2. Extraktion wurden gegeneinander aufgetragen (Abb.8). Auch hier zeigt sich die Tendenz, dass bei einer geringen Proteinmenge in der 1. Messung ein ähnlich niedriger Wert in der 2. Messung und umgekehrt festgestellt werden konnte. Es zeigten sich jedoch größere Abweichungen als bei 4.3.1, die auf biologische Schwankungen oder methodische Schwankungen während der Extraktpräparation hindeuteten. Die Reproduzierbarkeit der Extraktionen sollte bei Mehrfachansätzen nach Mittelung jedoch ausreichend sein. Für p21 zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

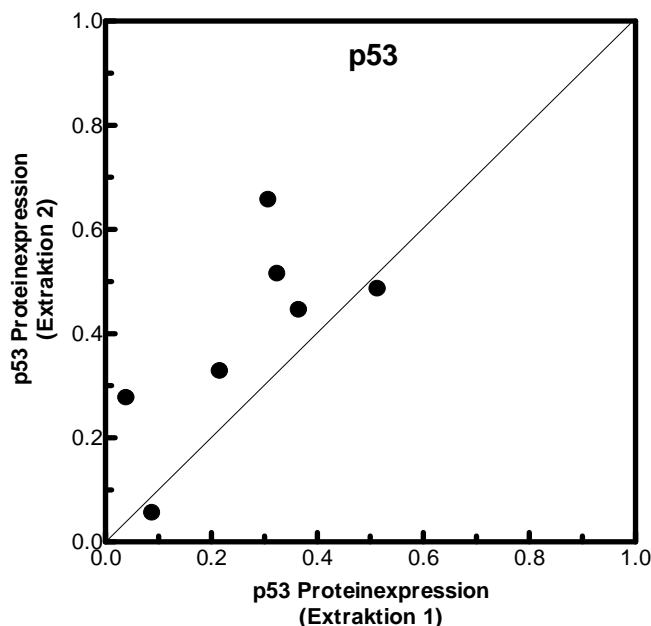


Abb.8: Reproduzierbarkeit des Proteinnachweises, unabhängige Extraktionen derselben Zelllinien

20 µg Gesamtzellextrakt unbestrahlter humaner Fibroblasten (AF 2,3,4,6,9,11,12) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein p53 mit Western-Blot nachgewiesen. Gegeneinander aufgetragen sind die Ergebnisse der Messungen jeweils zweier unabhängiger Extraktionen derselben Zelllinie.

4.4 Basallevel von p53 und p21 in humanen Fibroblasten

Der Basallevel der p53-/p21-Proteinexpression wurde mittels Western-Blot von 10 verschiedenen unbestrahlten humanen Fibroblastenzelllinien bestimmt. Hierzu wurden jeweils zwei unabhängige Extrakte eingesetzt. Die um die Gelbeladung (β -Actin) korrigierten Ergebnisse der beiden Versuche wurden gemittelt und in Abb.9 dargestellt.

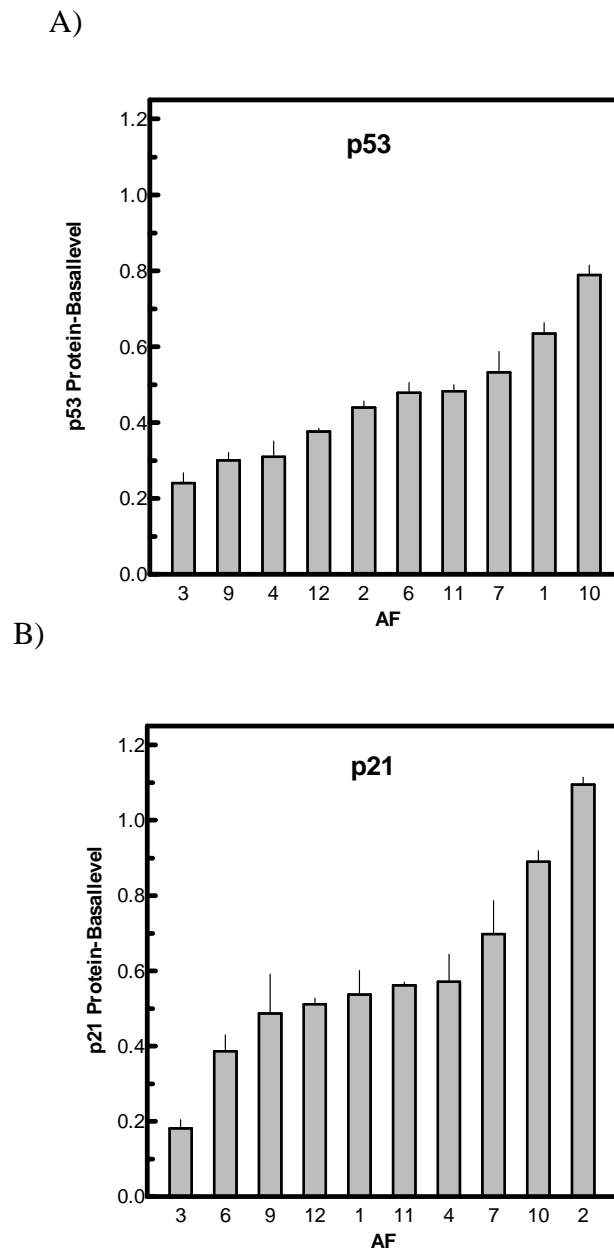


Abb.9: Basallevel von p53 (A) und p21 (B) in humanen Fibroblasten

Je 20 μ g Gesamtzellextrakt unbestrahlter Fibroblasten (AF 1,2,3,4,6,7,9,10,11,12) wurden eingesetzt. p53 (A) und p21 (B) wurden mittels Western-Blot detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden nach zunehmender Signalstärke sortiert.

Bei der Ausprägung des p53-Basalgehaltes gab es deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien. Den niedrigsten relativen p53-Proteingehalt hatte die Zelllinie 3 mit 0,24, den höchsten die Zelllinie 10 mit 0,79. Die Werte des p53-Basallevels variierten demnach um den Faktor 3,3.

Der p21-Basalgehalt variierte ebenfalls erheblich. Den niedrigsten Wert hatte ebenfalls die Zelllinie 3 mit einem relativen Wert von 0,19, den höchsten die Zelllinie 2 mit 1,1. Die Werte zeigten Unterschiede um den Faktor 5,8. Es wird deutlich, dass große Unterschiede in der Ausprägung des p53-Basalgehaltes und noch stärkere des p21-Basalgehaltes zwischen den verschiedenen Zelllinien bestehen.

Die in Abbildung 9 A und B dargestellten Basallevel von p53 und p21 in den verschiedenen Fibroblasten wurden anschließend gegeneinander aufgetragen (Abb.10). Generell haben die Zelllinien mit hohem p53-Proteingehalt auch einen höheren p21-Proteingehalt und umgekehrt, was auf eine gegenseitige Regulation auch im unbestrahlten Zustand hindeutet. Einzige Ausnahme bildet die Zelllinie 2, die einen wesentlich höheren Gehalt an p21 als p53 besitzt. Die Daten zeigen, dass das Ausmaß der p53- und der p21-Proteinexpression in unbestrahlten Fibroblasten miteinander korreliert.

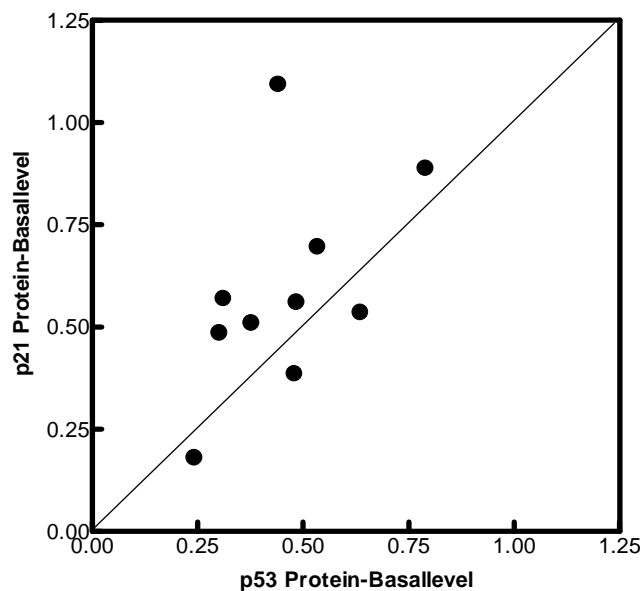


Abb.10: Korrelation zwischen dem p53- und dem p21-Basallevel

Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse der p53- /p21-Proteinexpression wurden hier gegeneinander aufgetragen.

4.4.1 Zusammenhang zwischen dem p53- und p21-Proteinbasallevel und der Ausprägung des G1-Arrests

Die Auslösung des G1-Arrests nach Bestrahlung ist p53- und p21-abhängig. Es sollte überprüft werden, ob der Basallevel dieser Proteine mit der Ausprägung des G1-Arrests korreliert. Hierzu wurden bisher unveröffentlichte Daten von Herrn Dr. Brammer (Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie, UKE) herangezogen. Beide Parameter wurden gegeneinander aufgetragen (Abb. 11)

Sowohl für p53 als auch für p21 war lediglich eine diffuse Verteilung der Werte erkennbar, die eine Korrelation zwischen p53-/p21-Basallevel und dem Ausmaß des G1-Arrests (als Anteil der in G1 arretierten Zellen) ausschließt.

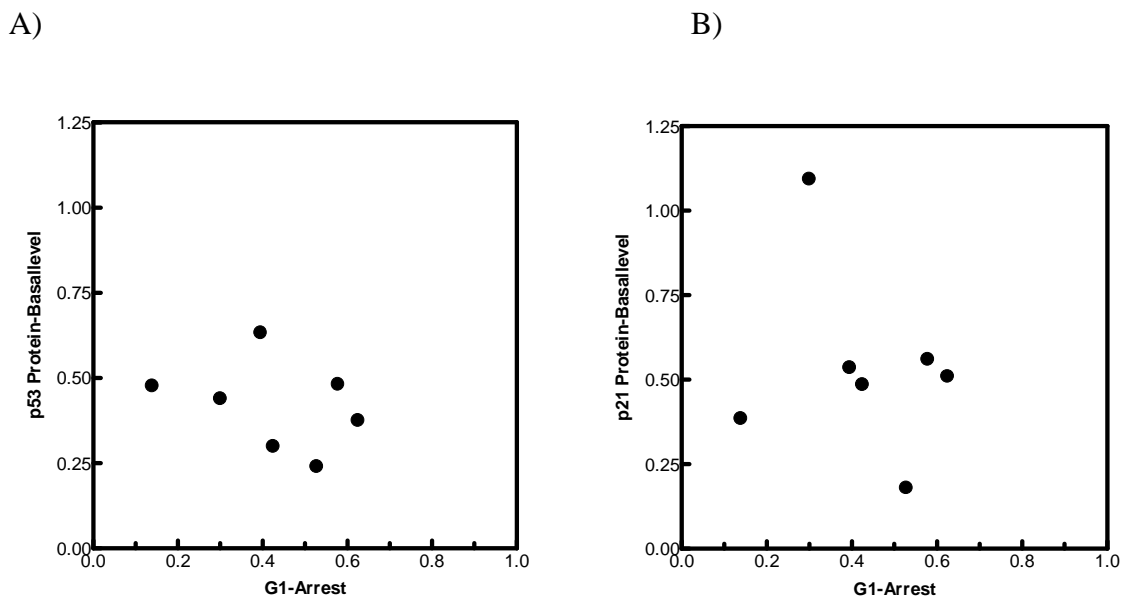


Abb.11: Zusammenhang zwischen dem p53- (A), bzw. p21- (B) Proteinbasallevel und der Ausprägung des G1-Arrests in humanen Fibroblasten

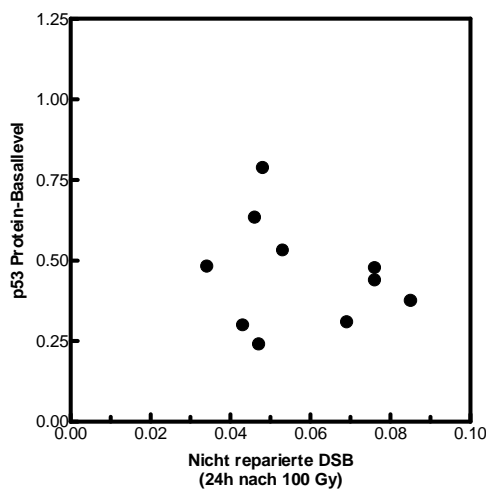
Die in Abb. 9 ermittelten Daten des p53-Basallevels (A) und des p21-Basallevels (B) wurden gegen die Ausprägung des G1-Arrests (als Anteil der in G1 arretierten Zellen) aufgetragen (Brammer et al., unveröffentlicht; Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie, UKE).

4.4.2 Zusammenhang zwischen dem p53- und p21-Proteinbasallevel und der DSB – Reparaturkapazität

Für die hier untersuchten humanen Fibroblastenlinien wurden zuvor bereits deutliche Unterschiede in der Reparaturkapazität für DSBS über die Anzahl nicht reparierter DSBS nach Bestrahlung mit 100 Gy und 24 h Reparaturzeit festgestellt. Die Angaben der nicht reparierten DSBS schwanken zwischen 0,034 und 0,085 (relative Einheit) (Dikomey et. al., 2000). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem p53- bzw. p21-Proteinbasallevel und der Anzahl der nicht reparierten DSBS zu überprüfen, wurden beide Parameter der jeweiligen Zelllinien gegeneinander aufgetragen (Abb.12).

Es zeigt sich eine diffuse Verteilung, so dass weder eine Korrelation zwischen dem p53-Proteinbasallevel (A) noch zwischen dem p21-Proteinbasallevel (B) und der DSB-Reparaturkapazität angezeigt wird.

A)



B)

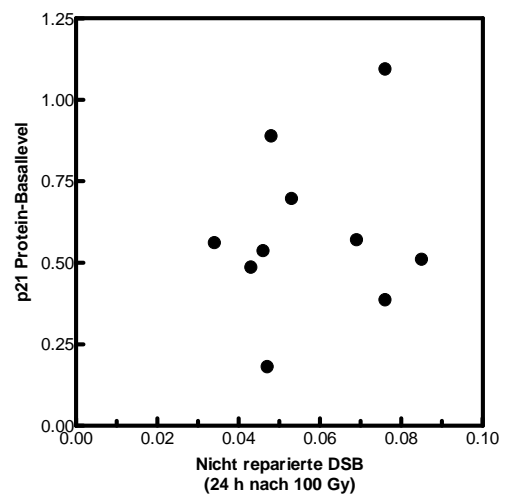


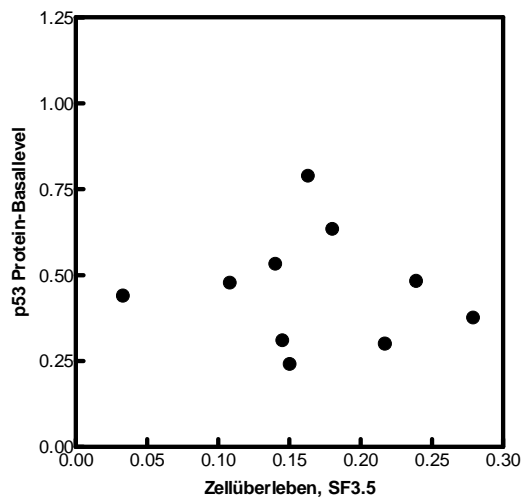
Abb.12: Zusammenhang zwischen dem p53- (A) bzw. dem p21- (B) Proteinbasallevel und der Anzahl nicht reparierter DSB in humanen Fibroblasten

Die in Abb.9 ermittelten Daten des p53-Basallevels (A) und des p21-Proteinbasallevels (B) wurden gegen die Anzahl der nicht reparierten DSBS aufgetragen (Dikomey et al., 2000; nicht reparierte DSBS 24h nach Bestrahlung mit 100 Gy / Nachweis über KFGE).

4.4.3 Zusammenhang zwischen dem p53- und p21-Proteinbasallevel und dem Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy

Die hier untersuchten humanen Fibroblastenlinien unterscheiden sich auch deutlich in ihrer SE. Dikomey et al. (2000) stellten eine Variation in der Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit 3,5 Gy (SF 3,5) zwischen 0,03 und 0,28 fest. Zur Klärung eines eventuell bestehenden Zusammenhanges zwischen dem Ausmaß der SE und dem p53- und p21-Proteinbasallevel wurden die Daten des Zellüberlebens (Dikomey et al., 2000) gegen die in dieser Arbeit ermittelten Daten des p53- bzw. p21-Proteinbasallevels aufgetragen (Abb.13).

A)



B)

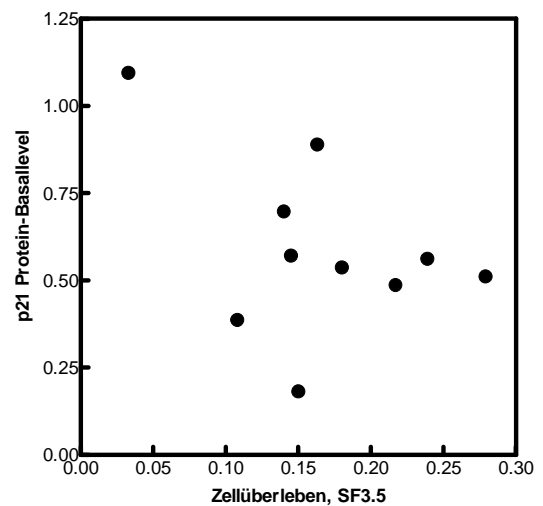


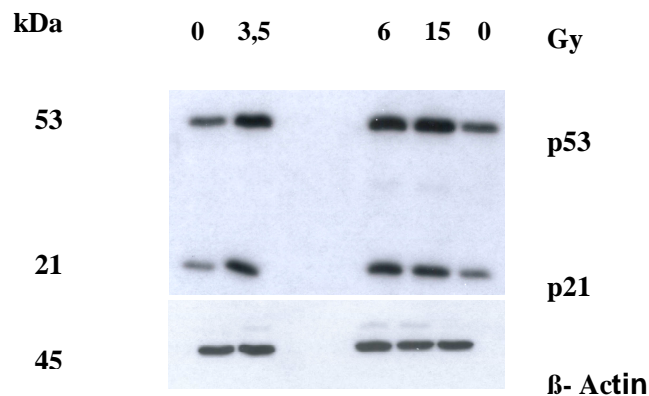
Abb.13: Zusammenhang zwischen dem p53- (A), bzw. dem p21- (B) Proteinbasallevel und dem Zellüberleben (nach 3,5 Gy) humaner Fibroblasten

Die in Abb. 9 ermittelten Daten des p53- (A) und des p21- (B) Proteinbasallevels wurden gegen die Daten des Zellüberlebens nach Bestrahlung mit 3,5 Gy aufgetragen (Dikomey et al., 2000; ermittelt mittels Koloniebildung).

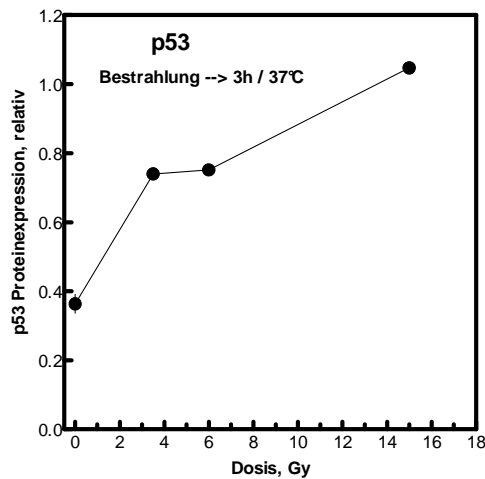
Die Gegenüberstellung der Daten ergibt sowohl für p53 als auch für p21 eine Punktwolke, so dass eine Korrelation zwischen dem p53- (A), bzw. p21- (B) Proteinbasallevel und dem Zellüberleben humaner Fibroblasten auszuschließen ist.

4.5 Stabilisierung, bzw. Induktion des p53- und p21-Proteins in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Das Ausmaß der strahleninduzierten p53-Stabilisierung, bzw. der p21-Induktion sollte für humane Fibroblasten ermittelt werden. Hierzu wurden Extrakte von HSF1-Zellen, 3h nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (0, 3,5 , 6 und 15 Gy) angefertigt und die p53- bzw. p21-Proteinexpression mittels Western-Blot nachgewiesen (Abb.14). Das p53-Signal zeigte einen dosisabhängigen Anstieg. In unbestrahlten Zellen ergab sich ein relativer Wert von 0,35, nach Bestrahlung mit 3,5 Gy von 0,7, mit 6 Gy von 0,75 und mit 15 Gy von 1,05 (Abb.14B). Die Proteinmenge hat demnach durch die Bestrahlung mit 15 Gy um Faktor 3 zugenommen. Die p21-Expression nahm nach Bestrahlung mit bis zu 6 Gy zu (Faktor 2,3), die höhere Bestrahlungsdosis von 15 Gy bewirkte keinen weiteren Anstieg (Abb.14A und C). Sowohl bei p53 als auch bei p21 ist nach Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy eine deutliche Proteinzunahme feststellbar, so dass alle weiteren Versuche dieser Arbeit mit einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy durchgeführt wurden.



B)



C)

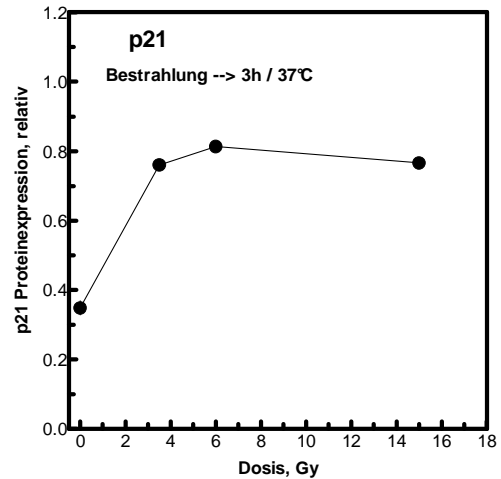


Abb.14: p53- und p21- Proteinexpression in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

In Abb.14A wurden 20 µg Gesamtextrakt aus unbestrahlten HSF1 oder hergestellt 3h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (3,5, 6, 15 Gy) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und p53 und p21 mittels Western-Blot nachgewiesen. Die in Abbildung 14A ermittelte p53- (B) und p21-(C) Proteinexpression wurde ausgewertet, um den Untergrund / die Gelbeladung korrigiert und in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis aufgetragen.

4.6 Kinetik der p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten

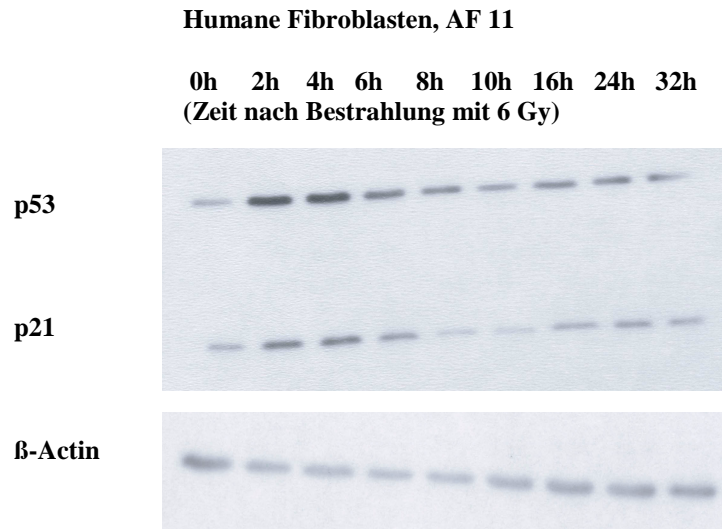
4.6.1 p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung: Langzeitkinetik

Das Ausmaß der p53- bzw. p21-Proteinexpression sowie der Zeitpunkt der maximalen p53-Akkumulation, bzw. p21-Induktion nach Bestrahlung sollten für humane Fibroblasten bestimmt werden. Hierzu wurden Extrakte der verschiedenen Zelllinien nach Bestrahlung mit 6 Gy im Zeitraum von 0-32h hergestellt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine p53 und p21 mittels Western-Blot detektiert. In Abbildung 15 ist die Expression von p53 und p21 nach Bestrahlung exemplarisch für zwei Zelllinien dargestellt (AF 11 (A), AF 7 (B)), um die deutlichen Unterschiede in der Expressionskinetik zwischen den verschiedenen Zelllinien aufzuzeigen.

Bei der Zelllinie AF 11 ist eine deutliche p53-Akkumulation 2-4h nach Bestrahlung festzustellen, die danach wieder langsam abnimmt (Abbildung 15A, oben). Für das p21-Protein ist ebenfalls eine Induktion 2-4h nach Bestrahlung zu beobachten, die sich anschließend wieder verringert (Abbildung 15A, mittig).

Im Gegensatz zur Zelllinie AF 11 ist bei der Zelllinie AF 7 kaum ein Anstieg in der p53 / p21-Signalstärke zu erkennen (Abbildung 15B).

A)



B)

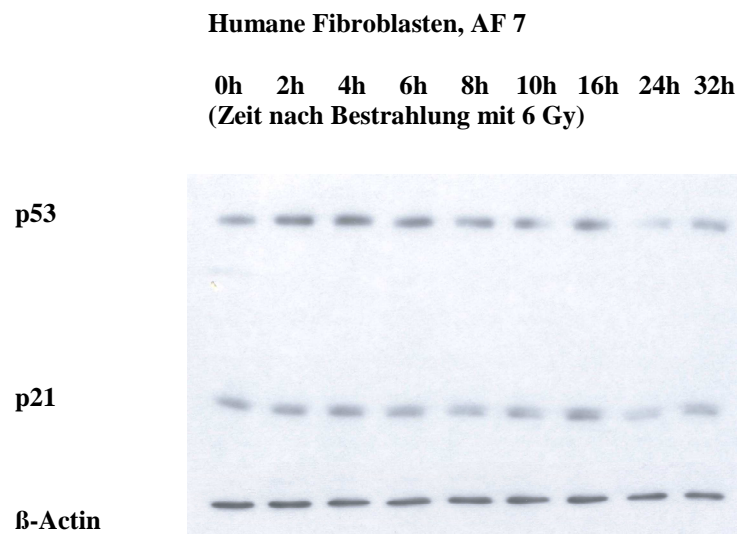


Abb.15: Kinetik der p53- und p21-Proteinexpression nach Bestrahlung

Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt und Extrakte im Zeitraum zwischen 0-32h danach angefertigt. 20 μ g Gesamtextrakt wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und p53 und p21 mittels Western-Blot nachgewiesen. Abbildung A und B zeigen die p53- und p21-Proteinexpression im Western-Blot der Zelllinie AF 11 (A) und der Zelllinie AF 7 (B).

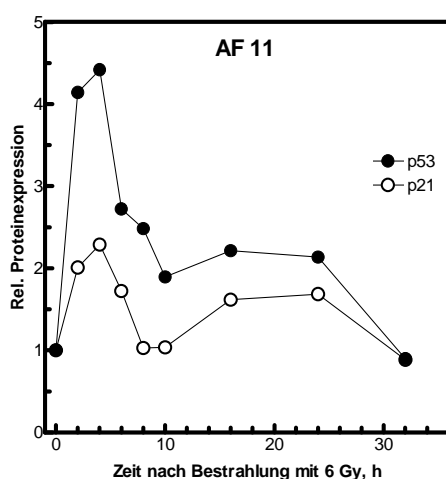
Um bei der Auswertung das Ausmaß der Proteininduktion besser vergleichen zu können, wurden die 0h-Werte auf 1 normiert. Die Abbildungen 16A/B zeigen die korrigierte Auswertung der Proteinsignale aus Abb. 15A/B. Die Auswertung der Signale der Zelllinie AF 11 (Abbildung 16A) zeigt eine deutliche Akkumulation des p53-Proteins nach 2h, das Maximum (Faktor 4,4) wird 4h nach Bestrahlung erreicht. Im weiteren Verlauf nimmt die p53-Proteinakkumulation ab und beträgt 10h nach Bestrahlung nur noch das ca. 2fache des Ausgangswertes. Es folgt eine langsame Abnahme, nach 24h ist die p53-Proteinexpression auf den Kontrolllevel (0h) abgesunken.

Die Kinetik der p21-Proteinexpression verläuft parallel zur p53-Kinetik. Lediglich das Ausmaß der relativen Proteinexpression fällt geringer aus. Das Maximum tritt 4 h nach Bestrahlung mit dem 2,3 fachen des Ausgangswertes auf.

In Abbildung 16B ist die Kinetik der p53- / p21-Proteinexpression der Zelllinie AF 7 dargestellt. Auffällig ist hier die im Gegensatz zur Zelllinie AF 11 relativ geringe Proteinakkumulation um den Faktor 1,6 (p53), bzw. 1,35 (p21).

Es wird deutlich, dass das Maximum der p53-Akkumulation und auch der p21-Induktion ca. 4h nach Bestrahlung auftritt. Für weitere Experimente wurde daher der Zeitraum 0-6h nach Bestrahlung gewählt.

A)



B)

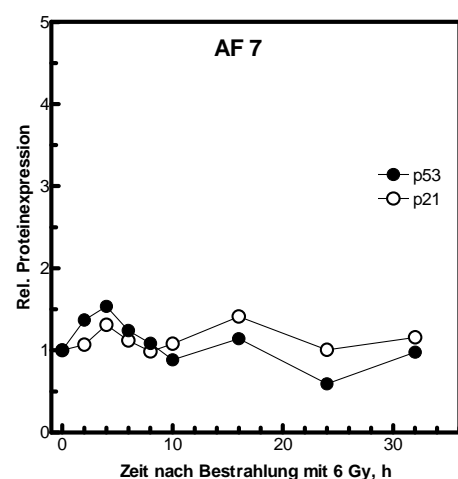
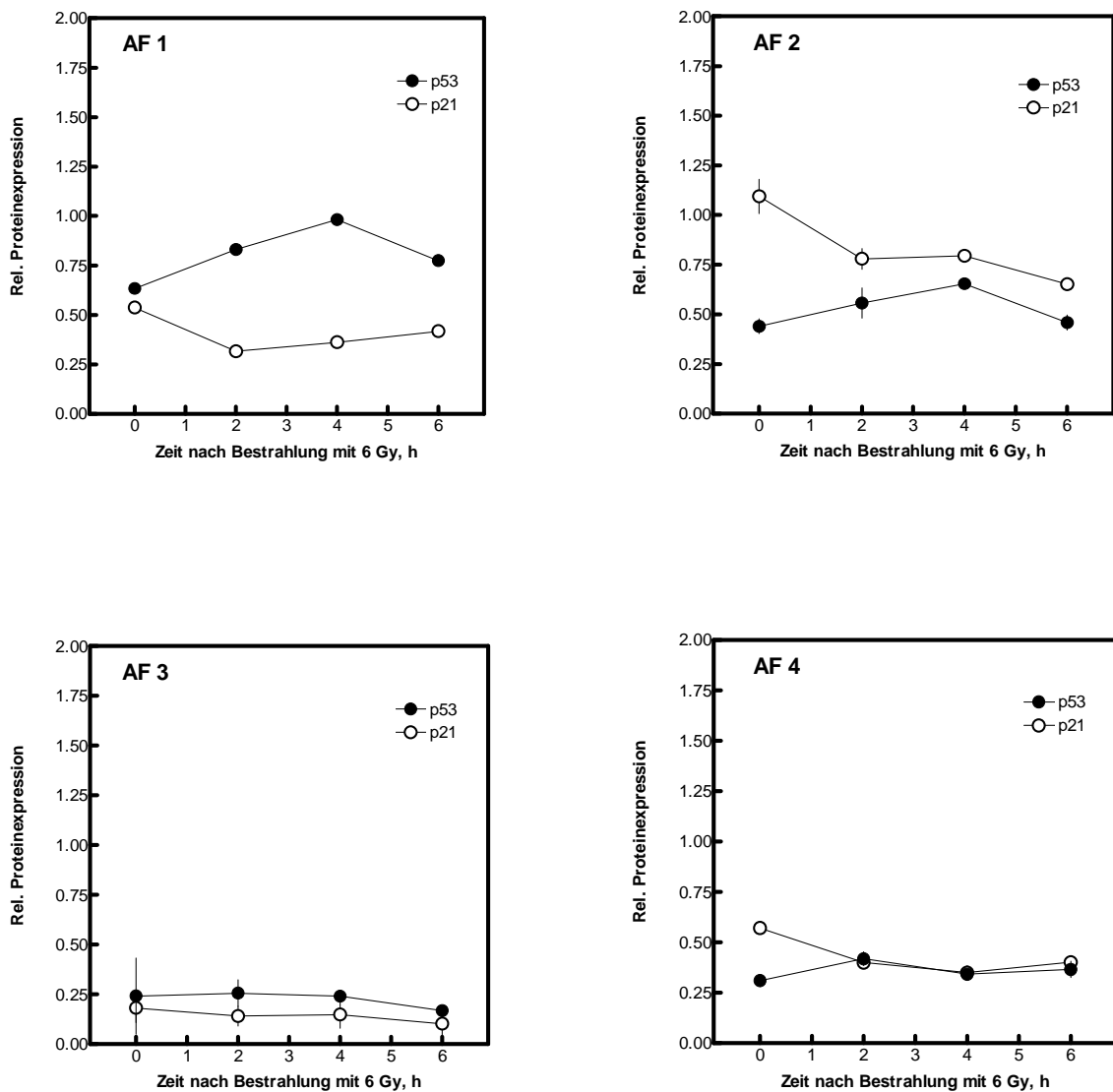


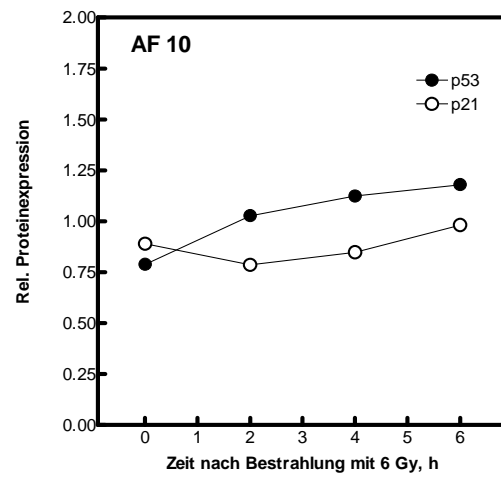
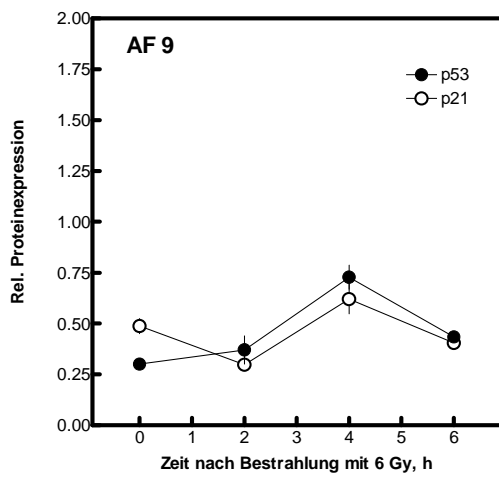
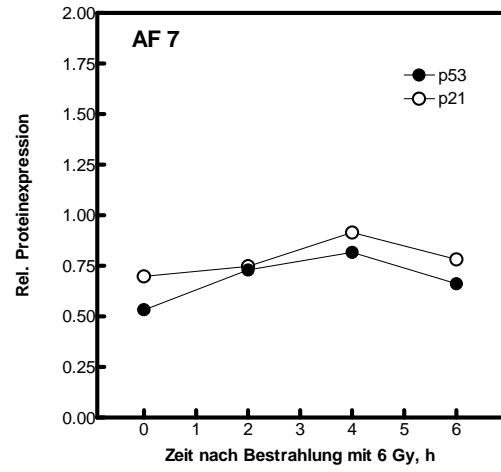
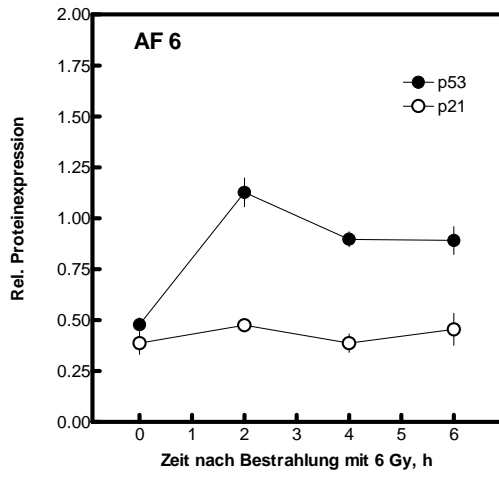
Abb.16: Kinetik der p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung

In Abbildung A (AF 11) und B (AF 7) ist die Auswertung der in 15A und B gezeigten Signale nach Actin-Korrektur und Normierung auf 1 dargestellt.

4.6.2. p53- und p21- Proteinexpression nach Bestrahlung: Kurzzeitkinetik

Wie in 4.6.1 dargestellt, ist festzustellen, dass sowohl die maximale p53-Akkumulation als auch die maximale p21-Induktion ca. 4h nach Bestrahlung auftritt. Nachfolgend wurde für alle untersuchten Fibroblastenzelllinien die p53- / p21-Proteinexpression im Zeitraum 0-6h nach Bestrahlung mit 6 Gy bestimmt. Die jeweiligen Proteinextrakte der 10 unterschiedlichen Zelllinien wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Proteine mittels Western-Blot detektiert. Es erfolgte keine Normierung auf 1, um Unterschiede der Basallevel zu erkennen. Die Kinetiken der p53- / p21-Proteinexpression aller Zelllinien sind in Abbildung 17 dargestellt.





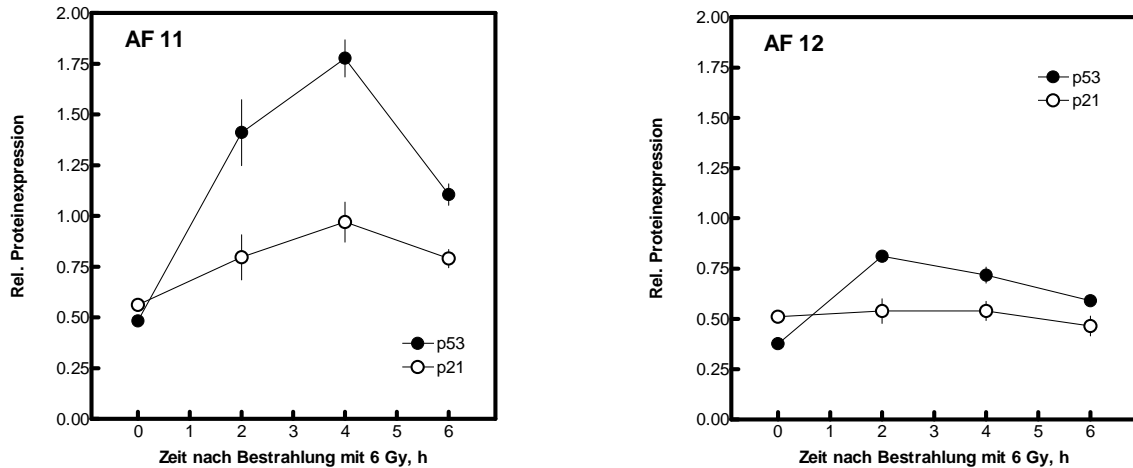


Abb.17: Kinetik der p53- / p21-Proteinexpression nach Bestrahlung in 10 verschiedenen Fibroblastenlinien

Die Zellen (AF1,2,3,4,6,7,9,10,11,12) wurden mit 6 Gy bestrahlt und Extrakte im Zeitraum zwischen 0-6h danach angefertigt. 20µg Gesamtextrakt wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und p53 und p21 mittels Western-Blot nachgewiesen. Auswertung der um Untergrund / Gelbeladung korrigierten Daten von 2 unabhängigen Experimenten.

Es zeigen sich große Unterschiede im Ausmaß der p53-/p21-Proteinexpression sowie dem Verlauf der Kinetik zwischen den verschiedenen Zelllinien. Bei einigen Zelllinien kommt es zu einer starken Akkumulation / Induktion beider Proteine (AF 11), bei anderen ist ein konstanter Verlauf ohne relativen Anstieg der Proteinexpression zu beobachten (AF 3, AF 4). Die Signale wurden nicht normiert, um Unterschiede im Basallevel erkennen zu können. Bei einigen Zelllinien zeigen die p53- und p21-Proteinbasallevel eine ähnlich starke Expression (AF 1, AF 3, AF 6, AF 10, AF 11), bei den Zelllinien AF 2, AF 4, AF 7, AF 9 und AF 12 sind größere Unterschiede zwischen dem p53-/p21-Basallevel festzustellen. Auffällig hierbei ist, dass der p21-Basallevel stets über dem p53-Basallevel liegt. Am ausgeprägtesten ist dieser Unterschied bei der Zelllinie AF 2. Das Maximum der Proteinexpression variiert ebenfalls zwischen den verschiedenen Zelllinien. Bei den Zelllinien AF 1, AF 7, AF 9, AF 11 findet sich das Maximum der p53-Proteinexpression nach 4 h, während bei den Zelllinien 6 und 12 die p53-Akkumulation schneller verläuft und das Maximum nach 2h auftritt.

4.7 Ausmaß der p53- und p21-Proteinexpression nach Bestrahlung

4.7.1 Ausmaß der p53- und p21-Proteinexpression nach Bestrahlung

Um das Ausmaß der strahleninduzierten p53-Akkumulation / p21-Induktion der verschiedenen Zelllinien besser vergleichen zu können, wurden die Zeitpunkte mit der maximalen Proteinexpression (2h- und 4h-Werte) gemittelt. Abbildung 18A zeigt die Ergebnisse für p53, Abbildung 18B jene für p21.

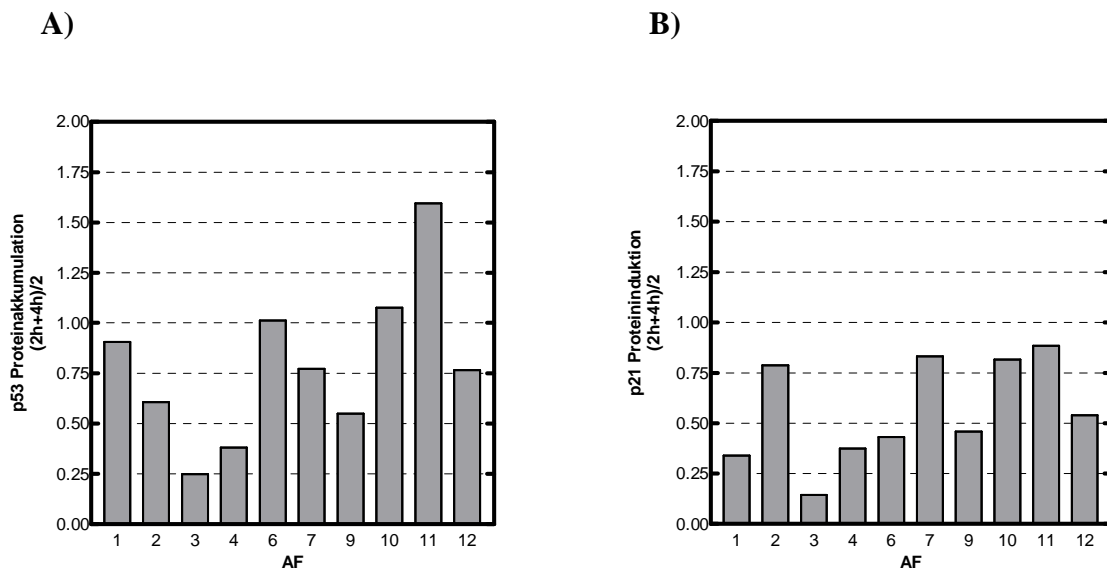


Abb.18: Variation der maximalen p53-Proteinakkumulation (A) und der maximalen p21-Protein- induktion (B) in humanen Fibroblasten nach Bestrahlung

Die Zellen (AF1,2,3,4,6,7,9,10,11,12) wurden mit 6 Gy bestrahlt und Extrakte im Zeitraum zwischen 0-6h danach angefertigt. 20µg Gesamtextrakt wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und p53 und p21 mittels Western-Blot nachgewiesen. Die Daten zeigen die aus den 2h + 4h-Signalen gemittelte Expression zweier unabhängiger Experimente.

Die Graphik zeigt, dass das Ausmaß der strahleninduzierten maximalen p53-Proteinakkumulation zwischen den verschiedenen Zelllinien deutlich unterschiedlich ist. Die geringste p53-Expression mit 0,25 (relative Einheit) zeigt die Zelllinie AF 3, während die stärkste Akkumulation mit 1,6 (relative Einheit) bei Zelllinie AF 11 festgestellt wird. Für p53 variiert dieses Maximum unter Berücksichtigung des jeweiligen Basalwertes zwischen Faktor 1 und 3,6. Bei der p21-Proteininduktion ist insgesamt ein geringerer absoluter strahleninduzierter Anstieg festzustellen. Die minimale p21-Expression mit 0,12 (relative Einheit) zeigt ebenfalls die Zelllinie AF 3, die maximale die Zelllinie AF 11 mit 0,82 (relative

Einheit). Für p21 variiert dieses Maximum unter Berücksichtigung des jeweiligen Basalwertes zwischen Faktor 1 und 1,5.

4.7.2 Korrelation zwischen der p53- und p21-Proteinexpression nach Bestrahlung

Es sollte überprüft werden, ob eine starke strahleninduzierte p53-Akkumulation ebenfalls mit einer starken p21-Induktion einhergeht (und umgekehrt). Dazu wurden die Ergebnisse aus Abb. 18 A und B gegenübergestellt (Abb. 18). Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen beiden Parametern (p53-Akkumulation und p21-Induktion) nach Bestrahlung mit 6 Gy zu erkennen. Bei starker p53-Proteinakkumulation ist auch eine ausgeprägte p21-Proteininduktion festzustellen, die die p53-abhängige p21-Regulation anzeigt.

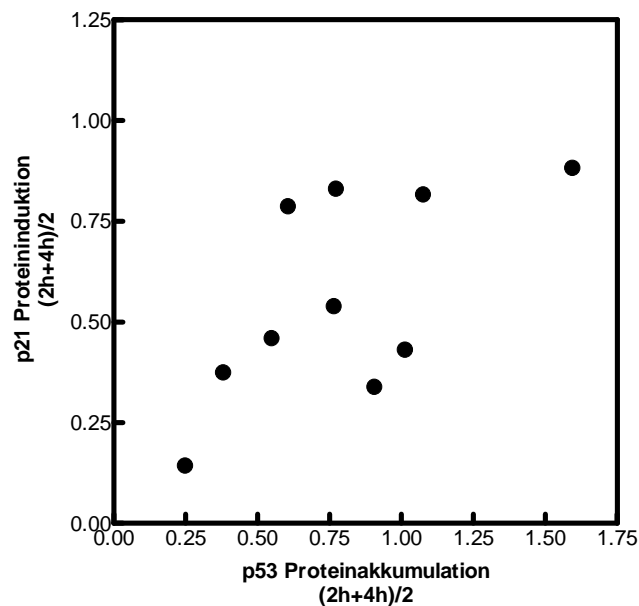


Abb.19: Zusammenhang zwischen der p53-Proteinakkumulation und der p21-Proteininduktion nach Bestrahlung

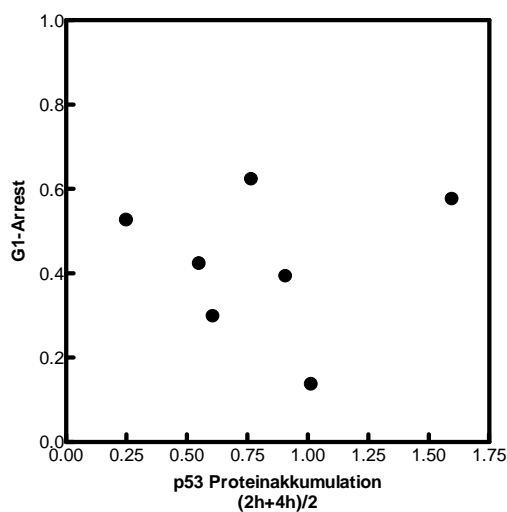
Die in Abbildung 18 ermittelten Ergebnisse der maximalen p53- / p21-Proteinexpression (2h+4h/2) wurden hier gegeneinander aufgetragen.

4.8 Bedeutung der strahleninduzierten p53-Proteinakkumulation und der p21-Proteininduktion

4.8.1 Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg der p53- und p21-Proteinexpression und der Ausprägung des G1-Arrests

Da sowohl p53 als auch p21 an der Auslösung des G1-Arrests beteiligt sind und sich die gewonnene Zeit für die DNA-Reparatur auf das Zellüberleben nach Bestrahlung auswirken kann (Stillman et al., 1994), wurden die hier ermittelten Daten der strahleninduzierten p53- und p21-Proteinakkumulation / -induktion mit dem zuvor ermittelten Ausmaß des strahleninduzierten G1-Arrestes (Daten von Herrn Dr. Brammer, Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie, unveröffentlicht) gegenübergestellt. Abb. 20 zeigt, dass es keine Korrelation zwischen der p53- / p21-Proteinmenge und dem Anteil der nach Bestrahlung in der G1-Phase arretierten Zellen gibt.

A)



B)

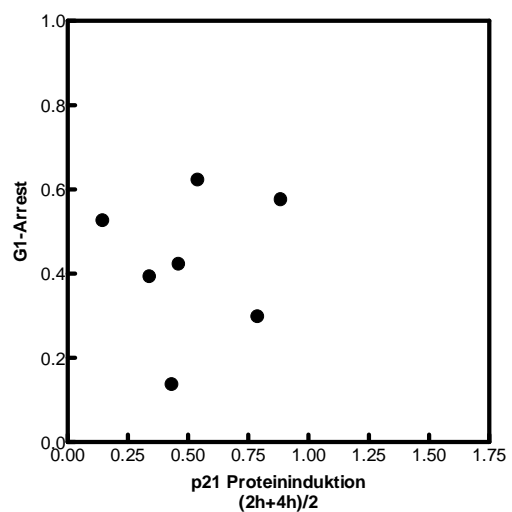


Abb. 20: Zusammenhang zwischen dem strahleninduziertem Anstieg des p53- (A), bzw. des p21-Proteinlevels (B) und der Ausprägung des G1-Arrests in humanen Fibroblasten

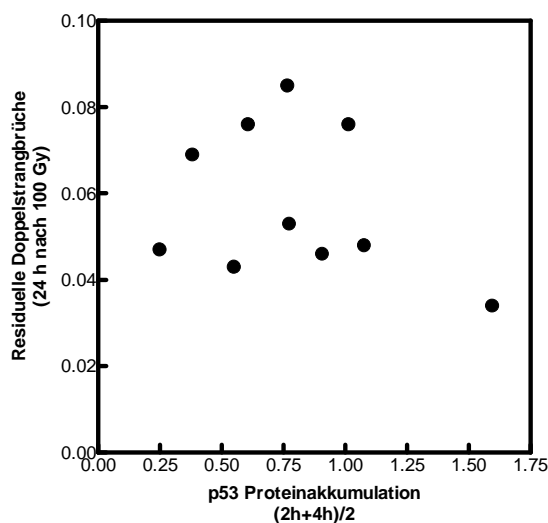
Die in Abbildung 18 ermittelten Daten der nach Bestrahlung mit 6 Gy auftretenden maximalen p53- (A) und p21- (B) Proteinexpression (2h+4h/2) wurden gegen den Anteil der nach Bestrahlung mit 3,5 Gy in der G1-Phase arretierten Zellen (ermittelt von Herrn Dr. Brammer, Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie, UKE, unveröffentlicht), aufgetragen.

4.8.2 Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg der p53- und p21-Proteinexpression und der DSB-Reparaturkapazität

Es sollte untersucht werden, ob die in den untersuchten Fibroblasten zuvor festgestellten Unterschiede in der DSB-Reparaturkapazität vom Ausmaß der strahleninduzierten p53-Akkumulation, bzw. p21-Induktion abhängig sind.

Hierzu wurde die Anzahl nicht reparierter DSBS (ermittelt durch KFGE, 24h nach Bestrahlung mit 100 Gy; Dikomey et al., 2000) gegen das hier ermittelte Ausmaß der p53- / p21-Proteinexpression aufgetragen (Abb. 21A und B). Sowohl Abbildung 21A (p53) als auch 21B (p21) zeigen eine diffuse Punktwolke, die anzeigt, dass die Variation der DSB-Reparaturkapazität nicht durch das Ausmaß der p53, bzw. p21-Proteinexpression nach Bestrahlung bestimmt wird.

A)



B)

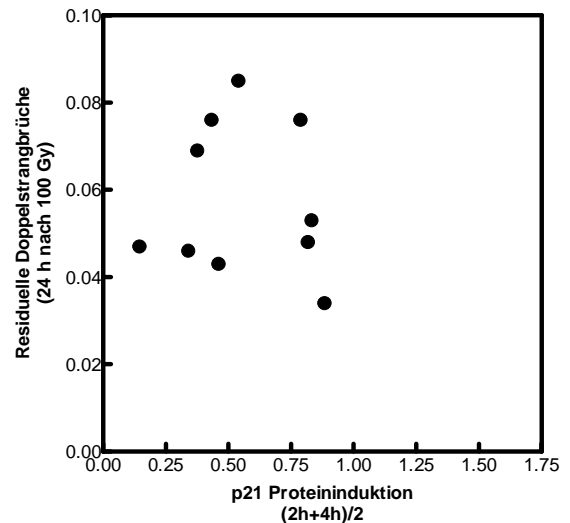


Abb. 21: Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg des p53- (A), bzw. des p21-Proteinlevels (B) und der Anzahl nicht reparierter DSBS in humanen Fibroblasten

Die in Abb. 18 ermittelten Daten der nach Bestrahlung mit 6 Gy auftretenden maximalen p53- (A) und p21- (B) Proteinexpression (2h+4h/2) wurden gegen die Anzahl nicht reparierter DSBS, ermittelt von Dikomey et al., 2000 (bestimmt über KFGE, 24h nach Bestrahlung mit 100 Gy), aufgetragen.

4.8.3 Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg der p53- und p21-Proteinexpression und dem Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy

Es sollte ermittelt werden, ob das Zellüberleben nach Bestrahlung (3,5 Gy) durch das Ausmaß der strahleninduzierten Zunahme des p53- bzw. des p21-Proteins beeinflusst wird. Hierzu wurde die maximale strahleninduzierte p53- / p21-Proteinakkumulation / -induktion (Abb.18) und das zuvor ermittelte Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy (Dikomey et al., 2000) gegenübergestellt (Abb. 22A/B). Da die Werte diffus verteilt sind, wird das Zellüberleben nach Bestrahlung offensichtlich nicht durch die p53- / p21-Proteinmenge bestimmt.

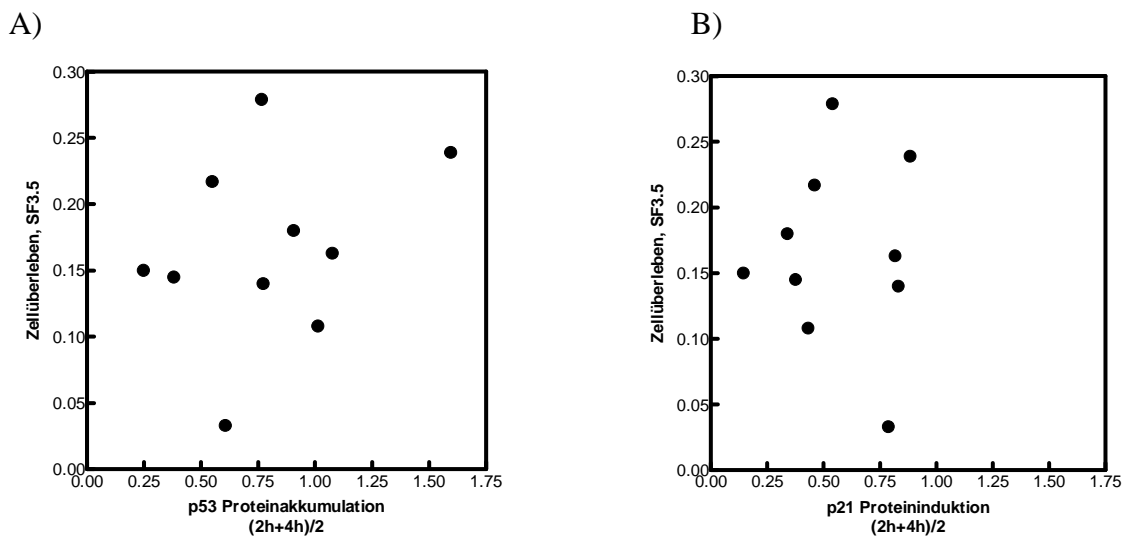


Abb. 22: Zusammenhang zwischen dem strahleninduzierten Anstieg des p53-(A), bzw. des p21-Proteinlevels (B) und dem Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy von humanen Fibroblasten

Die in Abb. 18 ermittelten Daten der nach Bestrahlung mit 6 Gy auftretenden maximalen p53- (A) und p21- (B) Proteinexpression (2h+4h/2) wurden gegen das Zellüberleben nach Bestrahlung mit 3,5 Gy (Koloniebildungstest, ermittelt von Dikomey et al., 2000), aufgetragen.

5 Diskussion

Ein Problem in der Strahlentherapie stellen Komplikationen in Form von Akut- oder Spätschäden des den Tumor umgebenden und im Bestrahlungsfeld liegenden Normalgewebes dar. Diese Schädigungen können zwischen einzelnen Patienten trotz gleicher Therapie/Bestrahlungsdosis stark variieren (Johansen et al., 1994). Die Ursachen dieser individuellen SE sind derzeit nur teilweise geklärt. Hierbei scheinen die zelluläre Reparaturkapazität sowie die Zellzyklusregulation nach DNA-Schädigung von Bedeutung zu sein (Dikomey et al., 2000; Rothkamm und Löbrich, 2002; Massague, 2004). Die weitere Aufklärung der die individuelle SE bestimmenden Parameter muss weiteres Ziel sein, um die Strahlentherapie individuell ausrichten zu können und somit den Patienten eine optimale Behandlung mit größtmöglicher Schädigung des Tumors und gleichzeitig möglichst geringen Normalgewebsreaktionen anbieten zu können.

Das p53-Tumorsuppressorgen/-protein ist (wie in der Einleitung dargestellt) sowohl an verschiedenen Reparaturprozessen direkt oder indirekt beteiligt und beeinflusst zudem die zelluläre Reaktion nach strahleninduzierter DNA-Schädigung maßgeblich, indem es das weitere Fortschreiten im Zellzyklus stoppt und damit Zeit für die Entfernung der Schäden gewährleistet.

Dieses Protein stellt somit einen potentiellen Kandidaten dar, dessen eigene Regulation möglicherweise entscheidenden Einfluss auf Reparatur und Zellzykluskontrolle ausübt und darüber potentiell die Ausprägung der SE mitbestimmt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Basallevel sowie die strahleninduzierte p53-Regulation sowie des vom p53 abhängigen p21-Proteins in 10 humanen Normalfibroblastenlinien genauer zu charakterisieren und die Ergebnisse mit den bereits bekannten Daten dieser Zelllinien bezüglich G1-Arrest, DSB-Reparatur und SE (Dikomey et al., 2000; Brammer, unveröffentlicht) gegenüberzustellen. Hierdurch sollte eine Bewertung der Bedeutung des Ausmaßes der p53- / p21-Proteinexpression für die DSB-Reparatur und SE möglich werden, um den prädiktiven Wert dieser beiden Proteine abschätzen zu können.

5.1 Variation des p53- / p21-Proteinbasallevels

Bei den unterschiedlichen Fibroblastenzelllinien war das Ausmaß des p53- / p21-Proteinbasallevels sehr heterogen. Die Schwankungen des p53-Proteinlevels variierten um den Faktor 3,3 (Abb. 9A). Ähnlich starke Variationen des p53-Basallevels zeigten sich auch bei Untersuchungen von Epidermis-Hautkulturen (Normalgewebe) mit einer Variation um den Faktor 6,5 (Pond et al., 2004). Der p21-Proteinbasallevel zeigte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls große Unterschiede zwischen den verschiedenen Fibroblastenzelllinien, hier variierten die Werte um den Faktor 5,8 (Abb. 9B). Trägt man den p53- und p21-Basallevel gegeneinander auf, ergibt sich eine Korrelation zwischen den beiden Proteinen (Abb. 10). Es ist bekannt, dass p53 bei Anwesenheit von DNA-Schäden (DSB) die Expression von p21 transaktiviert (El-Deiry et al., 1993, 1994). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sogenanntes nicht-induziertes p53 (Janus et al., 1999), also p53, das nicht infolge von DNA-Schäden stabilisiert wird, sondern konstitutiv exprimiert wird, offensichtlich auch die p21-Expression reguliert.

5.2 p53-Regulation nach Bestrahlung

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse haben gezeigt, dass sich humane Fibroblasten deutlich in ihrem p53-Basallevel unterscheiden. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit sich eine Bestrahlung auf die p53-Regulation/-Expression auswirkt.

Nach Induktion von DNA-Schäden, insbesondere DSBS, erfolgt die Stabilisierung von p53 in Form einer Tetramerbildung (Sakaguchi et al., 1997) mit nachfolgender Aktivierung von p53. Diese Aktivierung wird durch post-translationale Modifizierungen in Form von Phosphorylierungen und Acetylierungen hervorgerufen, die unter anderem durch aktiviertes ATM und die Proteinkinase CDK2 durchgeführt werden (Cuddihy und Bristow, 2004). Hierdurch wird die Bindung von p53 an MDM2 verhindert, so dass die Proteindegradation gehemmt wird und es zur Verlängerung der Halbwertszeit von p53 kommt (Freedman et al., 1999).

Das zelluläre Protoonkogen MDM2 wurde zuerst von Fakharzadeh identifiziert (1991). MDM2 bindet mit seiner amino-terminalen Domäne an die Transaktivierungsdomäne von p53 und inaktiviert es hierdurch (Kussie et al., 1996). Zum einen wird durch diese Komplexbildung die transaktivierende Funktion von p53 gehemmt, zum anderen erfolgt eine

ubiquitin-abhängige Degradation des p53 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997), so dass es zur Erniedrigung des p53-Levels und zur Verkürzung von dessen Halbwertszeit kommt. Da p53 als Transkriptionsfaktor die Expression von MDM2 induziert, regulieren sich die beiden Proteine gegenseitig (Freedman et al., 1999). Die Anwesenheit von DSBS bewirkt eine Phosphorylierung beider Proteine, die zu einer Blockierung der Interaktion zwischen p53 und MDM2 führt (Shieh et al., 1997). Der p53-Level steigt dadurch an und p53 kann seine Funktionen bei der DNA-Reparatur übernehmen (Shieh et al., 1997). Nach erfolgter DNA-Reparatur wird die Transkription von MDM2 durch den erhöhten p53-Level aktiviert und eine verstärkte Interaktion zwischen MDM2 und p53 ermöglicht, die zu einer verringerten p53-Expression führt (Freedman et al., 1999).

Bei den hier untersuchten Fibroblastenlinien ist nach Bestrahlung mit 6 Gy ein unterschiedliches Ausmaß bzgl. der p53-Akkumulation mit Unterschieden um den Faktor 3,6 zu beobachten. Ähnlich starke Variationen der p53-Akkumulation (Faktor 3,8) wurden in Epidermis-Hautkulturen nach Bestrahlung mit 2 Gy festgestellt (Pond et al., 2004). In den untersuchten Fibroblasten wurde die maximale p53-Proteinakkumulation nach 6 Gy im Zeitraum zwischen 2-4 h nach Bestrahlung beobachtet. Eine ähnliche Kinetik wurde auch von anderen Arbeitsgruppen für Normalzellen (Torres et al., 2004, humane Fibroblasten, Bestrahlungsdosis: 6 Gy, Maximum nach 3h, Ausmaß des p53-Anstiegs: Faktor 1,75; Fournier et al., 2004, humane Fibroblasten, Bestrahlungsdosis: 8 Gy, Maximum nach 3 h, Ausmaß des p53-Anstiegs: Faktor 1,9; Pond et al., 2004, Epidermiszellen, Bestrahlung mit 2 Gy) beschrieben. Auch für p53-Wildtyp-Tumorzellen (Mamma-Ca-Zelllinie, Bestrahlung mit 6 Gy; Siles et al., 1996) wurde die maximale p53-Akkumulation 2-4 h nach Bestrahlung gezeigt.

Fournier et al. konnten zudem eine Dosisabhängigkeit der Geschwindigkeit der Akkumulation feststellen. Bei einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy zeigte sich das p53-Maximum nach 1h und blieb für ca. 2 h auf konstantem Niveau, der maximale Anstieg betrug das 1,8-fache des Basalwertes. Nach Bestrahlung mit 8 und 16 Gy trat das p53-Maximum verzögert 3 h und 3-6 h nach Bestrahlung auf, wobei der maximale Anstieg mit Faktor 1,9 sehr ähnlich ausfiel. Dem Maximum der p53-Expression folgte bei den hier untersuchten Zelllinien AF 1, 2, 7, 9, 11 und 12 ein relativer Abfall. Ähnliche Ergebnisse zeigten Torres und Mitarbeiter (2004). Bei den untersuchten Zelllinien AF 4, 6, 7, 9, 11 konnte ein zweites Maximum nach 10-16 h festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In anderen Arbeiten, in denen Normalfibroblasten im Zeitraum von 0-24 h nach Bestrahlung untersucht wurden, wurde von diesem zweiten Anstieg nicht berichtet (Torres et al., 2003; Fournier et al., 2004). Für Tumorzellen (2

Mammakarzinom-Zelllinien, Wildtyp und mut-p53) wurde ebenfalls ein erneutes Ansteigen der p53-Expression 4 h, bzw. 8 h nach Bestrahlung mit 6 Gy festgestellt (Siles et al., 1996). Es gibt Hinweise, dass die p53-Akkumulation nach DNA-Schädigung in mehreren Impulsen erfolgt. Ma et al. (2005) stellten fest, dass die p53-Antwort nach DNA-Schädigung sowohl in der Anzahl der p53-Expressionsmaxima als auch in der Höhe der Proteinakkumulation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis variiert. Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy wurde nach ca. 3 h das erste Maximum der p53-Akkumulation und nach ca. 10 h das zweite Maximum angegeben, was mit der hier beobachteten Kinetik gut übereinstimmt. Diese oszillatorische Dynamik wurde von den Autoren auf die oben beschriebene p53-MDM2-Regulationsschleife zurückgeführt.

Die meisten der untersuchten Normalfibroblasten zeigen demnach qualitativ eine p53-Regulation wie sie in p53-Wildtypzellen zu beobachten ist (Girinski et al., 1995), auch wenn die zeitliche Abfolge der Akkumulationsmaxima als auch die Ausprägung der Proteinakkumulation zwischen den verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich ist. Die Zelllinien AF 3 und 4 zeigen dagegen einen gleichbleibenden p53-Level ohne erkennbare Akkumulation nach Bestrahlung. Der fehlende Anstieg von p53 nach Bestrahlung könnte ein Hinweis auf eine Mutation des p53-Proteins sein. In der Arbeit von Böhnke et al. (2004) werden 2 Tumorzelllinien beschrieben, die ebenfalls keine Induktion nach Bestrahlung mit 6 Gy zeigen. Diese Zelllinien weisen eine p53-Regulationsstörung infolge einer Missense-Mutation im Bereich der spezifischen Bindungsdomäne auf. Obwohl der in dieser Arbeit eingesetzte p53-Antikörper sowohl Wildtyp- als auch mutiertes p53 erkennt, ist bei den hier untersuchten Normalfibroblasten jedoch von einer Wildtyp-Funktion auszugehen, da alle Fibroblastenlinien einen G1-Arrest nach Bestrahlung auslösen konnten (Brammer et al., unveröffentlicht). Der fehlende p53-Anstieg in den Zelllinien AF 3 und 4 könnte möglicherweise eher durch eine gestörte p53-MDM2-Regulationsschleife, z.B. infolge einer Überexpression von MDM2 und damit fehlender posttranslationaler p53-Stabilisierung, hervorgerufen sein.

5.3 p21-Induktion in Abhängigkeit von der p53-Regulation

p53 entfaltet viele seiner Wirkungen, indem es als Transkriptionsfaktor wirkt und die Expression anderer Proteine bewirkt (Levine, 1997). Das p21-Protein ist ein Protein, das nach Bestrahlung in der Regel durch p53 induziert wird (El-Deiry et al., 1994). In verschiedenen Studien mit p53-defizienten oder -mutierten Zelllinien konnte jedoch ebenfalls eine p53-unabhängige Induktion des p21-Proteins gezeigt werden (Bristow et al., 1996, Review).

In den hier untersuchten Zelllinien konnte ein zeitgleicher Anstieg, bzw. eine zeitgleiche Induktion des p53- und p21-Proteins festgestellt werden. Die Kinetiken der p53-Akkumulation und p21-Induktion verlaufen bei den meisten Zelllinien nahezu parallel (siehe Abb. 16). Das Auftreten der maximalen p21-Induktion stimmt daher auch mit dem der maximalen p53-Akkumulation 2-4 h nach Bestrahlung überein. Einen ähnlichen Verlauf zeigen die Daten von Torres und Mitarbeitern (2004). Andererseits wurde von anderen Arbeitsgruppen sowohl in Normalfibroblasten als auch in Tumorzellen ein zeitlich verzögerter p21-Anstieg um ca. 2-3 h nach dem p53-Maximum beobachtet. Nach Bestrahlung von Normalfibroblasten mit 0,5, 2 und 4 Gy trat das p21-Induktionsmaximum nach 3 h auf, während sich das p53-Maximum nach Bestrahlung mit 4 Gy bereits nach 1 h zeigte (Fournier et al., 2004). Dieser zeitlich verzögerte p21-Anstieg um ca. 2 h wurde auch in Tumorzelllinien (Prostatacarcinom) nach Bestrahlung mit 6 Gy beobachtet (Böhnke et al., 2004). Daino et al. (2002) zeigten, dass bei einer humanen myeloblastischen Leukämie-Zelllinie nach Bestrahlung mit 50 cGy die maximale Induktion von p21 sogar vor der maximalen Akkumulation von p53 auftritt und vermuteten daher, dass die p21-Induktion nicht von dem Ausmaß der p53-Akkumulation anhängig sei.

Diese Interpretation könnte sich auch für die hier untersuchten Normalfibroblasten andeuten, da bei einem zeitgleichen Anstieg beider Proteine eine aufeinander folgende Regulation und eine p21-Neusynthese unmöglich erscheint und daher andere Faktoren eine Rolle spielen müssen oder aber bereits geringe Mengen an p53 als Transkriptionsfaktor zur Induktion ausreichen. Folgende mögliche Erklärungen könnten für dieses Phänomen verantwortlich sein.

Die Induktion der Transkription des CDKN1A (p21)-Gens ist p53-unabhängig, bzw. nicht allein von p53 abhängig. Hinweise hierfür lieferten Versuche von Akashi et al., (1995). Diese Autoren zeigten an einer humanen myeloblastischen Leukämiezellreihe, dass die Induktion der CDKN1A-Transkription auch von der TNF-Produktion nach Bestrahlung abhängt (Akashi

et al., 1995). Ebenso konnte BRCA1 als weiterer Transkriptionsfaktor für p21 identifiziert werden (Somasundaram et al., 1997; Li et al., 2000). BRCA 1 induziert p21 sowohl in Abwesenheit von DNA-Schäden (Somasundaram et al., 1997) als auch als Koaktivator bei der p53-abhängigen p21-Transkription (Chai et al., 1999). In Epidermiszellen von p53-Null-Mäusen konnte ebenfalls eine Induktion von p21 nach Bestrahlung nachgewiesen werden, die jedoch ein geringeres Ausmaß erreichte als in p53-profizienten Mäusen (Song und Lambert, 1999).

Offensichtlich ist nicht unbedingt das Ausmaß des strahleninduzierten Anstiegs des p53-Proteins ausschlaggebend, sondern möglicherweise vielmehr spezifische Modifikationen von p53 wie Phosphorylierung oder Acetylierung. Für die Phosphorylierung an Position Ser20 wurde in vivo nachgewiesen, dass diese nach Bestrahlung verstärkt vorkommt und mit der Induktion der Transkription von p21 korreliert (Jabbur et al., 2000). In Untersuchungen von humanen und murinen Zellen, die mutiertes Ser15-Phosphoprotein, bzw. Ser18-Phosphoprotein exprimierten, wurde eine verminderte Induktion von p21 festgestellt (Al Rashid et al., 2005). Dieses weist darauf hin, dass spezifischen Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, für die p53-Funktion eine größere Bedeutung zukommt als das eigentliche Ausmaß der Proteinexpression.

5.4 Zusammenhang zwischen dem p53- / p21-Basallevel, bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung und der Ausprägung des G1-Arrests

Für den Einfluss von p53- und p21 auf den strahleninduzierten G1-Arrest gibt es in der Literatur unterschiedliche Hinweise. Normalerweise wird p21 nach Bestrahlung p53-abhängig induziert und aktiviert den G1-Arrest durch Inhibierung des Cyclin E/CDK2-Komplexes, der für den Eintritt in die S-Phase entscheidend ist (Harper et al., 1993; Levine, 1997). Die Rolle der p53- / p21-Proteine in der G1-Arrest-Regulation scheint jedoch noch nicht abschließend geklärt zu sein. In der Arbeit von Azzam und Mitarbeitern (2000) wurden p53-defiziente und p21-defiziente-MEF-Zellen nach α -Partikel- und γ -Bestrahlung auf die Ausprägung des G1-Arrests untersucht. Im Gegensatz zu p53-Wildtypzellen konnte in beiden Zelllinien kein G1-Arrest festgestellt werden, so dass p53 für die Auslösung des G1-Arrests und p21 als Hauptmediator beschrieben wurde. Die Bedeutung von p21 für die Auslösung des G1-Arrests zeigten auch Untersuchungen an Epidermis- und Haarfollikel-Zellen von Mäusen. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Zelltypen der Haut unterschiedlich auf Bestrahlung reagieren.

Epidermis-Zellen reagierten auf Bestrahlung mit der Auslösung des G1-Arrests, während Haarfollikelzellen Apoptose begingen und keinen G1-Arrest auslösten. Diese Unterschiede konnten auf eine unterschiedliche Aktivität des p53- und des p21-Proteins zurückgeführt werden. In Haarfollikelzellen konnte zwar eine p53-Induktion jedoch keine p21-Induktion nachgewiesen werden, in den Epidermiszellen zeigte sich jedoch eine p53- und p21-Induktion (Song und Lambert, 1999). Im Gegensatz hierzu stehen Arbeiten, in denen in p21-Null-MEF-Zellen die Auslösung eines G1-Arrests, wenn auch in abgeschwächter Ausprägung beschrieben wurde (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995). Mazzatti et al. (2005) konnten einen G1-Arrest in einer humanen p53-defizienten-Lungencarcinom-Zelllinie auslösen, indem sie diese einerseits mit p53-Wildtyp-cDNA transfizierten und andererseits mit p21-cDNA transfizierten. Dieses spricht dafür, dass p21 auch in Abwesenheit von p53 einen G1-Arrest auslöst.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Höhe des p53- / p21-Basallevels oder die Stärke der p53-Akkumulation / p21-Induktion nach Bestrahlung die Ausprägung des G1-Arrests von Normalfibroblasten bestimmt. Sowohl für p53 (Abb. 13A und 22A) als auch für p21 (Abb. 13B und 22B) konnte weder für den Basallevel noch für die Akkumulation / Induktion ein Zusammenhang mit der Ausprägung des G1-Arrestes festgestellt werden. Offensichtlich wird das Ausmaß des Arrestes nicht durch die Proteinmenge bestimmt. Es wäre möglich, dass bereits ein sehr geringer Level der Proteine für die Auslösung des G1-Arrests ausreicht oder Aktivierungsprozesse wie z.B. Phosphorylierungen oder andere Modifikationen eine bedeutendere Rolle für die Zellzyklusregulation zukommt, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

Konträr zu den Ergebnissen der Normalfibroblasten der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen an Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs, die sowohl Wildtyp-p53 als auch mutiertes p53 aufwiesen. Hier konnte eine Korrelation zwischen dem p53-Level und der Ausprägung des G1-Arrests festgestellt werden (Siles et al., 1996). Jedoch gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse bei Tumorzell-Studien, die eine Korrelation nicht bestätigen (Danielsen et al., 1999, p53-Wildtyp-Melanomzelllinien). An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs, bzw. Tumorzellen und Normalzellen miteinander verglichen wurden und die Vergleichbarkeit stark eingeschränkt ist, da unbekannte Faktoren der unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen auf die p53-Akkumulation, bzw. auf den G1-Arrest Einfluss nehmen könnten (Song und Lambert, 1999).

5.5 Zusammenhang zwischen dem p53- / p21-Basallevel, bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung und der DSB-Reparaturkapazität

Nicht reparierte DSBS gelten als ein entscheidender Faktor, der die SE einer Zelle mitbestimmt (Herrmann und Baumann, 1997; Dikomey et al., 1998; Dikomey et al., 2000). Die Reparatur von DSBS wird in Säugerzellen größtenteils durch die in Kapitel 2.2 beschriebenen Reparaturmechanismen der HR und des NHEJ durchgeführt. Wie in 2.4 dargestellt ist, ist p53 an diesen Prozessen direkt und indirekt beteiligt (Albrechtsen et al., 1999; Janus et al., 1999). Ebenfalls konnte ein stimulierender Effekt des p53-Proteins auf die Basenexzisionsreparatur nachgewiesen werden (Offer et al., 2001, Zhou et al., 2001; Purschke 2004, Dissertation). Dieses scheint von Bedeutung, da für einzelne als auch für gehäufte, sogenannte geclusterte Basenschäden, angenommen wird, dass diese infolge einsetzender Reparaturprozesse bei der Replikation oder Prozessierung in sekundäre DSBS überführt werden können (Sutherland et al., 2002; Friedberg 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die p53- und p21-Basallevel als auch die strahleninduzierten p53- / p21-Proteinlevel mit der in vorherigen Experimenten bestimmten DSB-Reparaturkapazität verschiedener Normalfibroblasten (Dikomey et al., 2000) verglichen. Die Erwartung, dass aus einem hohen p53- / p21-Proteingehalt auch eine höhere DSB-Reparaturkapazität resultiert, konnte nicht bestätigt werden. Weder zwischen dem p53- / p21-Proteinbasallevel noch zwischen der strahleninduzierten p53-Proteinakkumulation / p21-Proteininduktion und der DSB-Reparaturkapazität konnte eine Korrelation festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung von Janus und Mitarbeitern (1999), dass bereits sehr geringe Mengen von nicht-induziertem p53, also ein minimaler Basallevel, ausreichend für DNA-Reparaturvorgänge ist.

Wird die Reparaturkinetik von DSBS genauer betrachtet, verläuft diese charakteristischerweise in zwei Abschnitten, in einer schnellen (HWZ = 6-8 min) und in einer langsamen Reparaturphase (Dikomey et al., 1995). Für Fibroblastenzelllinien konnte eine abgeschlossene DSB-Reparatur nach 16-18h festgestellt werden (Dikomey et al., 2000; Kasten-Pisula et al., 2005). In den ersten zwei Stunden nach Schädigung sind bereits ca. 80% der DSB-Reparatur abgeschlossen. Das Maximum der p53-Akkumulation / p21-Induktion wird jedoch erst nach 2-4 h erreicht, wenn die meisten DSBS bereits repariert sind. Die p53-Akkumulation / p21-Induktion scheint somit kein entscheidender Faktor für die primäre DSB-Reparatur zu sein. Vermutlich werden hierdurch vielmehr transaktivierende Prozesse veranlasst, die für die langsame Reparaturkomponente von Bedeutung sein könnten und bei

der Entfernung von sekundär-verursachten DSBS, wie bei geclusterten Basenschäden, eine Rolle spielen könnten. Für p53 konnte ein stimulierender Effekt bei der Reparatur von abasischen Stellen in DNA-Oligonukleotiden *in vitro* gezeigt werden (Offer et al., 1999; Offer et al., 2001; Zhou et al., 2001). Auch in intakten MEF-Zellen wurde ebenfalls eine stimulierende Wirkung von p53 in Form einer beschleunigten Reparatur (Faktor 2,3) strahleninduzierter Basenschäden (8-OH-G) gezeigt (Purschke 2004, Dissertation).

Albrechtsen und Mitarbeiter (1999) beschreiben ein Modell, in dem p53 in seinem nicht-induzierten Status andere Funktionen ausübt als in seinem akkumulierten Zustand. Sie zeigten, dass die Aktivierung der sequenz-spezifischen DNA-Bindungsaktivität zu einer Blockierung der 3`-5`-Exonukleaseaktivität führt, und vermuteten daher, dass sich p53 in seinem Grundzustand (Basallevel) an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt, während im akkumulierten Zustand der Schwerpunkt zu Funktionen wie z.B. Transaktivierung und regulatorische Prozesse verschoben wird. Diese Hypothese würde erklären, dass das Ausmaß der p53-Akkumulation / p21-Induktion in den hier untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf die DSB-Reparaturkapazität hat. Es müsste dann jedoch ein Zusammenhang zwischen dem p53-Basallevel und der DSB-Reparaturkapazität bestehen, der in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht festgestellt werden konnte. Offensichtlich kommt anderen Faktoren, wie z.B. die Aktivierung durch Protein-Modifikationen eine größere Bedeutung zu. Neuere Studien zeigen, dass an der Position Serin 15 phosphoryliertes p53 große Bedeutung bei der Erkennung von DNA-Brüchen hat. Al Rashid et al. (2005) konnten *in vivo* zeigen, dass im Zellkern lokalisiertes p53 in Anwesenheit von DNA-Strangbrüchen innerhalb von 30 min von der ATM-Kinase phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an dieser Position führt zur p53-Stabilisierung und zur Komplexbildung mit dem phosphorylierten Histon γ -H2AX, welches nur an DNA-Bruchenden auftritt und ein erstes Anzeichen einsetzender Signalweiterleitungen und DSB-Reparaturprozesse ist (Al Rashid et al., 2005). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Fibroblasten, die Mutationen in der Phosphorylierungsstelle Serin 15 aufwiesen, weniger p21-Protein induzierten und eine erhöhte Anzahl an nicht-reparierten DNA-Schäden aufwiesen (Al Rashid et al., 2005). Dementsprechend scheint nicht die Menge an p53-Protein für die Reparatur von Bedeutung, sondern eher das Ausmaß der p53-Aktivierung in Form der Phosphorylierung an der Position Serin 15, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Dies müsste vielmehr Thema einer daran anschließenden Arbeit sein.

5.6 Zusammenhang zwischen dem p53- / p21-Basallevel, bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung und der Strahlenempfindlichkeit

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 verschiedene humane Fibroblastenzelllinien auf die unterschiedliche Ausprägung der p53- / p21-Proteinexpression (unbestrahlt sowie auch nach Bestrahlung) untersucht. Im Mittelpunkt stand die Fragestellung, ob die zuvor festgestellten Unterschiede in der SE durch entsprechende Variationen im p53- / p21-Proteinlevel hervorgerufen werden. Das Verstehen von Mechanismen, die die individuelle SE erklären könnten, würde ggf. zur Entwicklung von Strategien beitragen, die zu einer höheren Effizienz der Strahlentherapie beitragen könnten.

Bereits umfangreich untersucht wurde der Zusammenhang zwischen p53-profizienten, p53-defizienten und p53-mutierten Zellen und ihrer Strahlensensibilität. Während für Fibroblasten eine erhöhte SE nach Verlust der Wildtypfunktion in mehreren Arbeiten beschrieben wurde (Bristow et al., 1996; Dahm-Daphi, 2000), sind die Ergebnisse für Tumorzelllinien sehr heterogen. Eine Übersicht liefert der Artikel von Brown und Wouters (1999), in dem 44 verschiedene Literaturquellen miteinander verglichen wurden. Sowohl der Vergleich von Studien mit genetisch unterschiedlichen als auch mit isogenetischen Zellen lieferte unterschiedliche Ergebnisse. Beim Vergleich der isogenetischen Zellen konnte in drei Studien eine Strahlenresistenz der p53-profizienten Zellen, in fünf Studien eine erhöhte SE und in neun Studien konnte kein Unterschied zu Zellen mit mutiertem oder defizienten p53 festgestellt werden.

Der prädiktive Wert des p53-Status und des p53-Proteinlevels bezüglich der Effektivität einer Strahlentherapie oder Chemotherapie (je nach Studie) wurde in verschiedenen Tumorgeweben untersucht. Auch bei diesen Studien waren die Ergebnisse sehr heterogen. Eine Übersicht über 17 Studien unterschiedlicher Tumorgewebe mit mutiertem p53 (Lunge, Prostata, Kopf und Hals, Rektum, Ösophagus, Cervix und Gehirn) findet sich in der Zusammenfassung von Cuddihy und Bristow (2004). In 7 Studien konnte ein geringeres Ansprechen der Tumoren, bzw. eine geringere Überlebensrate der Patienten festgestellt werden, in 9 anderen Studien wurde kein Zusammenhang zwischen dem p53-Status und dem Therapieerfolg beobachtet und in einer Studie zeigte sich ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie. Eine mögliche Erklärung für die sehr heterogenen Ergebnisse ist, dass unterschiedliche p53-Mutationen je nach Position der Mutation die Funktion des Proteins sehr unterschiedlich beeinflussen können und somit zwischen Mutationen mit teilweise erhaltener Wildtyp-Funktion, vollständig inaktivierenden Mutationen oder Mutationen mit erhöhter biologischer Aktivität

unterschieden werden müsste. In einer neuen Studie wurde der Einfluss von p53-Mutationen in Bezug auf den Gewinn neuer biochemischer und biologischer Protein-Funktionen und deren Einfluss auf das Tumorwachstum, bzw. Beeinflussung der Therapierbarkeit untersucht (Bossi et al., 2006). Die Autoren untersuchten drei verschiedene humane Tumorzelllinien (1 Brustkrebszelllinie und 2 Colocarzinomzelllinien) mit unterschiedlichen p53-Mutationen. Die p53-Expression wurde in den 3 Zelllinien experimentell unterbunden, der Verlust der p53mut-Funktion führte bei allen drei Zelllinien zu einer Reduktion der Zellproliferation, der Tumorgenität und zu einer verbesserten Wirksamkeit von Zytostatika, so dass mutiertes p53 unter bestimmten Bedingungen einen möglichen Ansatzpunkt für neue Anti-Krebstherapien darstellen könnte. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei Tumorzellen p53 nicht die einzige genetische Veränderung darstellt, sondern noch weitere Mutationen vorliegen, die den Therapieerfolg ebenfalls beeinflussen können.

Der prädiktive Wert des Ausmaßes der p53-Proteinexpression für einen potentiellen Therapieerfolg ist ebenfalls noch unklar. Während für colorektale Carcinome eine Korrelation zwischen starker p53-Expression und längerem krankheitsfreiem Überleben festgestellt wurde (Adrover et al., 1999), wurde für Ovarial-Carcinome nach Chemotherapie ein geringeres Überleben bei höherer p53-Proteinexpression (Herod et al., 1996) und für Kopf / Hals-Tumore nach Strahlentherapie kein Einfluss der p53-Expression gezeigt (Awwad et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem basalen, bzw. dem strahleninduzierten p53- / p21-Proteinlevel und dem Überleben von Normalfibroblasten nach Bestrahlung mit 3,5 Gy festgestellt werden (Abb. 12 und Abb. 21). Zu diesem Ergebnis passen auch die in dieser Arbeit zuvor ermittelten Daten, die keine Korrelation zwischen DSB-Reparatur und basaler, bzw. strahleninduzierter p53- / p21-Proteinexpression zeigten, da die zelluläre DSB-Reparaturkapazität einen wichtigen Faktor darstellt, der das Zellüberleben nach Bestrahlung mitbestimmt.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde für humane Fibroblasten untersucht, welche Bedeutung der basale sowie der strahleninduzierte p53-, bzw. p21-Proteinlevel auf Parameter wie die individuelle Strahlenempfindlichkeit, die Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität sowie den G1-Arrest haben.

Diese Untersuchungen wurden an 10 humanen Fibroblastenlinien durchgeführt, für die in vorherigen Untersuchungen bereits deutliche Unterschiede in diesen Parametern (Dikomey et al., 2000; Brammer et al., unveröffentlicht) festgestellt werden konnten. Für den Nachweis des p53- und p21-Proteins wurde zunächst die Methode des Western-Blots hinsichtlich geeigneter Antikörper etabliert.

Für die verschiedenen Fibroblastenlinien wurde festgestellt, dass die basale Expression des p53 Proteins um den Faktor von 3,3 und die des p21 Proteins um den Faktor 5,8 variiert. Hierbei zeigte es sich, dass zwischen diesen beiden Proteinen eine enge Regulation besteht. Fibroblastenlinien mit erhöhter p53-Expression wiesen ebenfalls eine erhöhte p21-Expression auf und umgekehrt.

Um in bestrahlten Zellen die maximale p53-Stabilisierung / p21-Induktion zu erfassen, wurde für beide Proteine die Kinetik der Expression bis zu 32 h nach Bestrahlung mit 6 Gy gemessen. Es zeigte sich, dass dieses Maximum für beide Proteine ca. 2 h bis 4 h nach Bestrahlung erreicht wird. Dieses Maximum fällt allerdings je nach Fibroblastenlinie unterschiedlich stark aus. Für p53 variiert das Maximum zwischen 1 und dem Faktor 3,6, für p21 zwischen 1 und 1,5.

Für die Fibroblasten zeigte sich jedoch trotz der hier ermittelten Unterschiede in der Proteinexpression bezüglich der zuvor untersuchten und in dieser Arbeit zu vergleichenden Parameter weder für den basalen noch für den strahleninduzierten Level des p53-, bzw. des p21-Proteins ein Zusammenhang. So wurde für die 10 untersuchten Fibroblastenlinien weder für das Ausmaß des strahleninduzierten G1-Arrestes, die DSB-Reparaturkapazität, noch für die SE eine Korrelation zu dem jeweiligen basalen oder strahleninduzierten Level festgestellt. Diese Arbeit zeigt damit erstmalig, dass in humanen Fibroblasten die Unterschiede in diesen Parametern nicht auf eine Variation des p53- oder 21-Proteinlevels zurückgeführt werden können.

7 Literatur

Adrover E., Maestro M. L., Sanz-Casla M. T., del Barco V., Cerdan J., Fernandez C., Balibrea J.L. Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br. J. Cancer.* 1999; 81: 122-126.

Akashi M., Hachiya M., Osawa Y., Spirin K., Suzuki G., Koeffler H. P. Irradiation induces WAF1 expression through a p53-independent pathway in KG-1 cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 19181-19187.

Albrechtsen N., Dornreiter I., Grosse F., Kim E., Wiesmüller L., Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene.* 1999; 18: 7706-7717.

Al Rashid S. T., Dellaire G., Cuddihy A., Jalali F. et al. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res.* 2005; 65: 10810-10821.

Awwad S., Jaros E., Somes J., Lunec J. P53 overexpression in head and neck carcinoma and radiotherapy results. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996; 34; No2: 323-332.

Azzam E. I., de Toledo S. M., Waker A. J., Little J. B. High and low fluences of α -particles induce a G1-checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res.* 2000; 60: 2623-2631.

Böhnke A., Westphal F., Schmidt A., El-Awady R., Dahm-Daphi J. Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumor cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2004 ; 80; No1: 53-63.

Borgmann K., Dede M., Wrona A., Brammer I., Overgaard J., Dikomey E. For x-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 58; No 2: 445-452.

Bossi G., Lapi E., Strano S., Rinaldo C., Blandino G., Sacchi A. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene.* 2006; 25: 304-309.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248-254

Bristow G. R., Benchimol S., Hill R. P. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother. and Oncology.* 1996; 40: 197-223.

Bristow R. G., Hu Q., Jang A., Chung S., Peacock J., Benchimol S., Hill R. Radioresistant MTP53-expressing rat embryo cell transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene*. 1998; 16(14): 1789-802.

Brown J. M., Wouters B. G. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*. 1999; 59(7): 1391-9.

Brugarolas J., Chandrasekaran C., Gordon J. I., Beach D., Jacks T., Hannon G. J. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 1995; 377: 552-557.

Chai Y., Cui J., Shao N., Shyam E., Reddy P., Rao V. N. The second BRCT domain of BRCA1 protein interacts with p53 and stimulates transcription from p21^{Waf1/Cip1} promoter. *Oncogene*. 1999; 18: 263-268.

Chen I.-T., Smith M. L., Ó Connor P. M., Fornace Jr. A. J. Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21^{Waf1/Cip1} with PCNA. *Oncogene*. 1995; 11: 1931-1937.

Christmann M., Tomicic M.T., Roos W.P., Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003; 193(1-2): 3-34.

Cuddihy A. R., Bristow R. G. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004; 23: 237-257.

Dahm-Daphi J. P53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlenther. Onkol*. 2000; 176: 278-85.

Dahm-Daphi J., Hübbe P., Horvath F., El-Awady R.A, Bouffard K.E., Powell S.N., Willers H. Nonhomologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene*. 2005; 24: 1663-1672.

Daino K., Ichimura S., Neno M. Early induction of CDKN1A (p21) and GADD45 mRNA by a low dose of ionizing radiation is due to their dose-dependent post-transcriptional regulation. *Radiat. Res*. 2002; 157: 478-482.

Danielsen T., Smith-Sorensen B., Gronlund H. A., Hvidsten M., Borresen-Dale A.-L., Rofstad E. K. No association between radiosensitivity and TP53 status, G1-arrest or protein levels of p53, myc, ras or raf in human melanoma lines. *Int. J. Radiat. Biol*. 1999; 75, N09 : 1149-1160.

Deng C., Zhang P., Harper J. W., Elledge S.J., Leder P. Mice lacking p21^{Waf1/Cip1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*. 1995; 82: 675-684.

Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K., Wahl G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1-arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes and Develop.* 1994; 8: 2540-2551.

Dikomey E., Jung H. Correlation between thermal radiosensitization and slowly-rejoining DNA strand breaks in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1995; 68 : 227-233.

Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I., Martensen R., Kaina B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand-breaks studied in mammalian cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998; 73, No 3: 269-278

Dikomey E., Brammer I., Johansen J., Bentzen S., Overgaard J. Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000; 46, No2: 481-490.

Dikomey E., Borgmann K., Brammer I., Kasten-Pisula U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal human fibroblasts. *Toxicology.* 2003; 193: 125-135.

Dudenhöffer C., Rohaly G., Will K., Deppert W., Wiesmüller L. Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol. Cell Biol.* 1998; 18(9): 5332-42.

Dutta A., Ruppert M., Aster J.C., et al. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature.* 1993; 365: 79-82.

El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993; 75: 817-825.

El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V. E., Canman C. E., Jackman J., Pietenpol J. A., Burrell M., Hill D. E., Wang Y., Wiman K. G., Mercer W. E., Kastan M. B., Kohn K., Elledge S. J., Kinzler K. W., Vogelstein B. AF1/Cip1 is induced in p53-mediated G1-arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994; 54: 1169-1174.

El-Deiry W. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene.* 2003; 22(47): 7486-95.

Fakharzadeh S. S., Trusko S. P., George D. L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* 1991; 10; No 6: 1565-1568.

Fei P., El-Deiry W. P53 and radiation responses. *Oncogene*. 2003; 22(37): 5774-83.

Finnie N. J., Gottlieb T. M., Blunt T., Jeggo P. A., Jackson S. P. DNA- dependent proteinkinase activity is absent in xrs-6 cells: implication for site-specific recombination and DNA double strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 320-324.

Fournier C., Wiese C., Taucher-Scholz G. Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. *Radiat. Res*. 2004; 161: 675-684.

Freedman D. A., Wu L., Levine A.J: Functions of the MDM2 oncoprotein. *CMLS; Cell. Mol. Life Sci*. 1999; 55: 96-107.

Freedman D. A., Levine A. J. Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein – Thirty eight G.H.A. clowes memorial lecture. *Cancer Res*. 1999; 59: 1-7.

Friedberg E. C. DNA damage and repair. *Nature*. 2003; 421(6921): 436-40.

Fritsche M., Haessler C., Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*. 1993; 307-18.

Girinski T., Koumenis C., Graeber T. G., Peehl D. M., Giaccia A. J. Attenuated response of p53 and p21 in primary cultures of human prostatic epithelial. Cells exposed to DNA-damaging agents. *Cancer Res*. 1995; 55: 3726-3731.

Harper J. W., Adami G. R., Wie N., Keyomarsi K., Elledge S. J. The CDK- interacting Protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993; 75: 805-816.

Haupt Y., Maya R., Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997; 387: 296-299.

Herod J. J. O., Eliopoulos A. G.; Waraick J., Niedobitek G., Young L. S., Kerr D. J. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 1996; 56: 2178-2184.

Herrmann T., Baumann M. Klinische Strahlenbiologie. *Gustav Fischer Verlag*. 1997.

Hoeijmakers J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 411(6835): 366-74.

Jabbur J. W., Huang P., Zhang W. DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene*. 2000 Dec 14; 19(54): 6203-8.

Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I., Wiesmüller L., Grosse F., Deppert W. The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *CMLS, Cell Mol. Life Sci*. 1999; 55: 12-27.

Johansen J., Bentzen S. M., Overgaard J. Overgaard M. Evidence for a positive correlation between *in vitro* radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol*. 1994; 66: 407-412.

Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2000, 144-50.

Kasten U., Borgmann K., Burgmann P., Li G., Dikomey E. Overexpression of human Ku70/Ku80 in rat cells resulting in reduced DSB repair capacity with appropriate increase in cell radiosensitivity but with no effect on cell recovery. *Radiat Res*. 1999; 151(5): 532-9.

Kasten-Pisula U., Tastan H., Dikomey E. Huge differences in cellular radiosensitivity are due to only very small variations in double-strand break repair capacity. 2005

Kasten-Pisula U. et al. In normal fibroblasts variation in DSB repair capacity cannot be ascribed to radiation-induced changes in the localization, expression or activity of major NHEJ proteins. *Radioth. and Oncol., eingereicht*, 2007

Kauffmann G., Moser E., Sauer R. Radiologie Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin. *Urban und Schwarzenberg*. 2001.

Kubbutat M. H. G., Jones S. N., Vousden K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997; 387: 299-303.

Kussie H. P., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A. J., Pavletich N. P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996; 274: 948-953.

Lane D. P. P53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; 358: 15-16.

Levine A. J. P53, the cellular Gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88: 323-331.

Li S., Ting N. S. Y., Zheng L., Chen P.-L., Ziv Y., Shiloh Y., Lee E. Y.-H., Lee W.-H. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*. 2000; 406: 210-215.

Lieber M. R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA-end-joining. *Nat. Pub. Group*. 2003, *Reviews*, 4: 712-719.

Linke S. P., Sengupta S., Khabie N., Jeffries B. A., Buchhop S., Miska S., Henning W., Pedoux R., Wang X. W., Hofseth L. J., Yang Q., Garfield S.H., Stürzbecher H.-W., Harris C.C. P53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res*. 2003, 63: 2596-2605.

Ma L., Wagner J., Rice J. J., Hu W., Levine A. J., Stolovitzky G. A. A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage. *PNAS*. 2005; 120; No 40: 14266-14271.

Mamorstein L. Y., Ouchi T., Aaronson S. A. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 13869-74.

Massague J. G1 cell-cycle control and cancer *Nature*. 2004, 432: 298-306.

Mazzatti D. J., Lee Y.-J., Helt C., O'Reilly M. A., Keng P. C. P53 modulates radiation sensitivity independent of p21 transcriptional activation. *Amer. J. Clin. Oncol.*; 28: 43-50.

Mekeel K. L., Tang W., Kachnic L. A., Luo C.-M., De Frank J. S., Powell S. N. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene*. 1997; 15: 1847-1857.

Midgley C. A., Lane D. P. p53 protein stability in tumor cells is not determined by mutation but is dependent on MDM2 binding. *Oncogene*. 1997; 15: 1179-1889.

Morris G. F., Bischoff J. R., Mathews M. B. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 895-899.

Moshous D., Callebaut I., de Chasseval R., Corneo B., Cavazzana-Calvo M., Le Deist F., Tezcan I., Sanal O., Bertrand Y., Philippe N., Fischer A., de Villartay J.P. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*. 2001; 105(2): 177-86.

Nelson W. G., Kastan M. B. DNA strand breaks: the template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. and Cell. Biol*. 1994; 14, No3: 1815-1823.

Offer H., Wolkowicz R., Matas D., Blumenstein S., Livneh Z., Rotter V. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett.* 1999; 450(3): 197-204.

Offer H., Zurer I., Banfalvi G., Reha'k M., Falcovitz A., Milyavsky M., Goldfinger N. P53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res.* 2001; 61(1): 88-96.

Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis.* 2000; 15(4): 289-302.

Pond C. D., Leachman S. A., Warters R. L. Accumulation, activation and interindividual variation of the epidermal TP53 protein in response to ionizing radiation in organ cultured human skin. *Radiat. Res.* 2004; 16 : 739-745.

Ponten F., Lindman H, Bostrom A., Berne B., Bergh J. Induction of p53 expression in skin by radiotherapy and UV radiation: a randomized study. *J. Nat. Cancer Inst.* 2000; 93: 128-133.

Purschke M. Erzeugung und Reparatur strahleninduzierter DNA-Basenschäden und deren Bedeutung für die Strahlenempfindlichkeit von Säugerzellen. *Dissertation.* 2004. Carl v. Ossietzky Uni. Oldenburg, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaft.

Radford R., Murphy T. K. Radley J. M., Ellis S. L. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apototic death is shown by all lines examined. *Int .J. Radiat. Biol.* 1994; 65, No2: 217-227.

Rothkamm K., Löbrich M. Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (Review). *Int. J. Oncol.* 2002, 21: 0-00.

Sakaguchi K., Sakamoto H., Lewis M. S., Anderson C. W., Erickson J. W., Appella E., Xie D. Phosphorylation of Serin 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry.* 1997; 36: 10117-10124.

Selivanova G., Wiman K. G. P53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv. Cancer Res.* 1995; 66: 143-80.

Shieh S.-Y., Ikeda M., Taya Y., Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997; 91: 325-334.

Siles E., Villalobos M., Valenzuela M. T., Nunez M. I. ; Gordon A. Mc Millan T. J., Pedraza V., Ruiz de Almodovar J. M. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br. J. Cancer.* 1996; 73: 581-588.

Somasundaram K., Zhang H., Zeng Y.-X., Houvras Y., Peng Y., Zhang H., Wu G. S., Licht J. D., Weber B. L., El-Deiry W. S. Arrest of the cell cycle by the tumor-suppressor BRCA 1 requires the CDK-inhibitor p21^{Waf1/Cip1}. *Nature*. 1997; 389: 187-190.

Song S., Lambert P. F. Different responses of epidermal and hair follicular cells to radiation correlate with distinct patterns of p53 and p21 induction. *Amer. J. Pathol.* 1999; 155; No 4: 1121-1127.

Statistisches Bundesamt, 2006.

http://www.destatis.de/themen/d/thm_gesundheit.php#Todesursachen

Stillman B., Waga S., Li R., Hannon G., Beach D. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA-replication and repair. *Nature* 371: 534-537.

Sturzbecher H.-W., Donzelmann B., Henning W., Knippschild U., Buchhop S. P53 is linked directly to homologous recombination via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 1996, 15, No 8: 1992-2002.

Sung P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*. 1994; 265(5176): 1241-3.

Sutherland B. M., Bennett P. V., Sidorkina O., Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*, 2000; 39(27): 8026-31.

Sutherland B. M., Bennett P. V., Sutherland J. C., Laval J. Clustered DNA damages induced by x rays in human cells. *Radiat Res.*, 2002; 157(6): 611-6.

Takata M., Sasaki M. S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 1998; 17: 5497-508.

Tang W., Willers H., Powell S. N. P53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in γ -irradiated mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 1999; 59: 2562-2565.

Torres M., Al-Buhairi M., Sc. B., Alsbeih G. Induction of p53 and p21 proteins by gamma radiation in skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003, 58; No2: 479-484.

Valerie K., Povirk L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 2003; 22: 5792-5812.

Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994; 369:574-578.

Wagener C. Molekulare Onkologie. *Thieme Verlag*. 1999; 2. Auflage.

Wiesmüller L., Cammenga J., Deppert W. W. In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J. Virol*. 1996; 70(2): 737-44.

Willers H., McCarthy E. E., Alberti W., Dahm-Daphi J., Powell S. N. Loss of wild-type p53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol*. 2000; 76; No 8: 1055-1062.

Zhou J., Ahn J., Wilson S. H., Prives C. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J*. 2001; 20(4): 914-23.

8 Anhang

8.1 Materialien8.1.1 *Geräte*

Blotkammer	Mini trans blot cell, BioRad, München
Brutschrank	Heracell, Heraeus, Hanau
Coulter Counter	Modell Z1, Beckman Coulter, Krefeld
Dosimeter	Duplexdosimeter, PTW, Freiburg
Elektrophoresekammer	Mini proteau cell, Biorad, München
Kamerasystem	Night Owl, EG & G Berthold, Bad Wildbad
Netzgeräte	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
Photometer	Bio-Photometer, Eppendorf, Hamburg
Röntgenröhre	Seifert, Ahrensburg
Sicherheitswerkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Biofuge 15R, Heraeus, Hanau Labofuge 400 R, Heraeus, Hanau Microfuge R, Beckman Coulter, Krefeld Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

8.1.2 *Software*

WinLight 1.0, Makro basierend auf Optimas; Berthold, Bad Wildbad (*NightOwl, Western Blot*)

Graph Pad Prism 4.0 Auswertung, Abbildungen

8.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Lösungen für die Zellkultivierung:

Penicillin/ Streptomycin Lösung (Gibco):

10.000 IE/ml Penicillin
10.000 IE/ml Streptomycin

Trypsin-EDTA Lösung (Gibco):

0,5g/l Trypsin (1:250)
0,2g/l EDTA

Kulturmedium:

Dulbecco-minimum-essential-Medium (DMEM)
Mit 15 % fötalem Kälberserum (Gibco)

Puffer zur Proteinextraktion:

PBS (phosphat buffered saline):

140 mM NaCl
3,0 mM KCl
8,0 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄

Lysispuffer:

50 mM NaF
20 mM Hepes (ph 7,8)
450 mM NaCl
0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT
0,5 µg/ml Leupeptin
0,5 µg/ml Protease Inhibitor Pepstatin A
1,0 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor
0,5 µg/ml Aprotinin

40 µg/ml Bestatin
25 % Glycerol
0,5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid in
Isopropanol)

Puffer und Lösungen für Western-Blot:

5x Probenpuffer [Lämmler *et al.*, 1970]:

250 mM Tris-HCl; pH 6,8
500 mM DTT
10 % SDS
0,5 % Bromphenolblau
50 % Glycerol

1x Laufpuffer für die Elektrophorese (pH 8,3):

100 ml 10x Tris-Glycin Puffer
10 ml 10 % SDS-Lösung
ad 1 l

1x Transferpuffer nach Towbin:

200 ml 10 x TG-Puffer
400 ml Methanol
1,4 l Millipore-Wasser
10 ml 10 % SDS-Lösung

10x Tris-Glycin Puffer (TG-Puffer); pH 8,3:

1,92 M Glycin
0,25 M Trizma Base
ad 1 l

Isopropanol-Fixierlösung für Gel:

25%	Isopropanol
10%	Eisessig

Coomassie- Färbelösung für Gel:

2 mM	Coomassie Brilliant Blue R250
0,6 mM	Coomassie Brilliant Blue G250
42,5%	Ethanol
5%	Methanol
10%	Essigsäure

Entfärbelösung für Gel:

13%	Methanol
10%	Essigsäure

TBS (Trisma-Base Stammlösung) (pH 8):

1 M	Trisma-Base
ca.4,3%	HCl (pH-Einstellung)

TBS/Tween:

10%	TBS
0,1%	Tween 20
0,9%	NaCl

Tris-HCL Polyacrylamidgele (12%), BioRad,München

8.1.4 Antikörper

Primär-Antikörper:

p53

- Monoklonaler Maus Antikörper (DO-7; NovoCastra) gegen das humane p53. Konzentration: 1:1500 in 5 % Magermilch/PBS/Tween; über Nacht bei 4 °C

p21

- Monoklonaler Maus Antikörper (WAF 1 (Ab-1); Oncogene) gegen das humane und murine p21. Konzentration: 1:250 in 5 % Magermilch/PBS/Tween; über Nacht bei 4 °C

β-Actin

- Monoklonaler Maus Antikörper (AC-15; Sigma) gegen das humane β-Actin. Konzentration: 1:4000 in 5 % Magermilch/PBS/Tween; 1 h bei Raumtemperatur (RT)

Sekundär-Antikörper:

- Anti-Maus IgG, Peroxidase-markiertes Fc(ab')₂ Antikörperfragment vom Schaf (Amersham Pharmacia Biotech); Konzentration 1:4000 in 5% Magermilch/PBS/Tween, 2 h bei RT

8.2 Abkürzungen

AF	Aarhus Fibroblasten
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BAX-Protein	bcl x aktivierendes Protein
BCL-2-Protein	B cell Lymphoma 2-Protein
BRCA1/BRCA2	Breast cancer type1 /2 susceptibility protein
CDK	Cyclin-dependent kinase
KFGE	Konstantfeld Gelelektrophorese
DMEM	Dulbecco minimum essential Medium
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DSB	Doppelstrangbruch
ECL	Enhanced Chemoluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FEN1-Protein	Flap Endonuklease 1-Protein
FKS	Fötale Kälberserum
Gy	Gray
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase
HWZ	Halbwertszeit
KCl	Kaliumchlorid
MDM2	Murine Double Minute Chromosome-2
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MRE11	Meiotic recombination 1
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ	Nicht homologes Endjoining
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAD50/RAD52/RAD54	Radiation 50/Radiation52/Radiation54
RB-Protein	Retinoblastom-Protein
RPA	Replication Protein A
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SE	Strahlenempfindlichkeit
SF	Surviving Fraction
TBS	Trisma-Base-Stammlösung
TNF	Tumornekrosefaktor
XRCC2/XRCC3/XRCC4	X-ray repair cross complementing 2/3/4
γ -H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und der übergeordneten Betreuung möchte ich Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Kasten-Pisula, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit hervorragend betreut hat. Nicht nur beim wissenschaftlichen Teil, sondern auch bei allen anderen Herausforderungen hat sie mir zur Seite gestanden und mich mit Rat und Tat unterstützt. Vielen Dank für die Geduld und die Korrektur meiner Arbeit, sonst wäre sie wahrscheinlich immer noch nicht fertig.

Vielen Dank auch an das Laborteam Frau Tanja Ubben, Frau Britta Riepen und Frau Jutta Schäfer für die lustige Zeit und die Einführung in den Laboralltag.

Ebenso danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Labors für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit .

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und vor allem für die Motivation, diese Arbeit fertigzustellen, danken.

Als letztes möchte ich mich bei meinem Freund Sven vom Herzen bedanken, da er all` meine Launen ertragen hat und immer an mich geglaubt hat.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kristina Gahr
Geburtsdatum/-ort: 19.05.1978, Elmshorn
Anschrift: Nordender Weg 22a
25336 Elmshorn

Schulbildung:

09/1984 - 06/1988 Grundschule Klein Nordende
08/1988 - 05/1997 Bismarckschule Elmshorn
Schulabschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1997 – 05/2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/1999 Abschlussprüfung der medizinischen Vorklinik
08/2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Tätigkeit:

10/1999 Beginn der Dissertation , Institut für Biophysik und Strahlenbiologie,
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Seit 07/2004 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum und anschließend als
Assistenzärztin für Innere Medizin, Klinikum Itzehoe

Elmshorn, den 29.05.2007

Kristina Gahr

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Elmshorn, den 29.05.2007

Kristina Gahr

