Aus dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey

"p53-Status und strahleninduzierter Zellzyklusarrest in humanen Tumorzelllinien"

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

> Florian Moritz Westphal aus Hamburg

> > Hamburg, 2007

Angenommen von der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.03.2008 Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. J. Dahm-Daphi Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Dikomey Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. D. Rades

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	11
2.1. Zellkultur	11
2.1.1. RT 112	11
2.1.2. DU 145	11
2.1.3. LNCaP	11
2.1.4. B8 T47D	12
2.1.5. WTK1	12
2.2. Bestrahlung und Dosimetrie	12
2.3. Western-Blot	12
2.3.1. Proteinextraktion	13
2.3.2. Proteinquantifizierung	14
2.3.3. Durchführung des Western-Blot	15
2.4. Flusszytometrie	18
2.4.1. Zellansatz und BrdU-Inkubation	19
2.4.2. Zellfixierung	19
2.4.3. Zellfärbung	19
2.4.4. Darstellung und Auswertung der flusszytometrischen Messung	
3. Resultate	21
3.1. Vorversuche	21
3.1.1. Zellwachstum	
3.1.2. Vorversuche zum Western-Blot	
3.1.3. Spezifitätsnachweis der Antikörper in den Zelllinien B8 T47D und RT	12 25
3.1.4. Vorversuche zur flusszytometrischen Messung	27

3.2. Proteininduktion von p53 und p21 nach Bestrahlung	. 28
3.2.1. Untersuchung der Zelllinie B8 T47D auf p53 und p21	. 29
3.2.2. Untersuchung der Zelllinie RT112 auf p53 und p21	. 30
3.3. Flusszytometrische Messungen	. 31
3.3.1. BrdU-Aufnahme-Kinetik	. 31
3.3.2.1. Zellzyklusanalyse von RT112	. 34
3.3.2.2. Zellzyklusanalyse von DU145	. 37
3.3.2.3. Zellzyklusanalyse von LNCaP	.41
3.3.2.4. Zellzyklusanalyse von B8 T47D	. 45
4. Diskussion	. 49
4.1. Proteinnachweis	. 49
4.1.1. Zelllinie B8 T47D	. 49
4.1.2. Zelllinien RT 112 und DU145	. 50
4.2. Möglichkeiten und Grenzen der flusszytometrischen Messung	. 51
4.2.1. Zellzyklusanalyse von RT112	. 53
4.2.2. Zellzyklusanalyse von DU145	. 54
4.2.3. Zellzyklusanalyse von LNCaP	. 54
4.2.4. Zellzyklusanalyse von B8 T47D	. 55
4.3. Zusammenhang von p53-Status und strahleninduziertem G1-und G2-Arrest	. 55
5. Zusammenfassung	. 58
Literaturverzeichnis	. 60

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Wachstumskurven der vier Tumorzelllinien
Abb. 2: Vergleich verschiedener Proteinextraktionsmethoden für die Western-Blot
Untersuchung
Abb. 3: Eliminierung unspezifischer Banden im Western-Blot
Abb. 4: Nachweis von p53 in der Zelllinie RT112 mittels Anti-p53-Antikörper (DO7)25
Abb. 5: Spezifitätsnachweis bei dem Nachweis von p53 in der Zelllinie B8 T47D26
Abb. 6: Flusszytometrische Messung der Zelllinie LNCaP nach 24h Inkubation in
unterschiedlichen Konzentrationen von BrdU (1 und 10 µmol/l)27
Abb. 7: Flusszytometrische Messung der Zelllinie B8 T47D nach 24h Inkubation in
unterschiedlichen Konzentrationen von BrdU (1 und 10 µmol/l)28
Abb. 8: Nachweis von p53 und ß-Aktin in der Zelllinie B8 T47D mittels der Western-Blot
Technik
Abb. 9: Nachweis von p21 und ß-Aktin in der Zelllinie B8 T47D mittels der Western-Blot
Technik
Abb. 10: Nachweis von p53 und ß-Aktin in der Zelllinie RT112 mittels der Western-Blot
Technik
Abb. 11: Nachweis von p21 und ß-Aktin in der Zelllinie RT112 mittels der Western-Blot
Technik
Abb. 12: BrdU-Aufnahme-Kinetik ohne sowie nach Bestrahlung mit 6 Gy32
Abb. 13: Exemplarische Darstellung der Gatesetzung zur Evaluierung eine
Punktwolkendiagrammes (dot-plot)
Abb. 14: dot-plots der Zelllinie RT112 ohne Bestrahlung
Abb. 15: dot-plots der Zelllinie RT112 mit Bestrahlung35
Abb. 16: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie RT112 ohn
sowie nach 6 Gy Bestrahlung
Abb. 17: dot-plots der Zelllinie DU145 ohne Bestrahlung
Abb. 18: dot-plots der Zelllinie DU145 mit Bestrahlung
Abb. 19: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie DU14
ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung40

Abb. 20: dot-plots der Zelllinie LNCaP ohne Bestrahlung4	-2
Abb. 21: dot-plots der Zelllinie LNCaP nach 6 Gy Bestrahlung4	3
Abb. 22: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie LNCa	ιP
ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung4	5
Abb. 23: dot-plots der Zelllinie B8 T47D ohne Bestrahlung46	5
Abb. 24: dot-plots der Zelllinie B8 T47D nach 6 Gy Bestrahlung4	7
Abb. 25: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie B8 T47	D
ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung4	8
Abb. 26: Schematische Darstellung des BrdU-Einbau während 2 Zellzyklen52	2
Abb. 27: Halblogarithmische dot-plot Darstellung5	3
Tabelle 1: Dauer eines temporären G1- und G2-Arrests sowie prozentualer Anteil an Zeller	n,
welche einen permanenten G-Arrest nach Bestrahlung aufweisen	4

1. Einleitung

In der heutigen Medizin stellt die Krebserkrankung weiterhin eine Herausforderung bezüglich Diagnose, Früherkennung sowie therapeutischen Optionen dar. Bösartige Neubildungen stellten im Jahre 2002 25,6% der Todesursachen in Deutschland dar (Statistischen Bundesamt, Stand 17.02.2004).

Die therapeutischen Möglichkeiten bestehen vorwiegend aus operativen Maßnahmen, Chemotherapie sowie der Strahlentherapie. Je nach Tumorentität sowie Stadium kommen die genannten Optionen zum Einsatz, teilweise mit ausgesprochen unterschiedlichen Erfolgsaussichten. Die Tumorbestrahlung wird in etwa 50% der Behandlungen eingesetzt (Rodemann et al., 1999).

Die molekulare Strahlentherapie beschäftigt sich mit der Optimierung strahlentherapeutischer Ansätze. Dabei kommt es unter anderem zu der Fragestellung, ob es im Vorfeld Möglichkeiten gibt, das individuelle Ansprechen auf die Bestrahlung des Tumors durch entsprechende Tests vorauszusagen. Essentiell ist dazu das Verständnis der Strahlentherapie sowie deren Wirkung auf das Zellüberleben.

Durch Bestrahlung werden DNA-Schäden erzeugt. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Schäden repariert werden. Dieses geschieht während des strahleninduzierten Arrest in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus und somit vor Replikation des genetischen Materials (Lane, 1992) beziehungsweise vor der Mitose (Nagasawa et al., 1994). Werden diese Schäden nicht repariert, kann die Zelle durch den programmierten Zelltod (Apoptose), Verlust der Teilungsfähigkeit (mitotischer Zelltod) oder einen permanenten Zellzyklusarrest inaktiviert werden. Über diese Mechanismen kann durch die Strahlentherapie eine Tumorheilung beziehungsweise eine Tumorverkleinerung erreicht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nicht-reparierbare DNA-Strangbrüche, insbesondere Doppelstrangbrüche, diese Prozesse verursachen und ihre Anzahl folglich mit der Strahlensensitivität korreliert (Dikomey and Dahm-Daphi, 1994; Dahm-Daphi et al., 1994).

Diese Vorgänge sind genetisch streng kontrolliert. Verschiedene derartiger Regulationsmechanismen sind in Tumorzellen jedoch verloren gegangen. Auf molekularer Ebene sind verschiedene Gene bekannt, welche Einfluss auf die Strahlenantwort haben. In Tumoren finden sich gehäuft mutierte Formen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Weinberg, 1989). Onkogene sind in der Regel durch eine Überfunktion, Tumorsuppressorgene durch einen Funktionsverlust gekennzeichnet. Die molekularen Veränderungen dieser Gene scheinen somit einen großen Einfluss auf das Ansprechen einer Strahlentherapie zu haben (Hallahan, 1996; Maity et al., 1997).

Das Tumorsuppressorgen p53 ist mit etwa 50% das am häufigsten veränderte Gen in menschlichen Tumoren (Hollstein et al., 1991). Zudem sind hereditäre Syndrome (z.B. Li-Fraumeni-Syndrom) bekannt, welche eine p53-Keimzellmutation oder einen Funktionsverlust vorweisen und durch eine vermehrte Krebsinzidenz gekennzeichnet sind (Srivastava et al., 1990; Lu and Lane, 1993). Aktuelle Überblicke über somatische und Keimzellmutationen finden sich in der IARC TP53 Mutation Database (Olivier et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wird deshalb der Einfluss von p53 auf die zelluläre Strahlenantwort untersucht.

P53 wurde 1979 als zelluläres Protein entdeckt (Lane and Crawford, 1979), welches mit dem großen Tumorantigen des Affenvirus SV40 komplexiert. Lokalisiert wurde das Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13) (Benchimol et al., 1985; McBride et al., 1986). Das Protein umfasst 393 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53kD. Es sind verschiedene Domänen bekannt, welche die Transaktivierung von stromabwärts gelegenen Genen, die DNA-Bindung und die Oligomerisierung regulieren (Levine, 1997; Srinivasan et al., 1993; Wang et al., 1994). Im Verlauf des Zellzyklus variiert der p53-Proteingehalt mit einem Maximum in der frühen S-Phase (Shaulsky et al., 1990). Zellzyklusunabhängig kommt es in Wildtyp-Zellen nach exogener DNA-Schädigung durch etwa ionisierende Strahlung, UV-Licht oder Actinomycin D zu einer Hochregulierung von p53 (Fritsche et al., 1993; Maltzman and Czyzyk, 1984), wobei es nur zu einem geringen Anstieg der p53-mRNA kommt. Als Hauptmechanismus für die Anreicherung des Proteins wird nicht die Neu-Transkription, sondern eine posttranslationale Modifikation angesehen, wodurch es zu einer Stabilisierung des p53-Protein und somit zu einer Verlängerung der Halbwertszeit kommt (Fritsche et al., 1993). In der Zelle liegt p53 in Assoziation mit MDM2 vor, dem Produkt des MDM2-Gens (murine double minute chromosome-2), welches das p53-Protein der schnellen ubiquitin-abhängigen Degradation zuführt (Freedman and Levine, 1999; Haupt et al., 1997). Durch die Bindung von MDM2 an das Nterminale Ende von p53 wird dessen transaktivierende Eigenschaft blockiert (Momand et al., 1992; Kussie et al., 1996). Da p53 wiederum als Transkriptionsfaktor für MDM2 fungiert, kommt es zu einer Autoregulationsschleife dieser beiden Proteine (Freedman and Levine, 1999; Picksley and Lane, 1993; Woo et al., 1998). Nach ionisierender Strahlung wird die Aminosäure Serin an Position 15 durch die Proteinkinase ATM und ATR phosphoryliert (Gobert et al., 1999; Leiter et al., 1996), wodurch die Bindungsaffinität von MDM2 zu p53 aufgehoben wird und es somit zu einer Akkumulation des p53-Protein kommt.

Aufgrund der herausragenden Stellung in Bezug auf den Erhalt der genomischen Integrität wurde p53 auch als "guardian of the genom" bezeichnet (Lane, 1992). Unter anderem durch die Eigenschaft als Transkriptionsfaktor für eine Anzahl von "Downstream-Effektoren" hat p53 Einfluss auf Apoptose, DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation.

Apoptose: Der Mechanismus des physiologischen, "programmierten Zelltodes" wurde erstmals 1972 beschrieben (Kerr et al., 1972). Es kommt zu einer Volumenreduktion mit Aufspaltung der Zellbestandteile, welche phagozytiert werden, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt (Kerr et al., 1972). Die p53 vermittelte Apoptose wird durch die Transkription von BCL-2 (B-cell-Lymphoma-2-Protein) sowie BAX (bcl-x-aktivierendes-Protein) erreicht (Miyashita and Reed, 1995; Chao and Korsmeyer, 1998). Ein BAX-Überschuss führt zu einer Bildung von BAX-Homo-Dimeren, welches durch Cytochrom c-Freisetzung die Apoptoseinduktion triggert. BCL-2 ist in der Lage mit BAX Komplexe zu bilden und somit zu hemmen (Yin et al., 1995; Rosse et al., 1998; Oltvai et al., 1993).

Neben der p53 vermittelten Apoptose sind noch weitere Signalketten bekannt, welche zu einer Apoptoseinduktion führen (Cuende et al., 1993; Clarke et al., 1993).

DNA-Reparatur-Mechanismen: p53 moduliert zum einen durch Bindung an XPB/D (Wang et al., 1995; Ford and Hanawalt, 1995) die Nukleotid-Exzisions-Reparatur, als auch durch Transkription von NER-Reparatur Proteinen wie GADD45 und PCNA (Leiter et al., 1996). Desweiteren ist p53 durch Transaktivierung von hMSH2 am Mismatch-Reparatursystem beteiligt (Scherer et al., 1996). Ein weiterer Einfluss von p53 besteht für die homologe Rekombination, wobei ein mutiertes p53 erhöhte Raten (3-100 fach) der HR zeigte (Mekeel et al., 1997; Dudenhoffer et al., 1998). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass intaktes p53 auch fehlerbehaftetes "nicht-homologes endjoining" unterdrückt (Dahm-Daphi 2005). *Zellzyklusregulation:* Während des Zellzyklus sind zwei Restriktionspunkte, der G1/S- und

der G2/M-Checkpunkt, bekannt, welche auch in Bezug auf die Strahlentherapie eine

wesentliche Rolle zu haben scheinen. Werden Zellen an diesen Checkpunkten arretiert, besteht die Möglichkeit, dass entstandene DNA-Schäden repariert werden und die Zellen im Anschluss den Zellzyklus weiter durchlaufen (transienter Arrest) oder permanent blockiert werden und dem programmierten Zelltod zugeführt werden.

Bezüglich des G1-Arrests hat p53 über das "Downstream-Effektor" Protein p21 Regulationsmöglichkeiten (el Deiry et al., 1994; Dulic et al., 1994; Noda et al., 1994). P21 ist ein universeller Inhibitor der Cyklin-abhängigen Kinasen (CDK) (Kuerbitz et al., 1992; el Deiry et al., 1994) und hat, wie im Folgenden beschrieben, Einfluss auf den G1-Restriktionspunkt: Der Phosphorylierungsstatus des RB (Retinoblastom)-Proteins ist maßgeblich für die Progression im Zellzyklus. Für die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins, welches den Übergang von Zellen von der G1- in die S-Phase triggert, ist der Komplex von Cyclin-E und CDK2 erforderlich (Draetta, 1994; Hunter, 1992). Zusätzlich wird durch die Phosphorylierung des RB-Proteins unter anderem der Transkriptionsfaktor E2F-1 stabilisiert, der wesentlichen Einfluss auf die proliferativen Signale hat, die die Progression in die Synthesephase und die nachfolgende Zellteilung hat (s.a. Wagener 1996).

Dieser Theorie folgend, wurde ein p53-abhängiger G1-Arrest durch Transkription von p21 und der dadurch bedingten Inhibierung der Cyklin-abhängigen Kinasen in Fibroblasten-Zelllinien gefunden (Linke et al., 1997; Di Leonardo et al., 1994). In Tumorzellen wird dieser Regulationsmechanismus allerdings kontrovers diskutiert. In einigen Tumorzelllinien konnte ein strahlendinduzierten p53-abhängigen G1-Arrest nachgewiesen werden, bei anderen Zelllinien wurde kein p53-abhängier G1-Arrest gefunden (Li et al., 1995; Lin et al., 1992; Nagasawa et al., 1998; Zolzer et al., 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass p53 unabhängige Kontrollmechanismen einen Einfluss auf den G1-Arrest in Tumorzellen zu haben scheinen (Little et al., 1995).

Mehrere redundante Regulationsmechanismen des G2-Arrests nach Bestrahlung werden in der Literatur diskutiert. Die Aktivierung des Cyklin B1-Cdk1 Komplexes wird als notwendig für den Übergang von G2 in die Mitose gesehen (Hwang and Muschel, 1998). Der Einfluss von p53 auf den G2-Arrest ist durch die Induktion von CDK-Inhibitoren, wie p14-3-3 σ (Hermeking et al., 1997; Peng et al., 1997) und p21 (Agarwal et al., 1995) zu erklären. Zudem scheint ein weiteres p53 induziertes Gen, GML, Einfluss auf den G2 Arrest zu haben (Kagawa et al., 1997). Da p53 mutierte oder defiziente Zellen diese DownstreamEffektoren nicht induzieren, diese allerdings dennoch einen G2-Arrest aufweisen (Hwang and Muschel, 1998; Kaufmann et al., 1997; Kastan et al., 1991), werden weitere p53 unabhängige Regulationswege über Proteine der MPM-2 Familie diskutiert (Dahm-Daphi 2000).

Über die beschriebenen Funktionen kann p53 Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von humanen Tumorzelllinien nehmen. In der Literatur finden sich Hinweise, dass eine erhöhte Strahlenresistenz mit einem mutierten p53-Status korreliert. Allerdings finden sich auch gegensätzliche Studienergebnisse, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine einheitliche Aussage über die Rolle des p53-Status auf die Strahlenempfindlichkeit gemacht werden kann (Dahm-Daphi 2000). Das Wissen über diesen Zusammenhang kann zum weiteren Verständnis des Ansprechens eines Tumors auf die Strahlentherapie beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ausgewählte Tumorzelllinien einerseits bezüglich des p53-Status zu untersuchen und den Zusammenhang zu einem strahleninduzierten G1-und G2-Arrest zu evaluieren. Diese Studie ist Teil eines Gesamtprojektes, welches zum Ziel hat, die Rolle von p53 bezüglich der Strahlenempfindlichkeit in humanen Tumorzelllinien zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Für die Versuchsreihen wurden fünf humane Zelllinien verwandt, die im Folgenden vorgestellt werden.

2.1.1. RT 112

Die Zelllinie RT112 entstammt einem humanen Blasenkarzinom. Eine Charakterisierung dieser Zelllinie erfolgte 1986 von Masters (Masters et al., 1986).

Die Zellkultur wurde als Monolayer in Gewebekulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, UK) gehalten. Als Nährmedium wurde RPMI 1640 (Gibco BRL, D) unter Zusatz von Na-Pyruvat, L-Glutamin, 10% FCS (fötalem Kälberserum, Gibco BRL, D) und zur Unterdrückung von Infektionen 1% PS (Penicillin/Streptomycin) verwendet. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO² Atmosphäre. Die Zellen wurden zweimal pro Woche mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, D) vom Flaschenboden abgelöst, um sie im Folgenden in niedrigerer Konzentration entsprechend des Versuchsprotokolls wieder anzusetzen. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Zell-Counter (Casy 1, Schärfe System) verwendet.

2.1.2. DU 145

Die Zelllinie DU145 wurde 1978 aus der Gehirnmetastase eines humanen Prostatakarzinoms isoliert (Stone et al., 1978). Sowohl Nährmedium als auch die Kulturbehandlung entspricht den Ausführungen zu der Zelllinie RT112.

2.1.3. LNCaP

Die aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines humanen Prostatakarzinom gewonnene Zelle LNCaP wurde 1977 in Kultur gebracht (Horoszewicz et al., 1983).

Als Nährmedium wurde RPMI 1640 unter Zusatz von 1g Bicarbonat/l, Na-Pyruvat, L-Glutamin, 10%FCS und 1%PS benutzt. Ansonsten entspricht die Kultivierung der von RT112 und DU145.

2.1.4. B8 T47D

Etabliert und charakterisiert wurde die ZelllinieT47D eines humanen Brustzellkarzinoms 1979 von Keydar (Keydar et al., 1979). Daraus wurde später der Subclon B8 isoliert. Als Unterschied zu den vorigen Zelllinien wurde als Nährmedium DMEM (Gibco BRL, D) unter Zusatz von 10% FCS und 1% PS verwendet. Die übrige Zellkulturbehandlung entspricht dem unter 2.1.1. erörterten Prozedere.

2.1.5. WTK1

Levy et al. isolierten 1968 die Lymphoblastenzelllinie WI-L2 aus einer menschlichen Milz (Levy et al., 1968). Durch Mutationsinduktion mittels ICR-191 wurde der Klon HH4 gewonnen und die Zelllinie WTK1 etabliert (Benjamin et al., 1991). Im Gegensatz zu den bisher genannten Zelllinien wächst diese in Suspension. Als Medium wurde RPMI 1640 unter Zusatz von L-Glutamin, Na-Pyruvat und 10% FCS angeboten. Durch Zugabe von Medium wurde eine maximale Zelldichte von $0.8 \cdot 10^6$ Zellen/ml nicht überschritten.

2.2. Bestrahlung und Dosimetrie

Für die Bestrahlung der Zellkulturen wurde eine 200 kV Röntgenröhre (Ivovolt 320, Rich Seifert & Co, Ahrensburg, D) mit einem Röhrenstrom von 13 mA und einer Zusatzfilterung von 0,5mm Kupfer verwendet. Die Dosimetrie erfolgte mittels eines Duplex-Dosimeters (PTW Freiburg, D). Zur Eichung wurde ein Strontium-Radium-Standard benutzt. Die Zellen wurden in allen Versuchen bei Raumtemperatur mit einer Energiedosis von 6 Gy

(1Gy/min) bestrahlt.

2.3. Western-Blot

Um die Kinetik der Proteinexpression von p53 und p21/WAF1/CIP1 nach Bestrahlung zu messen und zu interpretieren, wurde in dieser Arbeit die Methode des Western-Blots angewandt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, das gesuchte Protein semiquantitativ, also im Vergleich mit anderen Proben, nachzuweisen. Das Prinzip dieser Methode lässt sich in fünf Schritten erklären:

 Proteinextrakte werden mittels Gel-Elektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt und mit Hilfe eines elektrophoretischen Transfers auf eine Membran übertragen.

- Unspezifische Bindungsstellen der Membran werden durch Inkubation mit Milchprotein geblockt.
- Ein primär gegen das gesuchte Protein gerichteter Antikörper wird der Membran angeboten.
- Dann wird mit einem 2. Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, inkubiert. An diesen 2. Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt.
- Der Antikörper-Peroxidase-Komplex setzt dann enzymatisch ein luminiszierendes Substrat um, mithilfe dessen das Protein auf einem Fotofilm sichtbar gemacht werden kann.

Die Methode des Protein-Blotting wurde erstmals von Renart sowie Bowen beschrieben (Renart et al., 1979; Bowen et al., 1980). Die Modifikation, den Proteintransfer mittels eines elektrischen Gradienten zu erreichen, wurde in der Arbeit von Towbin (Towbin et al., 1979) erstmalig dargestellt.

2.3.1. Proteinextraktion

Für die Versuche wurden Proteinextrakte von unbestrahlten Zellen als auch von Zellen nach unterschiedlichen Zeitintervallen nach einer Bestrahlung von 6 Gy benötigt. Dazu wurde das "Freeze and Solve"-Verfahren nach Finnie (Finnie et al., 1995) angewandt. Die Tumorzellen wurden den vorher erstellten Wachstumskurven (Abb. 1) nach entsprechend so angesetzt, dass an dem jeweiligen Zeitpunkt der Proteinextraktion eine Zellzahl von 2x10⁷ zur Verfügung stand. Als nächster Schritt war die Herstellung eines möglichst Medium- und Trypsin-freien Zellpellets notwendig. Dieses wurde erreicht, indem die Zellen mittels der Trypsin-EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und in 8ml eiskaltem PBS¹ aufgenommen wurden. Nach 8-minütiger Abzentrifugation bei 1000 UpM und einer Temperatur von 4°C wurde das Pellet erneut in 8ml PBS resuspendiert und nach oben genanntem Schema pelletiert. Nach Wiederholung dieses Vorgangs wurde das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das

¹ Phosphate Buffered Saline (1,15g Na₂HPO₄·H₂O+0,2g KH₂PO₄+8,0g NaCl+0,2g KCl ad 1 l aq.dest.)

nun gereinigte Zellpellet dem Volumen nach abgeschätzt und in gleicher Menge Extraktionspuffer² vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Flüssigstickstoff eingetaucht und im direkten Anschluss in einem auf 30°C vorgeheiztem Wasserbad aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um die Zellmembranen aufzubrechen. Nach Abzentrifugation des Zelldetritus (10 Minuten/4°C/12000UpM) wurde der Überstand, der das Proteinextrakt darstellt, in ein steriles Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Proteinquantifizierung

Um ein Gel mit einer definierten Menge an Protein beladen zu können, wurde eine Proteinquantifizierung vorgenommen. Dazu wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) hinzugezogen, welche auf dem Prinzip beruht, dass sich das Absorbtionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blue G-250, sobald es an Proteine gebunden wird, von 465nm auf 595nm verändert (Sedmak and Grossberg, 1977; Reisner et al., 1975). Dadurch kann die gemessene Extinktion als proportional dem Proteingehalt angesehen werden.

In der Durchführung dieser Methode wird eine definierte Verdünnungsreihe (0,625 bis 20 μ g/ml) von Rinderserumalbumin (1mg/ml; BSA-Proteinstandard, Sigma, USA) hergestellt und nach Zugabe von 200 μ l Dye-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, München, D) auf 800 μ l Proteinlösung die photometrische Extinktionen bei 595nm der einzelnen Proben gemessen. Mit Hilfe dieser Werte lässt sich die Steigung m der Eichgeraden durch die Formel:

 $\sum x(\text{Konz.}\mu g/\text{ml}) \cdot y(\text{Extinktion}) / \sum x^2 = m$

berechnen. Nach Anfertigung einer Verdünnungsreihe des Proteinextrakts (12µl Proteinextrakt 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 verdünnt mit Aqua bidest), Dye-Reagenz-

² 450mM NaCl, 20mM HEPES (pH 7,6), 25%(vol) Glycerol, 0,2 mM EDTA, 50mM NaF, 0,5mM DTT, 0,5µg/ml Leupeptin, 0,5µg/ml Pepstatin A, 1,0µg/ml Trypsin-Inhibitor, 0,5µg/ml Aprotinin, 40µg/ml Bestatin, 0,5mM PMSF in aqua dest.

Zugabe und Messung der Extinktion lässt sich die Konzentration des Proteinextrakts nach der Formel:

Konz. ($\mu g/ml$) = (absolute Extinktion / Steigung der Eichgeraden m) x Verdünnungsfaktor bestimmen.

Die Extinktionsmessungen wurden an einem Uvikon-Spectrophotometer (Kontron Instruments, Italy) durchgeführt.

2.3.3. Durchführung des Western-Blot

Um die Proteine ihrem Gewicht nach aufzutrennen, wurde das SDS-Page-Verfahren (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) angewandt. Für den Nachweis von p53 wurden 15µg des Proteinextraktes mit 10µl Ladepuffer³ vermischt und mit Aqua bidest auf 20µl aufgefüllt. Zum Nachweis von p21 wurden 40µg Proteinextrakt verwendet. Im Anschluss wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und die Taschen der Gele mit diesen Proben beladen. Es wurden für die Detektion von p53 12%-Tris-HCl-Polyacrylamid-Gele (Bio-Rad, München, D) verwandt. Für den Nachweis von p21 wurden 15%-Gele verwandt.

Um das Molekulargewicht der Proteinbanden zu bestimmen, wurde eine Geltasche mit einem Marker (ECL-Proteinmarker RPN 2107, Amersham, Braunschweig, D) beladen (1µl Marker + 9µl Ladepuffer).

Für den Gellauf wurde eine vertikale Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, München, D) benutzt, welche mit Laufpuffer⁴ aufgefüllt wurde. In der Sammelphase der Gele wurde für 10 Minuten ein Strom von 10mA angelegt. Im Anschluss wurden die Proteine mit einer Stromstärke von 25mA aufgetrennt. Diese Phase dauerte für den Nachweis von p53 65 Minuten und von p21 45 Minuten.

Die Proteine wurden mittels eines "Tank-Blot-Verfahrens" transferiert. Als Apparatur diente die "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad, München, D). Nachdem das Polyacrylamid-Gel und die PVDF-Membran (Porengröße 0,2µm, Bio-Rad,

³ 50mM TrisHCl (pH 6,8), 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycol in aqua dest.

⁴ Laufpuffer 5x: 15,1g Tris-Base, 72,0g Glycin, 5,0g SDS ad 11 aqua dest.

München, D) für 15 Minuten in Towbin-Transferpuffer⁵ equallibriert wurde, wurde ein "Gel-Sandwich" aus zwei "fiber pads", zwei Filterpapieren, der PVDF-Membran und dem Polyacrylamid-Gel geschichtet. Da die PVDF-Membran hydrophobe Eigenschaften besitzt, wurde diese vor der Equallibrierung für 5 Sekunden in Methanol geschwenkt. Nachdem dieses "Sandwich" in die dafür vorgesehene Halterung eingebracht wurde, wurde diese in die Kammer vertikal eingehängt. Die Transfer-Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und unter ständiger Kühlung für zwei Stunden eine Spannung von 100 Volt angelegt. Durch den elektrischen Gradienten wurden die Proteine von dem Gel auf die PVDF-Membran in Richtung Anode transferiert.

Im Anschluss wurde die Membran mittels Milchprotein geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Dazu wurde die Membran für zwei Stunden in TBS-Puffer⁶ mit 15% Magermilchpulver (Sigma,, Deisenhofen, D) geschwenkt.

Nach Waschen (20 Minuten) der Membran in TBS/0,1%Tween20 (Sigma, USA)-Waschpuffer (TBS/T-Puffer) wurde die Membran für eine Stunde mit dem ersten Antikörper inkubiert. Für die Detektion von p53 wurde ein monoklonaler Mausantikörper (Anti-p53-Antikörper Clone DO-1, (AB6), Oncogene Research, Cambridge, MA, USA), der gegen die N-terminale DO-1-Domäne des p53-Protein gerichtet ist, verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:500 angesetzt. Es wurde sich für diesen p53-Antikörper entschieden, da in diesem Labor als auch in der Arbeit von Bonsing (Bonsing et al., 1997) gezeigt werden konnte, dass dieser sowohl mutiertes als auch wildtyp-p53 detektiert.

Bei dem Nachweis von p21/WAF 1 wurde der monoklonale Anti-p21-Mausantikörper (Anti-p21-Antikörper Clone EA10, (AB-1), Oncogene Research, Cambridge, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 benutzt. Den Lösungen wurde jeweils 5% Magermilchpulver hinzugegeben, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die PVDF-Membran zu minimieren.

Um nachzuweisen, dass die Geltaschen mit der gleichen Menge an Protein beladen wurden, wurde der Antikörperlösung der Anti-β-Aktin-Antikörper (Anti-β-Aktin-Antikörper Clone

⁵ 192mM Glycin, 25mM Tris-Base, 0,0037% SDS, 20% Methanol in aqua dest.

⁶ 20mM Tris-Base, 0,9% NaCl in aqua dest.

AC-40, Sigma, Deisenhofen, D) hinzugefügt (1:1000 verdünnt). β -Aktin ist ein Strukturprotein, welches in jeder Zelle vorkommt und unabhängig von Bestrahlung exprimiert wird. Das Molekulargewicht beträgt 42 kD.

Nach einem 45 minütigem Waschvorgang mit TBS/T-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:500 verdünnt). Dabei handelte es sich um einen Anti-Maus-IgG-Antikörper (Amersham, London, UK), der gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist. Zusätzlich wurde Milchprotein (5%) zugefügt.

Als Verdünnungslösung wurde für die verschiedenen Antikörper jeweils TBS/0,02% Thimerosal (Sigma, USA) verwendet.

Die Markerbanden wurden vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper von der übrigen Membran abgetrennt und für zwei Stunden gewaschen. Für die Detektion der Banden wurden diese für eine Stunde mit Meerrettich-Peroxydase konjugiertem Streptavidin (Amersham, London, UK) inkubiert (1:1000 verdünnt mit TBS-Puffer).

Die Antikörper-Lösungen wurden für eine Stunde mittels TBS/T von den Membranen gewaschen. Nachdem der abgetrennte Membranteil mit der Markerbande kongruent wieder angefügt wurde, wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht, indem diese Membran für eine Minute mit ECL-Reagenz (Amersham, D) überschichtet wurde. Durch das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym, die Meerrettich-Peroxydase, wird die Oxidation des im ECL-Reagenz enthaltenen Luminols unter Lichtemission katalysiert. Damit konnten lichtempfindliche Filme (Hyperfilm ECL, Amersham, D) exponiert werden.

Die auf dem Fotofilm sichtbaren Proteinbanden wurden mittels eines Scanners digitalisiert und durch das Computerprogramm UN-SCAN-IT^{™gel} (Silk Scientific Corp, Brem, UT, USA) ausgewertet. Relative Intensitätsunterschiede der Proteinsignale nach Bestrahlung konnten sowohl prozentual als auch graphisch dargestellt werden, indem das Signal der unbestrahlten Zelle als Ausgangswert und die folgenden Werte in Relation dazu gesetzt wurden.

2.4. Flusszytometrie

Mit Hilfe des Flusszytometers (FACScan, [Fluorescence Activated Cell Sorter], Becton & Dickinson, Heidelberg, Germany) wurden zweiparametrige Intensitätsmessungen durchgeführt. Bei der Flusszytometrie werden Zellbestandteile mit Fluorochromen markiert, die nach Anregung mittels eines Lasers das Licht absorbieren und in einem anderen Wellenlängenbereich wiederum Licht emittieren. Die Intensität dieses emittierten Lichtes kann als Maß für die Farbstoffmenge beziehungsweise als Maß für den mit dem jeweiligen Fluorochrom markiertem Zellbestandteils angesehen werden.

Als Farbstoffkombination wurde in dieser Arbeit Propidium-Iodid (PI) und Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gewählt. Diese Fluorochrome haben die Eigenschaft, sowohl im gleichen Wellenlängenbereich (455nm bis 490nm) anregbar zu sein, als auch unterschiedliche Emissionsspektren zu haben, so dass ihre Intensitäten simultan und unabhängig voneinander gemessen werden können (Crissman and Steinkamp, 1973; Stohr et al., 1978). FITC wurde bei 541nm ±16nm, PI oberhalb von 620nm gemessen.

In dieser Arbeit wurde sowohl der DNA-Gehalt einzelner Zellen einer Population als auch deren Progression im Zellzyklus bestimmt. Zur flusszytometrischen Darstellung des DNA-Gehaltes wurden die Zellen mit Propidium-Iodid inkubiert, welches zwischen die Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren interkaliert (Crissman et al., 1975). Um zu dokumentieren, dass eine Progression der Zellen im Zellzyklus stattfand, wurden diese mit BrdU (5-Bromo-2'-Desoxy-Uridin, Sigma, USA) inkubiert, einem Thymidin-Analogon, welches während der S-Phase anstelle von Tymidin in die DNA eingebaut wird. Durch Kopplung eines monoklonalen Mausantikörper an BrdU, der seinerseits durch einen Anti-Maus-Antikörper, welcher mit FITC markiert ist, detektiert wird, kann eine Steigerung der Emissionsintensität im FITC-Spektrum als Einbau von BrdU gewertet werden.

Da das Bromodesoxy-Uridin in der Kette der Pyrimidin-Biosynthese sowohl die Aspartat-Transcarbamylase als auch die Dihydro-Orotase hemmt, kommt es somit zu einer verminderten Synthese von Cytidin. Um dieses Minderangebot auszugleichen wurde bei der Inkubation mit BrdU auch jeweils Cytidin (Cytosine β -D-riboside, Sigma, USA) in äquimolaren Verhältnis zugesetzt. Im Folgenden soll dieses impliziert sein.

Die Methodik, DNA-Analysen vorzunehmen, indem mittels eines Antikörpers das aufgenommene BrdU detektiert wird, wurde erstmals 1982 von Gratzner vorgestellt (Gratzner, 1982).

2.4.1. Zellansatz und BrdU-Inkubation

Die Zellen wurden entsprechend den Wachstumskurven (Abb. 1) in 250ml Kulturflaschen so angesetzt, dass bei Fixierung der Zellen eine Zellzahl von $2x10^6$ zur Verfügung stand. Um den Zellen Zeit zu geben ohne den Einfluss von BrdU und Bestrahlung anzuwachsen, wurde 24 Stunden nach Zellansatz mit der BrdU-Inkubation und gegebenenfalls Bestrahlung begonnen.

Zur Inkubation wurde die minimale BrdU-Konzentration gewählt, die einerseits keinen Einfluss auf die Zellproliferation zeigte und andererseits eine optimale Signalantwort im Flusszytometer garantieren konnte. Diese Parameter wurden bei den Zelllinien RT112, DU145 und LNCaP bei einer BrdU-Konzentration von 1µmol/l erreicht. Bei der B8 T47D-Zelle wurde eine Konzentration von 5µmol/l verwendet (3.1.4.).

2.4.2. Zellfixierung

Zur weiteren Behandlung mussten die Zellen fixiert werden. Mittels einer Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst, in 8ml PBS aufgenommen und 4 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert. Das weitgehend vom Medium befreite Zellpellet wurde in 2ml 0,1% Trislösung resuspendiert und unter Schütteln in 4ml 70% Alkohol vorsichtig eingeträufelt. Diese Suspension wiederum wurde in 6ml 96% Alkohol langsam eingeträufelt und konnte in diesem Zustand im Gefrierschrank bei –20°C aufbewahrt werden.

2.4.3. Zellfärbung

Die in Alkohol fixierten Zellen wurden abzentrifugiert (1200UpM/8 Minuten), in 2ml einer 2N HCL-0,1% TritonX -Lösung resuspendiert und 30 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad gelagert. Nach Hinzugabe von 3ml 0,1M Borat und anschließender Zentrifugation (1200UpM/5 Minuten) wurde das Zellpellet in 3ml 0,1M Borat resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Nach einem Säuberungsschritt mit 3ml PBS wurde das Pellet in 1ml PBT-Ziegenserum (PBT: 5 ml Tween20 ad 1000 ml PBS; PBT-Ziegenserum – 250µl Ziegenserum [Gibco, inaktiviert bei 56°C, 30min.] ad 50ml PBT) 15 Minuten im Dunkeln gelagert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 100µl Anti-BrdU (Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine, Dako, 1:100 verdünnt mit PBT-Ziegenserum) resuspendiert und

1 Stunde unter Lichtschutz inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und 15 Minuten Inkubation in PBT-Ziegenserum wurden die Zellen erneut pelletiert und nach Abzentrifugation für 1 Stunde in 100µl goat-antimouse-FITC (FITC-Conjugated F(ab')2 Fragment of Goat Anti-Mouse Immunoglobulines, Dako, 1:40 verdünnt mit PBT-Ziegenserum) in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde, nach zweimaliger Waschung mit PBS, das Zellpellet in 1ml Propidium-Iodid (Calbiochem-Novabiochem, D) unter Lichtschutz für 15 Minuten gefärbt. Diese Suspension wurde unter Verwendung eines Gaze-Filters (Porengrösse 53µm, Sefar, Schweiz), der größere Zellverklumpungen auffängt, in ein FACS-Röhrchen überführt. Bis zur anschließenden Messung am Flusszytometer wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4.4. Darstellung und Auswertung der flusszytometrischen Messung

Zur Messung am FACS-IV-Rechner wurde die Gesamtzahl der zu messenden Ereignisse auf n=5000 gesetzt. Die Ergebnisse der flusszytometrischen Messungen wurden in Punktwolkendiagrammen (dot-blots) dargestellt. Auf der Abzisse wird die Rotfluoreszenz (Propidium-Iodid) dargestellt, die als ein Maß für den DNA-Gehalt der Zelle steht. Die Ordinate beschreibt die Grünfluoreszenz (FITC), in der der BrdU-Einbau in die jeweilige Zelle abgelesen werden kann. Da auch immer Zelltrümmer und andere Verunreinigungen mitgemessen werden, die in den unteren Kanälen beziehungsweise Zellverklumpungen, die aufgrund des höheren DNA-Gehalts in den oberen horizontalen Kanälen abgebildet werden, wurden diese Messdaten bei der Auswertung ausgeschlossen. In den dot-blots kann auf der Abszisse zwischen Zellen unterschieden werden, die einen einfachen DNA-Gehalt haben (G1-Zellen), die einen doppelten DNA-Gehalt besitzen, und sich somit in G2/M befinden und zwischen Zellen, die in der S-Phase sind und sich daher in dem Areal zwischen G1-und G2/M ansiedeln. Auf der Ordinate ist der BrdU-Einbau dargestellt. Mit Kenntnis dieser Parameter kann zwischen unmarkierter und mit BrdU markierter G1-, S-und G2/M-Phase differenziert werden. Die Auswertung der dot-blots wurde mit dem Programm WinMDI 2.8, die statistischen Auswertung sowie graphischen Darstellungen mit Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt. In den Graphen sind der Mittelwert zweier Versuche sowie die Standardabweichung dargestellt.

3. Resultate

3.1. Vorversuche

3.1.1. Zellwachstum

Es wurden Wachstumskurven der vier Tumorzelllinien erstellt. Ziel war es, einerseits die Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellen zu messen und andererseits den Einfluss von BrdU und Bestrahlung auf das Zellwachstum zu bestimmen.

Es wurden jeweils 10⁵ Zellen angesetzt und in 24h-Abständen die Zellzahl gemessen. Bei der Zelllinie LNCaP wurde zum Vergleich der unbehandelten Zellen zu den mit Bestrahlung und BrdU-Zugabe eine Anfangszellzahl von 5x10⁵ gewählt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde einen Tag nach Ansatz der Zellen BrdU hinzugegeben und in einer dritten zusätzlich zur Zugabe des Thymidinanalogons die Zellen mit 6 Gy bestrahlt. In Abb. 1 ist zu erkennen, dass das Angebot von BrdU keine wesentliche Wachstumshemmung nach sich zieht. Für die zusätzlich bestrahlten Zellen hingegen wurde ein leicht gehemmtes Wachstum in allen Zelllinien gesehen. Anhand dieser Wachstumskurven wurden die Zellzahlen abgelesen, die in den unterschiedlichen Versuchen benötigt wurden.



Abb. 1: Wachstumskurven der vier Tumorzelllinien Auf den Graphen ist die absolute Zellzahl gegen die Wachstumszeit in Stunden aufgetragen. Die Zellen sind unbehandelt, nach BrdU-Zugabe sowie nach BrdU-Zugabe und Bestrahlung untersucht worden.

3.1.2. Vorversuche zum Western-Blot

Es wurden drei Methoden zur Proteinextraktion getestet, die sich in der Zusammensetzung des Extraktionspuffers und der anschließenden Behandlung der Zellpellets unterschieden. Es handelte sich um die Methode nach Willers (unveröffentlicht), nach Woudstra (unveröffentlicht), und nach Finnie (Finnie et al., 1995). Die Verfahren unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Zusammensetzung des Protein-Lyse-Puffers (Willers: 1% Triton X100, 1mmol Tris-HCl (pH 7,4), 150mmol NaCl,, 5mmol EDTA, 1mmol Na-Orthovanadat, 1mmol Aprotinin, 1mmol PMSF; Woudstra: 0,5% Triton X100, 10mmol

Tris-HCl (pH 7,4), 10mmol NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1mmol PMSF, 0,0125 mg/ml DNaseI ; Finnie et al. s. 2.3.1). Die Methode nach Finnie et al. wurde für die Versuche dieser Arbeit beibehalten, da mit dieser Methode einerseits eine ausreichend hohe Konzentrationen an Proteinextrakten hergestellt werden konnte und andererseits diese das stärkste Signal im Western-Blot zeigte (Abb. 2).



Abb. 2: Vergleich verschiedener Proteinextraktionsmethoden für die Western-Blot-Untersuchung. Es wurden jeweils 40µg Proteinextrakt der Zelllinie RT112 aufgetragen und eine Detektion von p53 vorgenommen. Je nach Proteinextraktion ist das p53-Signal in unterschiedlicher Intensität zu sehen. M: Marker-Bande A: Extraktionsmethode nach Finnie et al. B: Extraktionsmethode nach Willers C: Extraktionsmethode nach Woudstra

In der Quantifizierung dieser Proteinbanden zeigte sich in Relation zur Methode nach Finnie eine um 30% verminderte Intensität bei der Extraktion nach Willers und eine ~80% Intensitätsminderung bei der Methode nach Woudstra.

Der Proteintransfer wurde neben dem angewendeten Tank-Blot-Verfahren auch mittels einer Semi-Dry-Methode (Kyhse-Anderson, 1984; Bjerrum, Schafer-Nielsen, 1986) getestet. Das Tank-Blot-Verfahren erwies sich in der Handhabung als einfacher und zuverlässiger und wurde deshalb in der Folge verwendet.

Des Weiteren wurde neben einem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,45 μ m, Hybond ECL, Amersham, D) die PVDF-Membran getestet, da letztere eine gegenüber Nitrozellulose etwa doppelt so starke Protein-Bindungs-Kapazität von 170-200 μ g/cm² aufweist (Herstellerangaben Bio-Rad, München, D). Das gilt insbesondere bei Verwendung von SDS-haltigem Transferpuffer.

Es stellte sich heraus, dass bei Verwendung der Nitrozellulose-Membran einerseits das p53-Signal schwächer und andererseits das unspezifische Hintergrundsignal erheblich stärker ausgeprägt war (Western-Blot nicht gezeigt). Nach Modifikationen im Versuchsablauf -Verlängerung der Transferzeit auf 2 Stunden, Hinzufügen von 5% Magermilchpulver zu den Antikörperlösungen und Erhöhung der Antikörperkonzentrationen - konnte unter Verwendung der PVDF-Membran zuverlässig ein klares Proteinsignal mit minimalem Hintergrundsignal erreicht werden. Somit wurde die PVDF-Membran für die weiteren Versuchsreihen beibehalten.

Durch das Hinzufügen des Magermilchpulvers zu den Antikörperlösungen konnten auch unspezifische Proteinbanden minimiert beziehungsweise eliminiert werden. Es handelte sich um eine Bande bei ~68kD, die sowohl bei Untersuchungen der Zelllinie B8 T47D, RT112 als auch WTK1 zu erkennen war. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Signal durch den zweiten, unspezifischen Antikörper hervorgerufen wurde. Bei der Inkubation mit ausschließlich diesem Maus-IgG-Antikörper wurde diese Bande ebenfalls sichtbar. Durch Hinzugabe von Magermilchpulver zu den Antikörperlösungen konnte dieses Signal eliminiert werden (Abb. 3 a, b).



Abb. 3: Eliminierung unspezifischer Banden im Western Blot.
(a) M: Markerbande ; Bande 2 und 3 zeigt die Zelllinie B8 T47D bzw. RT112 nach Inkubation mit ausschließlich dem 2. Antikörper ; Bande 4 zeigt die Zelllinie RT112 nach Inkubation mit dem p53-AK sowie 2. AK
(b) M: Markerbande ; die restlichen Banden wurden mit den entsprechenden Zellinien beladen und mit dem p53-AK sowie 2. AK inkubiert. Im Unterschied zu (a) wurde hier 5% Magermilchpulver zu den Antikörperlösungen gegeben. Die unspezifische Bande bei ~68kD ist nicht zu detektieren.

Es ist anzunehmen, dass es sich um ein Protein handelt, welches kreuzantigene Eigenschaften mit dem 2. Antikörper besitzt.

Des Weiteren war bei der Detektion von p53 bei der Zelllinie RT112 eine Proteinbande bei

~36kD zu erkennen, die sich im zeitlichen Verlauf analog dem p53-Signal verhielt. Es war keine Regulation nach Bestrahlung sichtbar. Um zu eruieren, ob diese Proteinbande unspezifisch oder ob sie durch den Anti-p53-Antikörper hervorgerufen wurde, wurden zwei Modifikationen im Versuchsablauf vorgenommen. Zum einen wurde gezeigt, dass diese Bande auch bei einer Erhöhung der Milchproteinkonzentration auf 15% in der ersten Antikörperlösung in gleicher Ausprägung vorhanden ist (Abbildung nicht gezeigt). Zudem wurde ein unterschiedlicher Antikörper (Anti-p53-Antikörper (DO7), Amersham, D) verwendet. Auch bei Testung dieses Antikörpers ist die Bande bei ~36kD vorhanden (Abb. 4). Es ist daher anzunehmen, dass es sich um ein Protein handelt, welches kreuzantigene Eigenschaften mit dem p53-Antikörper besitzt. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich dabei um die p53 splice-Variante Δp53 handelt (Rohaly et al., 2005).



Abb. 4: Nachweis von p53 in der Zelllinie RT112 mittels Anti-p53-Antikörper (DO7) Es ist das Proteinlevel sowohl von p53 in unbestrahltem Zustand und 2, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung zu erkennen. Bei etwa 36kD ist in gleich bleibender Intensität eine Bande zu erkennen. Der Proteinmarker (M) gibt Aufschluss über das Molekulargewicht der gezeigten Banden. Als Positiv-Kontrolle dient WTK1.

Um festzustellen, ob die Geltaschen mit der gleichen Menge an Proteinen beladen waren, wurde auch der Nachweis von α -Tubulin durchgeführt. Dabei handelt es sich um den Hauptbestandteil der Mikrotubuli, die in jeder Zelle unabhängig von Bestrahlung vorhanden sind. Der ersten Antikörperlösung wurde der α -Tubulin-Antikörper (Monoclonal Anti- α -Tubulin, Clone B-5-1-2, Sigma, USA) hinzugegeben. Bei der Detektion von p21 konnte bei 50kD eine klare Bande des α -Tubulin erkannt werden. Bei dem Nachweis von p53 konnte diese Bande allerdings nicht sicher von der p53-Bande unterschieden werden (Western-Blot nicht gezeigt). Für die weiteren Versuche wurde der Nachweis von β -Aktin bevorzugt.

3.1.3. Spezifitätsnachweis der Antikörper in den Zelllinien B8 T47D und RT112

Um herauszuarbeiten, ob sowohl der p53-Antikörper als auch der p21-Antikörper als spezifisch für das jeweils gesuchte Protein angesehen werden kann, wurden sowohl Positiv-

als auch Negativ-Kontrollen durchgeführt.

Als Positiv-Kontrolle bei dem Nachweis von p53 wurde die Zelllinie WTK1 verwandt. Diese Zelle exprimiert bekanntermaßen mutiertes p53. Bei Western-Blot-Analysen in den Arbeiten von Wenz und Xia wurde ein basal hohes p53-Signal für diese Zelle beschrieben (Wenz et al., 1997; Xia et al., 1995). In diesem Labor konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Böhnke 2001), so dass WTK1 als Positiv-Kontrolle verwendet wurde. Als Positiv-Kontrolle bei dem Nachweis von p21 wurde die Prostata-Ca-Zelllinie LNCaP hinzugezogen. In diesem Labor wurde zuvor gezeigt, dass es in dieser Zelle innerhalb von 6 Stunden nach Bestrahlung zu einer 6-fachen Hochregulierung des p21-Signals kommt (Böhnke 2001).

Als Negativ-Kontrolle wurden Teile der Membran abgetrennt und einzig mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Dadurch ließ sich eruieren, ob die sichtbaren Banden durch den ersten, proteinspezifischen Antikörper oder den zweiten, unspezifischen Antikörper hervorgerufen wurden. Beispielhaft ist dieses für die Zelllinie B8 T47D bei dem Nachweis von p53 gezeigt (Abb. 5). In den Abbildungen 9-11 sind diese Negativkontrollen mit "2.AK" gekennzeichnet.



Abb. 5: Spezifitätsnachweis bei dem Nachweis von p53 in der Zelllinie B8 T47D M: Markerbande, WTK1: Positivkontrolle, B8 T47D von 0-24h nach Bestrahlung, Negativkontolle: 2 Banden auf denen B8 T47D-Proteinextrakt (6h nach Bestrahlung) aufgetragen wurde, welche jedoch nur mit dem 2. AK inkubiert wurden.

3.1.4. Vorversuche zur flusszytometrischen Messung

Als erster Schritt wurde die Zellzahl bestimmt, mit der zuverlässig 5000 Ereignisse pro Messung gezählt werden konnte. Dazu wurden die Zellen in einer Anzahl von $5x10^5$ bis $3x10^6$ fixiert und zur flusszytometrischen Messung vorbehandelt. Aufgrund von Zellverlusten bei dem Vorgang der Zellfärbung zeigte sich, dass eine Ausgangszellzahl von $2x10^6$ nötig war.

Es wurde die BrdU-Konzentration festgelegt, mit der die Tumorzellen inkubiert werden sollten. Als Kriterien galten zum einen, dass kein Einfluss des BrdU auf das Zellwachstum auftreten sollte und, dass die Konzentration ausreichte, um in der flusszytometrischen Messung ein optimales Signal zu erhalten. Es wurden die vier Tumorzellen mit einer BrdU-Konzentration von 1, 2, 5 und 10µmol für 24h inkubiert. Es stellte sich heraus, dass für die Zelllinien RT112, DU145 und LNCaP ein Angebot von 1µmol ausreichte, einen maximalen Einbau des BrdU in die jeweilige Zelle zu erreichen. Repräsentativ ist dieses in der Abb. 6 für die Zelllinie LNCaP dargestellt.

Für die Mamma-Ca Zelllinie B8 T47D war eine Konzentration des BrdU von 5µmol nötig (Abb. 7).



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 6: Flusszytometrische Messung der Zelllinie LNCaP nach 24h Inkubation in unterschiedlichen Konzentrationen von BrdU (1 und 10µmol/l).



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 7: Flusszytometrische Messung der Zelllinie B8 T47D nach 24h Inkubation in unterschiedlichen Konzentrationen BrdU (1-10µmol/l).

Um zu eruieren, ob dieses BrdU-Angebot einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum auslöste, wurden Wachstumskurven erstellt (Abb. 1). Es konnte keine Zellwachstumsinhibierung festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die BrdU-Zugabe für Zellzyklusveränderungen in dem untersuchten Zeitintervall nicht verantwortlich ist.

3.2. Proteininduktion von p53 und p21 nach Bestrahlung

In diesem Teil der Arbeit wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Bestrahlung von 6 Gy die Proteinexpression von p53 und p21 mittels der Western-Blot-Technik bestimmt, um eine Aussage über den p53-Status und die p53-Funktion machen zu können.

3.2.1. Untersuchung der Zelllinie B8 T47D auf p53 und p21

In der Abb. 8 wird ein Blot gezeigt, auf dem sowohl p53 als auch β -Aktin nachgewiesen werden. In unbestrahltem Zustand ist p53 in geringem Maße nachweisbar. Nach zwei Stunden ist das Signal um das 5,3-fache angestiegen, und sinkt nach 6 Stunden auf das 2,7-fache und nach 24 Stunden auf das 2,25-fache des basalen Wertes ab. Es ist also postradiatio eine Regulierung der p53-Antwort nachzuweisen.

Das β -Aktin-Signal, welches bei 42kD zu erkennen ist, ist auf allen Banden in gleicher Ausprägung sichtbar. Dieses zeigt, dass die Geltaschen mit der gleichen Menge an Proteinen beladen wurden.



Abb. 8: Nachweis von p53 und β -Aktin in der Zelllinie B8 T47D mittels der Western-Blot-Technik. Es ist das Proteinlevel sowohl von p53 als auch β -Aktin der Zelllinie B8 T47D in unbestrahltem Zustand und 2, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung zu erkennen. Postradiatio wird eine Regulierung der p53-Antwort deutlich. Das β -Aktin-Signal ist zu jedem Zeitpunkt in identischer Intensität nachzuweisen. Als Positiv-Kontrolle dient WTK1 mit einer starken Überexpression von p53.

Die Abb. 9 zeigt den Nachweis von p21. Für die Zelllinie LNCaP ist 6 Stunden nach Bestrahlung ein deutlicher Anstieg des p21-Signal auf das 6-fache des basalen Wertes erkennbar. Auch die Zelllinie B8 T47D zeigt eine Regulierung der p21-Antwort. Bereits 2 Stunden nach Bestrahlung hat sich die Intensität des p21-Signal verdoppelt. Im weiteren zeitlichen Verlauf erhöht sich der Wert auf das 2,3-fache (nach 6 Stunden) bzw. auf das 3,4fache (nach 24 Stunden) des basalen p21-Proteingehaltes.



Abb. 9: Nachweis von p21 und β -Aktin in der Zelllinie B8 T47D mittels der Western-Blot-Technik.

Es ist das Proteinlevel sowohl von p21 als auch β -Aktin der Zelllinie B8 T47D in unbestrahltem Zustand und 2,6 und 24 Stunden nach Bestrahlung zu erkennen. Postradiatio wird eine Hochregulierung der p21-Antwort deutlich. Das β -Aktin-Signal ist zu jedem Zeitpunkt in identischer Intensität nachzuweisen. Als Positiv-Kontrolle dient LNCaP mit bekanntem p21-Anstieg postradiatio. Die Negativkontrolle zeigt kein Proteinnachweis.

3.2.2. Untersuchung der Zelllinie RT112 auf p53 und p21

Abb. 10 zeigt den Nachweis von p53. Es ist ein basal hohes Level von p53 zu erkennen, welches 2, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung in gleichem Ausmaß vorhanden ist. Es kommt, im Gegensatz zur B8 T47D Zelle (Abb 9) postradiatio zu keiner Regulierung der p53-Antwort.



Abb. 10: Nachweis von p53 in der Zelllinie RT112 mittels der Western-Blot-Technik. Der Proteinmarker (M) gibt Aufschluss über das Molekulargewicht der gezeigten Banden. Als Positiv-Kontrolle dient WTK1. Die Negativkontrolle zeigt kein Proteinnachweis.

Bei der Detektion von p21 stellt sich heraus, dass es zu keinem Zeitpunkt, weder unbestrahlt noch nach Bestrahlung, zu einer p21-Induktion kommt und somit kein messbares Signal im Western-Blot zu erkennen ist (Abb. 11).



Abb. 11: Nachweis von p21 in der Zelllinie RT112 mittels der Western-Blot-Technik. Der Proteinmarker (M) gibt Aufschluss über das Molekulargewicht der gezeigten Banden. Als Positiv-Kontrolle dient LNCaP mit bekanntem p21-Anstieg postradiatio. Negativkontrolle ohne Proteinnachweis.

3.3. Flusszytometrische Messungen

In dieser Arbeit wurden flusszytometrische Messungen vorgenommen, um eine Aussage über die Zellzyklusprogression und einen G1- und G2-Arrest nach Bestrahlung der einzelnen Zelllinien treffen zu können.

3.3.1. BrdU-Aufnahme-Kinetik

In Abb. 12 ist zu erkennen, dass nach 48-stündiger BrdU-Inkubation 100% der RT112-Zellen –unabhängig von Bestrahlung- das BrdU inkorporiert haben. Es ist allerdings auffällig, dass bei den mit 6 Gy bestrahlten Proben nach 8 Stunden eine Verzögerung des BrdU-Einbaus eintritt, der etwa 10 Stunden anhält und im Folgenden sich dem unbestrahlten Wert wieder angleicht.

Ähnliches ist auch bei der Zelle DU145 zu beobachten (Abb. 12). Nach 12 Stunden BrdU-Inkubation nach Bestrahlung ist ein Einbaustop zu erkennen, der 6 Stunden anhält und sich bis zum 48-Stunden-Wert den unbestrahlten Proben angleicht. Nach 48 Stunden haben ebenfalls alle Zellen das BrdU inkorporiert.

Für die Zelllinie B8 T47D ist kein eindeutiger Unterschied in den Kurvenverläufen zu eruieren (Abb. 12). Es ist zu erkennen, dass nach 24 Stunden etwa 80% der Zellen – unabhängig von Bestrahlung- mit BrdU markiert sind und es im Folgenden zu keiner Zunahme kommt. Es ist festzuhalten, dass 20%-30% der Zellen nicht an einer Zellzyklusprogression teilnehmen.

Die Zelllinie LNCaP zeigt im unbestrahlten Zustand eine zunehmende BrdU-Markierung,

die nach 24 Stunden eine Plateauphase von etwa 90% erreicht hat. Die bestrahlten Proben zeigen nach 2 Stunden einen Einbau-Stop, der 10 Stunden anhält. Im Folgenden inkorporieren Zellen wieder BrdU. Nach 24 Stunden haben 60% BrdU eingebaut. Dieser Anteil erhöht sich bis 96 Stunden auf etwa 78% aller Zellen (Abb. 12).



Abb. 12: BrdU-Aufnahme-Kinetik ohne sowie nach Bestrahlung mit 6 Gy. Es ist der Anteil BrdU-positiver Zellen an der Gesamtpopulation gegen die BrdU-Inkubation aufgetragen.

3.3.2. Zellzykluseffekte nach Bestrahlung

Zur Evaluation eines G1-Arrestes wurde die 1. G1-Phase sowie die S-Phase bestimmt (Abb. 13: A, C). Eine Plateauphase beziehungsweise Anstieg der 1.G1-Phase sowie ein Abfall der S-Phase spricht für den Beginn einen G1-Arrest. Das Ende eines temporären Arrests ist durch einen prozentualen Abfall der 1. G1-Phase sowie ein Anstieg der S-Phase gekennzeichnet. Die Zelldifferenz der 1. G1-Phase zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben am Ende des Evaluierungszeitraumes wurde zur Quantifizierung des permanenten G1-Arrestes gewählt.

Zur Evaluierung des G2-Arrestes wurde die 1. G2- sowie die 2. G1-Phase (Abb. 13: B, E) bestimmt. Der Beginn war durch eine relative Zunahme der 1. G2-Phase gekennzeichnet. Ein Eintritt der Zellen in die 2. G1-Phase wurde als Ende des G2-Arrestes gewertet. Die Zelldifferenz der 1. G2-Phase zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben am Ende des Evaluierungszeitraumes wurde zur Quantifizierung eines eventuellen permanenten G2-Arrests bestimmt. Da in den Zelllinien RT112 und DU145 die wesentlichen Unterschiede innerhalb von 48h zu sehen waren, ist nur dieser Untersuchungszeitraum in den dot-blots sowie graphischen Darstellungen gezeigt.



Abb. 13: Exemplarische Darstellung der Daten-Fenster (Gates) zur Evaluierung eines Punktwolkendiagrammes (dot plot)

A: 1.G1-Phase (ungelabelt)

C: S-Phase (Beginn der BrdU-Inkorporation) D: 2.G2/M-Phase (gelabelt) B: 1.G2/M-Phase (ungelabelt)

E: 2.G1-Phase (gelabelt)

3.3.2.1. Zellzyklusanalyse von RT112

Die dot-blots zeigen den relativen BrdU-sowie DNA-Gehalt (gemessen als PI-Färbung) zu definierten Zeiten ohne (Abb. 14) und nach 6 Gy Bestrahlung (Abb. 15). In den unbestrahlten Proben nehmen die Zellen kontinuierlich BrdU auf und es kommt bereits nach 12h zum Übertritt von Zellen aus der G2-Phase in die 2. G1-Phase (siehe Gate Abb. 15). Im bestrahlen Zustand nehmen die G1-Zellen ebenfalls kontinuierlich BrdU auf, doch kommt es bis zum Zeitpunkt 12h zu einer deutlichen Akkumulation von Zellen in G2. Die ersten Zellen treten erst nach 18h in die 2. G1-Phase über (Gate Abb. 16). Nach 48h ist jedoch kein Unterschied im Zellzyklus darzustellen. Alle Zellen haben BrdU inkorporiert.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 14: dot-blots der Zelllinie RT112 ohne Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen den relativen DNA-Gehalt, gemessen als Propidium-Iodid-Konzentration, aufgetragen.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 15: dot-blots der Zelllinie RT112 nach 6 Gy Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen den relativen DNA-Gehalt, gemessen als Propidium-Iodid-Konzentration, aufgetragen.

Die dot-blot Messungen wurden ebenfalls zu anderen Zeitpunkten durchgeführt, so dass eine kontinuierliche Kinetik des Zellzyklus bestimmt werden konnte. In der Abb. 16 ist der prozentuale Anteil von Zellen in den angegebenen Zellzyklusphasen dargestellt. Für die 1.G1-Phase (Abb. 16, A) ist im unbestrahlten Zustand ein nahezu kontinuierlicher Abfall zu erkennen, wobei sich nach 18 Stunden nur noch 1,1% der Zellen in dieser Zellzyklusphase befinden. Die bestrahlten Proben differieren in sofern, als dass die Zellzahl zunächst stetig abfällt und nach 12 Stunden ein erneuter leichter Anstieg zu erkennen ist (von 5,45% auf
6,35%). Nach 18 Stunden fällt dieser Anteil im Verlauf wieder auf das Niveau der unbestrahlten Zellen ab. Dadurch, dass die Anzahl der G1-Zellen in der bestrahlten Probe rascher abfällt als in der unbestrahlten Probe, scheint ein Übertritt in die S-Phase nicht behindert zu sein, was folglich einen G1/S Block unwahrscheinlich macht.

Die Kinetik der unmarkierten G2-Phase Zellen (Abb. 16, B) ist ebenfalls unterschiedlich. Ohne Bestrahlung ist ein kontinuierlicher Abfall der Zellen in der 1.G2-Phase zu erkennen, so dass nach etwa 8 h alle Zellen aus der 1. G2- in die G1-Phase übergetreten sind. Nach 6 Gy Bestrahlung fällt der Anteil unmarkierter G2-Zellen weniger steil ab und erst nach 24h sind alle Zellen durch die Mitose gegangen, so dass sich aus der Gesamtkinetik eine Verzögerung der G2/M-Phase ergibt.

Die BrdU-Markierung in der S-Phase verläuft in behandelten und unbehandelten Zellen zunächst parallel (Abb. 16, C). Es ist allerdings ein verminderter Anteil der bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Proben bis 18h erkennbar (12h-Wert: 0 Gy-26,85%; 6 Gy-16,3%). Im Folgenden fallen die nicht bestrahlten Proben kontinuierlich ab, wohingegen die bestrahlten Proben zwischen 18 und 24h zunächst leicht ansteigen (6,9% auf 7,6%) und im Anschluss abfallen. Die prozentual geringere Zellzahl in den bestrahlten Proben bis 18h ist damit zu erklären, dass Zellen aufgrund der beschriebenen G2-Verzögerung nicht in die G1-Phase übertreten können. Der diskrete Anstieg der S-Phase Zellen nach 18 Stunden in den bestrahlten Proben ist mit dem Mehrangebot an Zellen nach Beendigung des G2-Blocks vereinbar.

Passend zu dem beschriebenen G2-Block ist bis 12h eine deutliche Akkumulation von G2-Zellen in den bestrahlten Population erkennbar (vergleiche Abb. 14 und 15; 12h dot-plot).

Im Anschluss an die 2.G2-Phase treten die Zellen erneut in die G1-Phase über. Unbestrahlt zeigt sich ein Anstieg bei 12h (Abb. 16, D), für die bestrahlten Proben erst nach 18h, welches zu dem Zeitpunkt durch die Auflösung des G2-Blocks erklärbar ist.



Abb. 16: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie RT112 ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung.

3.3.2.2. Zellzyklusanalyse von DU145

Die dot-blots der Zelllinie DU145 zeigen für die unbestrahlten Proben (Abb. 17) eine kontinuierliche BrdU-Aufnahme mit einem Zellübertritt von der 2. G2 in die 2. G1-Phase nach 12h. In den bestrahlten Proben (Abb. 18) ist eine deutliche Akkumulation von Zellen in der G2-Phase zu sehen. Der Übertritt von Zellen in die 2. G1-Phase erfolgt erst bei 18h. In beiden Zellpopulationen haben nach 48h alle Zellen BrdU inkorporiert.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 17: dot-blots der Zelllinie DU145 ohne Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen die relative Propidium-Iodid-Konzentration aufgetragen.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration



Abb. 19 zeigt die Kinetiken der verschiedenen Zellzyklusphasen. Dabei findet sich insgesamt ein ähnlicher Verlauf wie bei den RT112 Zellen. Es zeigt sich ebenfalls ein rascher Abfall der unmarkierten G1-Phase Zellen in der bestrahlten Population (Abb. 19, A), welches gegen das Vorliegen eines G1-Blocks spricht. Zudem ist eine verzögerte Abnahme unmarkierter G2-Zellen (Abb. 19, B) sowie auch eine verzögerte Zunahme markierter G1-Zellen (Abb. 19, D) mit einer deutlichen Akkumulation der G2-Population

(Abb. 17 und 18, 12h dot-plot) in den bestrahlten Proben erkennbar. Alles spricht dafür, dass auch hier ein ausgeprägter G2-Block vorliegt, der 2h nach Bestrahlung beginnt und etwa 12h anhält.



Abb. 19: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie DU145 ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung.

3.3.2.3. Zellzyklusanalyse von LNCaP

Eine kontinuierliche BrdU-Aufnahme von unbestrahlten Zellen mit einem Übergang in die 2. G1-Phase nach 12h ist in Abb. 20 zu beobachten. Auffällig ist der Anteil an Zellen, welche auch nach 48h noch kein BrdU inkorporiert hat. Die bestrahlten Proben (Abb. 21) zeigen für die ersten 12 h praktisch keinen BrdU-Einbau (sehr geringer Zellanteil in der S-Phase). Zudem ist eine Akkumulation von Zellen in der G2-Phase zu beobachten. Die ersten Zellen treten erst nach 18h Zellen in die 2.G1-Phase über. Nach 48h hat ein Anteil von Zellen noch kein Brdu inkoporiert.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 20: dot-blots für unbestrahlte LNCaP Zellen zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen die relative Propidium-Iodid-Konzentration aufgetragen.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 21: dot-blots der Zelllinie LNCaP nach 6 Gy Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen die relative Propidium-Iodid-Konzentration aufgetragen.

Die Analyse der unterschiedlichen Phasenanteile (Abb. 22) differiert von den Zelllinien

DU145 und RT112. Unbestrahlt fällt der Zellanteil der 1.G1-Phase kontinuierlich ab (Abb. 22, A), wohingegen es bei den bestrahlten Proben nach anfänglichem Abfall zu einem Plateau kommt das über 10h anhält während dessen die Zellen nicht in die S-Phase übertreten. In unbestrahlten Proben nimmt der Anteil markierter S-Phase Zellen rasch auf etwa 30% zu und fällt danach ab. Nach Bestrahlung bauen die Zellen anfangs für 2h BrdU ein, danach nimmt der Anteil aktiv replizierender Zellen dramatisch ab um erst nach 12h erneut anzusteigen (Abb. 22, C). Dieses Verteilungsmuster ist mit einem temporären G1-Block von 2-12h zu erklären. Neben den Zellen, die verzögert die DNA-Synthese aufnehmen findet sich sowohl in bestrahlten wie auch unbestrahlten Zellen ein Teil der überhaupt kein BrDU aufnimmt und somit nicht proliferiert. Nach 96h verbleiben noch 8,8% (unbestrahlt) beziehungsweise 18,4% (bestrahlt) der Zellen in der 1.G1-Phase. Ein Anteil von etwa 10% ist also durch die Bestrahlung permanent arretiert.

Die 1.G2-Phase (Abb. 22, B) unterscheidet sich dahingehend, als dass der Zellanteil der bestrahlten Proben nach 2h langsamer abfällt als für die unbestrahlten Proben. Eine Zunahme der Zellpopulation der 2.G1-Phase (Abb. 22, D) stellt sich unbestrahlt bei 12h, für die bestrahlten Proben bei 18h ein. Analog zu den Zelllinien RT112 und DU145 ist dieses mit einem temporären G2-Arrest von 2-12h vereinbar.



Abb. 22: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie LNCaP ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung.

3.3.2.4. Zellzyklusanalyse von B8 T47D

Die dot-blots der Zelllinie B8 T47D zeigen einen kontinuierlichen BrdU-Einbau ohne wesentlichen Unterschied in der S-Phase. Es ist eine leichte Akkumulation von Zellen in G2 mit einem Übertritt in die 2.G1-Phase nach 12h in den bestrahlten Proben (Abb. 24) festzuhalten, wohingegen für die unbestrahlten Proben (Abb. 23) bereits nach 8h Zellen in der 2.G1-Phase detektiert werden können. Ähnlich wie in LnCaP Zellen verbleibt nach 24h sowohl in bestrahlten wie auch unbestrahlten B8 T47D Zellen ein gewisser Teil nicht mit BrdU markiert.



Relative Propidium-Iodid-Konzentration

Abb. 23: dot-blots der Zelllinie B8 T47D ohne Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen die relative Propidium-Iodid-Konzentration aufgetragen.



Abb. 24: dot-blots der Zelllinie B8 T47D nach 6 Gy Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten nach BrdU-Inkubation. Der relative BrdU-Gehalt ist gegen die relative Propidium-Iodid-Konzentration aufgetragen.

Der Kurvenverlauf der unbestrahlten 1.G1-Phase (Abb. 25, A) zeigt einen fast kontinuierlichen Abfall über 20 h auf einen Anteil von ~20%, während in bestrahlten Zellen der Anteil der unmarkierten G1-Zellen zunaechst abfällt, nach 2h ein Plateau bei 30% erreicht, zwischenzeitlich sogar zunimmt, nach 18h weiter langsam absinkt und nach 72h den Wert der Kontrollzellen erreicht. Dieses Ergebnis könnte einem G1-Block entsprechen, allerdings spiegelt der sich nicht in der Kinetik der S-Phase Zellen wider (Abb. 25, C), die anders als die von LnCaP Zellen, für bestrahlte und unbestrahlte Zellen identisch verläuft. Insgesamt kann man also einen G1-Block nicht sicher feststellen. Darüber hinaus ist auch der Strahleneffekt auf die G2-Phase wenig ausgeprägt. Es findet sich nach Bestrahlung eine geringfügig verzögerte Abnahme der unmarkierten G2 Zellen (Abb. 25, B) sowie eine ebenso geringe Verzögerung des Übertritts in die 2. G1-Phase (Abb 25, D). Somit lässt sich zwar ein G2-Block nachweisen, der jedoch nur relativ kurz (2-6h) erscheint. Daher kommt es nur zu einer minimalen Akkumulation der bestrahlten G2-Population (Abb. 23 und 24, 6h dot-plot).

Insgesamt bleiben nach 72 h sowohl in bestrahlten wie auch unbestrahlten Zellen 25-30% (G1- plus G2-Zellen) unmarkiert, die somit nicht proliferieren. Durch die Bestrahlung werden allerdings keine Zellen permanent arretiert. Damit weicht das Zellzyklusverhalten der B8-T47D Zellen sowohl von dem typischen Muster des wild-typs wie auch vom mutierten p53 ab.



Abb. 25: Darstellung der Zellzyklusverteilung im zeitlichen Verlauf der Zelllinie B8 T47D ohne sowie nach 6 Gy Bestrahlung.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang von p53-Status und strahleninduzierten Zellzyklusveränderungen in vier humanen Tumorzelllinien zu untersuchen.

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik wurde sowohl die Expression des p53-Proteins nach Bestrahlung als auch die Expression des "Downstream-Effektor"-Proteins p21 bestimmt, wodurch eine funktionelle Beurteilung der Transaktivierung durch p53 möglich wurde. Die Zellzyklusverteilung wurde durch flusszytometrische Messungen dargestellt.

Das p53-Protein spielt eine zentrale Rolle in Bezug auf die Strahlenantwort und Erhalt der genomischen Integrität. Durch ionisierende Strahlung erzeugte DNA-Schäden führen zu einer Erhöhung des p53-Levels und gleichzeitig zu einer funktionellen Aktivierung. Dadurch wird unter anderem die Transkription des "Downstream-Effektor"-Protein p21/WAF1 stimuliert, welches wesentlich für Regulationsmechanismen im Zellzyklus verantwortlich ist. Gegenstand der folgenden Diskussion soll sein, in welcher Weise die Zellzyklusregulation in den untersuchten Tumorzelllinien von deren p53-Status abhängt.

4.1. Proteinnachweis

Die Western-Blot-Analysen sollten zum einen Aufschluss über die Regulation der p53-Expression nach Bestrahlung geben und zum anderen die transkriptionelle Aktivierung von p53 über den Nachweis von p21 überprüfen. Da es denkbar ist, dass trotz intakter p53-Regulation die Funktion des Proteins gestört ist beziehungsweise umgekehrt die transkriptionelle Aktivität in falsch regulierten Zelllinien erhalten ist (Friedlander et al., 1996), wurde die Regulation von p21 hinzugezogen, um eine präzise Aussage über den funktionellen p53-Status der jeweiligen Tumorzelllinie treffen zu können.

4.1.1. Zelllinie B8 T47D

Bei der Mamma-Karzinom-Zelllinie B8 T47D kommt es nach Bestrahlung zu einer Hochregulierung von p53. Von einem basal niedrigen Level nimmt der p53-Gehalt zwei Stunden nach Bestrahlung den Maximalwert an und fällt im Folgenden wieder ab. Diese Art der Regulation spricht für einen wt-p53-Status (Xia et al., 1995; Wenz et al., 1997).

Die intakte transkriptionelle Aktivität wird durch die Induktion von p21 nachgewiesen. Es konnte sowohl für die Protein wie auch für die mRNA-Ebene gezeigt werden, dass wt-p53 notwendig ist, um nach Röntgenbestrahlung eine Induktion von p21 zu erreichen (Macleod et al., 1995, Dulic et al., 1994; El Deiry et al., 1994).

Die intakte Regulation von p53 als auch die Induktion von p21 lassen demnach den Schluss zu, dass die Zelllinie B8 T47D einen wt-p53 Status hat. Bestätigt wurde dieses, da bei der DNA-Sequenzierung der wesentlichen Exone 4-9 des p53-Gens in diesem Labor keine Mutationen gefunden wurden (Bohnke et al., 2004).

In der Literatur finden sich diesbezüglich unterschiedliche Angaben. Übereinstimmend mit dem Ergebnis dieser Arbeit wurde von Alban (Alban et al., 2001) ebenfalls ein wt-p53 Status für die Zelle B8 T47D gefunden, wohingegen in der Mehrzahl der Veröffentlichungen ein mutiertes p53 beschrieben wurde (Siles et al., 1996; Bartek et al., 1990; Casey et al., 1991; Ge et al., 1996; Mediavilla and Sanchez-Barcelo, 2000; Strano et al., 2002). Der Grund hierfür dürfte vor allem in der unterschiedlichen klonalen Entwicklung innerhalb der Labore liegen. Nach längerer Kulturzeit können sich in einem Labor p53-Mutationen entwickeln, im anderen jedoch (noch) nicht. Tritt irgendwann eine p53-Mutation auf, sollte sie aufgrund der damit verbundenen erhöhten Proliferationsrate die Wild-typ Population rasch verdrängt haben und die Zellinine zukünftig als mutiert erscheinen lassen.

4.1.2. Zelllinien RT 112 und DU145

In den Western-Blot-Analysen der Zelllinie RT112 wurde eine permanent hohe p53-Expression festgestellt. Es wurde keine Induktion durch Bestrahlung nachgewiesen. Da zu keinem Zeitpunkt nach Bestrahlung das p21-Protein exprimiert wurde, kann von einem transkriptional inaktiven p53 ausgegangen werden. Das Expressionsmuster von p53 und p21 lässt den Schluss zu, dass die Blasen-Karzinom-Zelllinie RT112 ein mutiertes p53 aufweist.

Verschiedene Arbeiten zeigten bereits, dass Zelllinien mit mutiertem p53-Status ein permanent hochreguliertes, funktionell beeinträchtigtes p53-Protein aufweisen (Hollstein et al., 1991; Bartek et al., 1991; Levine et al., 1991). Dabei bewirkt offenbar die Mutation die Proteinstabilisierung und den Schutz vor Abbau im Proteasom (Hall et al., 1991; Schlichtholz et al., 1992), so dass es denkbar ist, dass Mutationen im p53-Gen zu Störungen in der Autoregulationsschleife führen, selbst wenn die Mutation nicht die Bindungsdomaine des MDM2 betrifft (siehe Einleitung).

Die funktionelle Beurteilung bestätigend, konnte in diesem Labor nach PCR-Reaktion und Sequenzierung der Exons 4-9 im Kodon 248 eine "hotspot"-Mutation (CGG→CAG)

nachgewiesen werden (Bohnke et al., 2004).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde die Zelllinie RT112 in der Literatur als p53 mutiert beschrieben (Siles et al., 1996; Ribeiro et al., 1999; Valenzuela et al., 2000).

Sowohl das Expressionmuster von p53 sowie der fehlende Nachweis von p21 (nicht gezeigt) in DU145 Zellen als auch das Proliferationsverhalten zeigt genaue Parallelität zu RT112 Zellen, was auch auf das Vorliegen einer p53 Mutation in Du145 Zellen hinweist. Entsprechend konnte im Codon 274 eine Val nach Phen-Mutation (GTT \rightarrow TTT) nachgewiesen werden, was ebenfalls mit der Literatur übereinstimmte (Bohnke et al., 2004).

4.2. Möglichkeiten und Grenzen der flusszytometrischen Messung

Für die Versuche dieser Arbeit wurde die Möglichkeit genutzt, simultan den Einbau von BrdU als auch Propidium-Iodid zu messen. Dadurch ist es möglich, einerseits den DNA-Gehalt und andererseits die DNA-Synthese einzelner Zellen eines dynamischen Zellsystems zu evaluieren und in Relation zueinander zu beurteilen. In den Versuchen vorliegender Arbeit wurde den Zellen kontinuierlich BrdU angeboten, um im zeitlichen Verlauf den qualitativen und quantitativen BrdU-Einbau zu beurteilen. Durch die Bestimmung der Zellanteile in der unmarkierten G1-Phase sowie in der S-Phase konnte sicher der Anfang und das Ende eines temporären G1-Block festgestellt werden. Durch die Quantifizierung der G2-Phase sowie der ersten G1-Phase nach Bestrahlung konnte eine Aussage über die werden. Zum Dauer eines temporären G2-Block gemacht Ende des Untersuchungszeitraumes konnte der Anteil an Zellen bestimmt werden, welcher permanent durch Bestrahlung arretiert wurde.

Durch diese 2-parametrige Messung konnte auf Modifikationen, welche bei der einfachen DNA-Färbung nötig sind um den 1. G1-Checkpunkt zu beurteilen, verzichtet werden. Bei 1parametrigen Messungen kann eine Synchronisation der Zellen mittels "mitotischer Selektion" erreicht werden (z.B. über "mitotic shake-off", Nagasawa et al., 1998). Die Synchronisation ermöglicht es, die gesamte Zellpopulation in der frühen G1-Phase zu bestrahlen, bevor der G1/S-Checkpunkt erreicht ist, so dass eine qualitativ genaue Aussage über den 1. , frühen G1-Arrest erreicht werden kann. Nachteil dieser Methode ist, dass die frühe Ausprägung des G2-Arrests (hier 1. G2-Arrest) nicht bestimmt werden kann, da sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung keine Zellen in G2 befinden. Wie es in der Abbildung 13 dargestellt, bietet das hier gewählte Vorgehen einen weiteren Vorteil. Der Zellzyklus kann über zwei Mitosen hinweg verfolgt werden. Diese zweite Mitose betrifft Zellen, die bereits die S- und G2-Phase durchlaufen haben. Die Zellteilung führt dann zu einer neuen Population BrdU-markierter G1 Zellen (2. G1-Zellen). Dadurch lässt sich auf eine zweite Weise die Verweildauer in S und G2-Phase einschließlich der jeweiligen Blockierungen beurteilen. Darüber hinaus ist jedoch die Zuordnung zu den Zellzyklusphasen eingeschränkt. Anhand des DNA-Gehalts ist auch für anschließende Proliferationszyklen eine Differenzierung zwischen G1-, S- und G2-Phase möglich. Nachdem die Zellen BrdU inkorporiert haben, kann allerdings nicht mehr bestimmt werden, ob sich die Zellen im ersten zweiten oder folgenden Zyklus nach der Behandlung (Bestrahlung b.z.w. BrdU-Gabe) befinden. Zwar wird mit jeder S-Phase weiterhin BrdU eingebaut, allerdings zieht diese Vermehrung in der Punktwolkendarstellung der flusszytometrischen Messung keine sichtbare Intensitätssteigerung des FITC-Signals nach sich. Ursächlich hierfür ist, dass Zellen, die bereits BrdU inkorporiert haben, maximal den BrdU-Gehalt verdoppeln können (Abb. 26).



Abb. 26: Schematische Darstellung des BrdU-Einbau während 2 Zellzyklen. Bei der zweiten Zellteilung bleibt der BrdU-Gehalt entweder identisch oder verdoppelt sich maximal.

Da die Grün-Fluoreszenz (FITC) logarithmisch dargestellt ist und Zellen mit einfachem BrdU-Gehalt bereits eine Variation um etwa eine halbe Dekade aufweisen, kann eine Verdopplung des BrdU-Einbau nicht eindeutig dargestellt werden (Abb. 27).



Abb. 27: Halblogarithmische dot blot Darstellung. Zellen der ersten markierten G1-Phase (schwarzes Gate) können maximal den BrdU Gehalt verdoppeln und sind zum Ende des 2. Zellzyklus nicht von Zellen der 1. G2-Phase nach Bestrahlung (rotes Gate) zu differenzieren.

Zusammenfassend war es mit Hilfe der flusszytometrischen Messung und der Methodik kontinuierlicher BrdU-Markierung in der vorliegenden Arbeit möglich, die Ausprägung und die Kinetik des ersten G1/S- sowie G2/M-Checkpunkt nach Bestrahlung zu untersuchen.

4.2.1. Zellzyklusanalyse von RT112

Die Beobachtung, dass es bei den bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen von 2h bis 12h zu einer relativen Zunahme in der 1.G2-Phase mit folgendem Abfall auf 0% nach 48h kommt, sowie einem Anstieg der Zellanteile nach 12h in der 2.G1-Phase, spricht für das Vorliegen eines temporären G2-Blocks, welcher nach 2h einsetzt und 12h anhält (Tabelle 1). Passend dazu finden sich in der S-Phase zunächst gleiche Kurvenverläufe, dann jedoch in der bestrahlten Probe eine Abnahme von Zellen, die durch den fehlenden Übertritt der in G2 blockierten Zellen zu erklären ist. Der leichte Anstieg der 1.G1-Population nach 12h sowie der S-Phase nach 18h ist mit dem vermehrten Zellangebot nach Auflösung dieses G2-Block zu begründen.

Im Gegensatz zum G2-Arrest, der offensichtlich unabhängig von funktionellem wild-typ

p53 auftritt (siehe unten) lässt sich in RT112 Zellen kein temporärer G1/S-Block nachweisen. Es fand sich weder eine frühe ausgeprägte Abnahme der BrdUinkorporierenden S-Phase Zellen sowie kein Anstieg oder Plateau der 1. unmarkierten G1-Phase Zellen. Darüber hinaus waren nach 48h sowohl in der unbestrahlten wie auch in der bestrahlten Probe sämtliche Zellen mit BrdU markiert und somit in aktiver Proliferation. Das bedeutet, dass durch die Bestrahlung auch kein permanenter G1-Arrest ausgelöst wurde.

 Tabelle 1: Dauer eines temporären G1- und G2-Arrests sowie prozentualer Anteil an

 Zellen, welche einen permanenten G1-Arrest nach Bestrahlung aufweisen.

Zellzykluseffekt nach Bestrahlung	Zelllinien			
	RT 112	DU 145	B8 T47D	LNCaP
Temporärer G1-Arrest [At]	-	-	-	2h-12h
Temporärer G2-Arrest [Δt]	2h-12h	2h-12h	2h-6h	2h-12h
Permanenter G1-Arrest [%]	-	-	-	9,6

4.2.2. Zellzyklusanalyse von DU145

Bei der quantitativen Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen sind sind vergleichbare Kurvenverläufe wie bei der Zelllinie RT112 festzustellen. Auch bei dieser Zelle ist ein ähnlich ausgeprägter, temporären G2-Block im Zeitraum von 2h-12h nach Bestrahlung zu erkennen (Tabelle 1). Ebenso fehlt ein temporärer wie auch ein permanenter G1/S-Block. Nach Bestrahlung mit 6 Gy setzten zumindest in dem Beobachtungszeitraum von 48h alle Zellen die Proliferation fort. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch in RT112 oder DU145 nach 6 Gy etwa 90% der Zellen ihre Fähigkeit, Kolonien zu bilden, verlieren (El-Awady et al. 2003). Das bedeutet, dass diese Zellen wenn auch nicht frühzeitig so doch im Verlauf der folgenden Tage ihre Proliferation einstellen.

4.2.3. Zellzyklusanalyse von LNCaP

Wie bei den Zelllinien RT112 und DU145 kann nach Bestrahlung auch in LNCaP Zellen ein temporärer G2-Arrest, welcher 2h-12h anhält, aufgrund des abgeflachten Kurvenverlaufes der 1.G2-Phase sowie des späteren Eintritts von Zellen in die 2. G1-Phase postuliert werden (Tabelle 1).

Es ist ein Abfall der bestrahlten S-Phase Zellen nach 2h und Anstieg nach 12h zu erkennen. In Zusammenhang mit einer Plateauphase der bestrahlten Zellfraktion in der 1.G1-Phase von 2h bis 12h, ist auf einen temporären G1-Arrest in diesem Zeitintervall zu schließen. Der Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten 1.G1-Phase Zellen nach 96h deutet auf einen permanenten G1-Arrest in etwa 10% der Zellen hin (Tabelle 1). Insgesamt zeigen die LNCaP Zellen damit sowohl einen intakten G1/S sowie einen intakten G2/M-Block, was den Befunden der Proteinexpressionsexperimente entspricht (siehe unten).

4.2.4. Zellzyklusanalyse von B8 T47D

Zwischen 2h und 8h ist der Zellanteil der bestrahlten Proben in der 1.G2-Phase höher als in der unbestrahlten Kontrollgruppe. Da Zellen der bestrahlten Zellfraktion bereits nach 6h in die 2.G1-Phase übertreten, kann auf einen temporären G2-Block von 2h-6h geschlossen werden (Tabelle 1). Dieser ist damit deutlich geringer und kürzer ausgeprägt als bei den drei zuvor beschriebenen Zellen. In den Kurvenverläufen der S-Phase ist kein wesentlicher Unterschied zu sehen. Auch findet sich in den ersten Stunden nach Bestrahlung keine Akkumulation von G1-Zellen, sodass hier kein G1/S-Block nachweisbar ist. Der spätere Anstieg der bestrahlten Zellfraktion in der 1.G1-Phase nach 8h fällt zeitlich mit dem Ende des temporären G2-Arrests zusammen, welches den Zellen ermöglicht aus der 1.G2-Phase in die 1.G1-Phase überzutreten. Da am Ende des Untersuchungszeitraumes kein Unterschied in der bestrahlten sowie unbestrahlten Zellfraktion der 1. G1-Phase zu sehen ist, deutet dieses auch auf ein Fehlen eines permanenten G1-Arrest hin. Unabhängig von Bestrahlung ist ein Anteil von ~20-25% nicht mit BrdU markiert (Abb. 12), so dass dieses auch nicht als eine Bestrahlungsfolge gewertet werden kann. Insgesamt liegt hier mit einem attenuierten G2-Block und der völlig fehlenden Blockierung in G1 ein deregulierte Zellzyklus-Proliferation vor trotz eines p53 wild-typ Proteinstatus (siehe unten).

4.3. Zusammenhang von p53-Status und strahleninduziertem G1-und G2-Arrest

In der Vergangenheit hat sich eine Vielzahl von Arbeitsgruppen mit dem Einfluss von p53 auf strahleninduzierte Zellzyklusregulationen beschäftigt. Zusammenfassend ergibt sich folgendes Muster: in humanen Fibroblasten konnte übereinstimmend ein p53-vermittelter G1-Arrest nachgewiesen werden (Di Leonardo et al., 1994; Kastan et al., 1992). Der Anteil an permanent arretierten Zellen wurde mit 20-70% angegeben (Li et al., 1995). Hinweise über einen Einfluss von p53 auf einen G2-Arrest wurden ebenfalls gefunden, wobei aber auch p53-unabhängige Regulationswege von Bedeutung zu sein scheinen (Agarwal et al., 1995; Stewart et al., 1995). In humanen Tumorzelllinien wurden diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Die Mehrzahl der Autoren wiesen in humanen Tumorzellen mit p53-wt Status einen strahleninduzierten G1-Arrest nach, der allerdings zumeist stark attenuiert war im Vergleich zu Normalzellen (Kuerbitz et al., 1992; Pellegata et al., 1996; Li et al., 1995; Zolzer et al., 1995; Kastan et al., 1991). Andere Arbeiten zeigten für Tumorzellen kein G1-Arrest nach Bestrahlung und dieses weder bei mutiertem noch bei p53 wild-typ Status (Li et al., 1995; Nagasawa et al., 1995; Little et al., 1995). Dieses spricht dafür, dass in Tumorzellen der G1-Arrest nicht obligat an den p53-Status gekoppelt zu sein scheint und es wohl in vielen Fällen zu einer Deregulation des Zellzyklus downstream von intaktem p53 kommt. In den hier untersuchten Zelllinien findet sich mit der B8-T47D Linie ein derartiges Beispiel. Die Art der Störung, die sich interessanterweise nicht nur auf den G1/S Block bezieht sondern auch auf den G2-Block ist nicht bekannt. Ein vergleichbar gestörte Regulation der B8 T47D Zelle wurde auch von Siles et al beschrieben (Siles et al., 1996). Die zweite untersuchte p53-wild-typ Zelle LNCaP weist hingegen einen geradezu klassischen G1/S-Block auf und stellt ein Beispiel für eine Tumorzelle dar, deren Zellzyklusregulation gegenüber Normalzellen unverändert ist. Es sei hier bemerkt, dass die Linie auch im übrigen Zeichen guter Differenzierung aufweist, einschließlich der Fähigkeit zur Seneszenz.

Bezüglich eines Zusammenhanges von p53-Status und strahleninduziertem G2-Arrest werden sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Regulationsmechanismen diskutiert (Review s.a. Hwang and Muschel, 1998). Es wurde überwiegend dargestellt, dass ein strahleninduzierter G2-Arrest unabhängig von dem p53-Status auftritt (Li et al., 1995; Kastan et al., 1991). Zudem wurde in einer isogenetischen Fibrosarkom-Zelllinie mit unterschiedlichem p53-Status nachgewiesen, dass der p53-wildtyp Status zu einem kürzeren G2-Arrest führte als die p53 mutierte Variante (Pellegata et al., 1996).

Mit dem dargestellten Konzept übereinstimmend, wurden in den Zelllinien mit mutiertem p53-Status RT112 und DU145 (mutierte p53 und p21 Expressionsmuster der Zelllinie

DU145 in: Böhnke 2001) in dieser Arbeit kein G1-Arrest und ein temporärer G2-Arrest von 2h-12h nachgewiesen. Für die Zelllinie RT112 wurde eine ähnliche Zellzyklusregulation mit Fehlen eines G1-Arrest und Nachweis eines G2-Arrest nach Bestrahlung in der Arbeitsgruppe von Siles et al. beschrieben (Siles et al., 1996).

Die Zelllinie LNCaP mit einem p53-wildtyp Status (Böhnke 2001) zeigte in dieser Arbeit neben dem temporären und permanenten G1-Arrest auch einen temporären G2-Arrest. Ob dieser G2-Arrest p53-abhängig oder unabhängig ist kann nicht entschieden werden. In einer Arbeit von Nagasawa et al. wurde ein ähnliches Regulationsmuster in p53-wt Tumorzellen beschrieben (Nagasawa et al., 1998). Die Dauer des temporären G2-Arrests ist in der Literatur unterschiedlich angegeben (2-8h). Es ist jedoch bekannt, dass die Dauer des Arrests dosisabhängig ist und die relativ lange G2-Verzögerung sich durch die Dosis von 6 Gy erklärt (ca 2 h/Gy).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden der funktionelle p53-Status sowie die Induktion von p21 nach Bestrahlung mittels Western-Blot-Technik in den humanen Tumorzelllinien RT112, LNCaP sowie B8 T47D untersucht. Zudem erfolgten flusszytometrische Untersuchungen der Zelllinien RT112, DU145, B8 T47D und LNCaP. Nach kontinuierlicher BrdU-Markierung sowie Färbung mit Propidium-Iodid wurden simultan zweiparametrige Messungen zur Quantifizierung der unterschiedlichen Zellzyklusanteile durchgeführt. Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Western Blots

- Die Blasenkarzinom-Zelllinie RT112 zeigte nach Bestrahlung ein permanent hohes p53-Level ohne Induktion von p21und damit ein nahezu identisches Muster wie die zuvor untersuchten DU145 Prostatakarzinom-Zellen. Dieses ist charakteristisch für einen mutierten p53-Status.
- In der Mammakarzinom-Zelllinie B8 T47D konnte 2 Stunden nach Bestrahlung eine Hochregulierung von p53 auf das 5,3-fache des Ausgangswertes nachgewiesen werden, der nach 24 Stunden auf das 2,25-fache absinkt. Zudem kommt es zu einer Induktion von p21. Eine ähnlich hohe Steigerung der p53 und folgend der p21-Induktion fand sich auch in LNCaP Prostatakarzinom-Zellen. Diese Regulation nach Bestrahlung ist kennzeichnend für Zellen mit p53-wildtyp Status.

Flusszytometrische Untersuchungen

- Die Zelllinien RT112 und DU145 mit einem mutiertem p53 Status zeigten keinen G1-Arrest. Es konnte f
 ür beide Zelllinien ein tempor
 ärer G2-Arrest von 2h-12h nach Bestrahlung nachgewiesen werden.
- Die Zelllinie LNCaP mit p53-wildtyp Status zeigte einen temporären G1-Arrest bis 12h nach Bestrahlung. Ein Anteil von etwa 10% der Gesamtpopulation wurde permanent am G1-Checkpunkt arretiert. Zudem wurde ein temporärer G2-Arrest von 2h-12h nachgewiesen.
- Die Zelllinie B8 T47D mit einem wildtyp-p53-Status zeigte im Gegensatz zur LNCaP Zelllinie keinen G1-Arrest. Es konnte ein temporärer G2-Arrest von 2h-6h nach Bestrahlung festgestellt werden. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten

Zelllinien war dieser Arrest deutlich kürzer, was insgesamt auf eine von p53unabhängige Regulationstörung beider Zellzykluscheckpoints hinweist.

Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen nicht uneingeschränkt in das grundlegende Modell zur p53-Funktion passen. Bezüglich des G1-Arrestes entspricht das Regulationsmuster der Zelllinien RT112, DU145 und LNCaP dem mehrheitlich beschriebenen Konzept der p53-abhängigen G1-Arretierung. Der fehlende G1-Arrest in der p53-wildtyp Zelllinie B8 T47D entspricht diesem Konzept jedoch nicht.. Eine Arretierung am G1-Checkpunkt scheint somit in Tumorzellen nicht obligat an den p53 Status gekoppelt zu sein. Bezüglich der strahleninduzierten Arretierung am G2-Checkpunkt kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit kein sicherer Rückschluss auf den Zusammenhang zum p53-Status gezogen werden. Alle Zelllinien, unabhängig vom p53 Status, zeigten einen temporären G2-Arrest. Deutlich wurde, dass die Dauer der Arretierung sich in Zelllinien unterscheiden kann und möglicherweise Ausdruck von Regulationsstörungen unabhängig von p53 sind.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass p53 in Tumorzellen einen wichtigen aber nicht alleinigen Regulator der Zellzyklusprogression nach Bestrahlung darstellt. Untersuchungen der p53-Proteinexpression gekoppelt mit der transkriptionellen Aktivierung kann zwar Auskunft darüber geben, ob wild-typ oder mutiertes p53 vorliegt. Um die Bedeutung für die intrazellulären Effekte in Einzelfall zu erkennen sind jedoch funktionelle Untersuchungen etwa der Zellzyklusregulation nötig. In der Beurteilung der Biologie individueller humaner Tumoren sollte deshalb zunehmend nach Methoden gesucht werden, die über Histologie und Histochemie hinaus auch funktionelle Tests an Tumorbiopsien erlauben.

Literaturverzeichnis

Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., Stark, G. R., (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92, 8493-8497.

Alban, P., Hurd, C., Dinda, S., Khattree, N., Moudgil, V. K., (2001). Differential regulation of retinoblastoma protein by hormonal and antihormonal agents in T47D breast cancer cells. J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 77, 135-141.

Bartek, J., Bartkova, J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Lukas, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Midgley, C. A., Gannon, J. V., Lane, D. P., (1991). Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene 6, 1699-1703.

Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J., Lane, D. P., (1990). Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. Oncogene 5, 893-899.

Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A., Peacock, J., (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. Somat.Cell Mol.Genet. 11, 505-510.

Benjamin, M. B., Potter, H., Yandell, D. W., Little, J. B., (1991). A system for assaying homologous recombination at the endogenous human thymidine kinase gene. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88, 6652-6656.

Bjerrum O. J., Schafer-Nielsen C. In: M. J. Dunn (Ed.), Electrophoresis '86 VHC Weinheim 1986: 315-327.

Böhnke A. Expression von p53 in Humanen Tumor- und Normalzellinien, Transkriptionelle Aktivierung und Einfluß aus Zellzyklus und Strahlenempfindlichkeit. Dissertation UKE, Hamburg 2001.

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

Bonsing, B. A., Corver, W. E., Gorsira, M. C., van Vliet, M., Oud, P. S., Cornelisse, C. J., Fleuren, G. J., (1997). Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry. Cytometry 28, 11-24.

Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U. K., Weintraub, H., (1980). The detection of DNAbinding proteins by protein blotting. Nucleic Acids Res. 8, 1-20.

Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72, 248-254.

Casey, G., Lo-Hsueh, M., Lopez, M. E., Vogelstein, B., Stanbridge, E. J., (1991). Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. Oncogene 6, 1791-1797.

Chao, D. T., Korsmeyer, S. J., (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. Annu.Rev.Immunol. 16, 395-419.

Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., Wyllie, A. H., (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature 362, 849-852.

Crissman, H. A., Mullaney, P. F., Steinkamp, J. A., (1975). Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells. Methods Cell Biol. 9, 179-246.

Crissman, H. A., Steinkamp, J. A., (1973). Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. J.Cell Biol. 59, 766-771.

Cuende, E., Ales-Martinez, J. E., Ding, L., Gonzalez-Garcia, M., Martinez, C., Nunez, G., (1993). Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. EMBO J. 12, 1555-1560.

Dahm-Daphi. P53: biology and role for cellular radiosensitivity. Strahlenther Onkol 2000; 176: 278-285.

Dahm-Daphi, J., Dikomey, E., Pyttlik, C., (1994). Relationship between non-reparable DNA strand breaks and cell survival studied in X-irradiated CHO, CHO K1, xrs1 and xrs5 cells. Int.J.Radiat.Biol. 65, 657-663.

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

Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., (1994). Workshop report: Techniques to Detect DNA Strand Breaks. Erlangen, Germany, 29-31 March 1993. Radiat.Environ.Biophys. 33, 85-88.

Draetta, G. F., (1994). Mammalian G1 cyclins. Curr.Opin.Cell Biol. 6, 842-846.

Dudenhoffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., Wiesmuller, L., (1998). Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. Mol.Cell Biol. 18, 5332-5342.

Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., Reed, S. I., (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. Cell 76, 1013-1023.

El-Awady, R. A., Dikomey, E.; Dahm-Daphi, J. (2003). Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaksWAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Brit. J. Cancer 89, 593-601.

El-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y., ., (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res. 54, 1169-1174.

Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A., Jackson, S. P., (1995). DNAdependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92, 320-324.

Ford, J. M., Hanawalt, P. C., (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92, 8876-8880.

Freedman, D. A., Levine, A. J., (1999). Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res. 59, 1-7.

Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C., Oren, M., (1996). A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. Mol.Cell Biol. 16, 4961-4971.

Fritsche, M., Haessler, C., Brandner, G., (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. Oncogene 8, 307-318.

Ge, X., Yannai, S., Rennert, G., Gruener, N., Fares, F. A., (1996). 3,3'-Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells. Biochem.Biophys.Res.Commun. 228, 153-158.

Gobert, C., Skladanowski, A., Larsen, A. K., (1999). The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96, 10355-10360.

Gratzner, H. G., (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218, 474-475.

Hall, P. A., Ray, A., Lemoine, N. R., Midgley, C. A., Krausz, T., Lane, D. P., (1991). p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. Lancet 338, 513.

Hallahan, D. E., (1996). Radiation-Mediated Gene Expression in the Pathogenesis of the Clinical Radiation Response. Semin.Radiat.Oncol. 6, 250-267.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M., (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 387, 296-299.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. Mol.Cell 1, 3-11.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. C., (1991). p53 mutations in human cancers. Science 253, 49-53.

Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., Murphy, G. P., (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res. 43, 1809-1818.

Hunter, T., (1992). Regulation of the eukaryotic cell cycle. Introduction. Ciba Found.Symp. 170, 1-6.

Hwang, A., Muschel, R. J., (1998). Radiation and the G2 phase of the cell cycle. Radiat.Res. 150, S52-S59.

Kagawa, K., Inoue, T., Tokino, T., Nakamura, Y., Akiyama, T., (1997). Overexpression of GML promotes radiation-induced cell cycle arrest and apoptosis. Biochem.Biophys.Res.Commun. 241, 481-485.

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R. W., (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res. 51, 6304-6311.

Kastan, M. B., Zhan, Q., el Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., Fornace, A. J., Jr., (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 71, 587-597.

Kaufmann, W. K., Schwartz, J. L., Hurt, J. C., Byrd, L. L., Galloway, D. A., Levedakou, E., Paules, R. S., (1997). Inactivation of G2 checkpoint function and chromosomal destabilization are linked in human fibroblasts expressing human papillomavirus type 16 E6. Cell Growth Differ. 8, 1105-1114.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.J.Cancer 26, 239-257.

Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., Brenner, H. J., (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur.J.Cancer 15, 659-670.

Khyse-Andersen. Biochem. Biophys. Methods 1984; 10: 203-209.

Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., Kastan, M. B., (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89, 7491-7495.

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

Lane, D. P., (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358, 15-16.

Lane, D. P., Crawford, L. V., (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 278, 261-263.

Leiter, L. M., Chen, J., Marathe, T., Tanaka, M., Dutta, A., (1996). Loss of transactivation and transrepression function, and not RPA binding, alters growth suppression by p53. Oncogene 12, 2661-2668.

Levine, A. J., (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88, 323-331.

Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A., (1991). The p53 tumour suppressor gene. Nature 351, 453-456.

Levy, J. A., Virolainen, M., Defendi, V., (1968). Human lymphoblastoid lines from lymph node and spleen. Cancer 22, 517-524.

Li, C. Y., Nagasawa, H., Dahlberg, W. K., Little, J. B., (1995). Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced G1 arrest in established human tumor cell lines. Oncogene 11, 1885-1892.

Lin, D., Shields, M. T., Ullrich, S. J., Appella, E., Mercer, W. E., (1992). Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89, 9210-9214.

Linke, S. P., Clarkin, K. C., Wahl, G. M., (1997). p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. Cancer Res. 57, 1171-1179.

Little, J. B., Nagasawa, H., Keng, P. C., Yu, Y., Li, C. Y., (1995). Absence of radiationinduced G1 arrest in two closely related human lymphoblast cell lines that differ in p53 status. J.Biol.Chem. 270, 11033-11036.

Lu, X., Lane, D. P., (1993). Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? Cell 75, 765-778.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T., (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. Genes Dev. 9, 935-944.

Maity, A., Kao, G. D., Muschel, R. J., McKenna, W. G., (1997). Potential molecular targets for manipulating the radiation response. Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. 37, 639-653.

Maltzman, W., Czyzyk, L., (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. Mol.Cell Biol. 4, 1689-1694.

Masters, J. R., Hepburn, P. J., Walker, L., Highman, W. J., Trejdosiewicz, L. K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B. T., Riddle, P. R., Franks, L. M., (1986). Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. Cancer Res. 46, 3630-3636.

McBride, O. W., Merry, D., Givol, D., (1986). The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 83, 130-134.

Mediavilla, M. D., Sanchez-Barcelo, E. J., (2000). Doses and time-dependent effects of 3'azido-3'-deoxythymidine on T47D human breast cancer cells in vitro. Pharmacol.Toxicol. 87, 138-143.

Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., Powell, S. N., (1997). Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. Oncogene 14, 1847-1857.

Miyashita, T., Reed, J. C., (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80, 293-299.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., Levine, A. J., (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 69, 1237-1245.

Nagasawa, H., Keng, P., Harley, R., Dahlberg, W., Little, J. B., (1994). Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. Int.J.Radiat.Biol. 66, 373-379.

Nagasawa, H., Keng, P., Maki, C., Yu, Y., Little, J. B., (1998). Absence of a radiationinduced first-cycle G1-S arrest in p53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. Cancer Res. 58, 2036-2041.

Nagasawa, H., Li, C. Y., Maki, C. G., Imrich, A. C., Little, J. B., (1995). Relationship between radiation-induced G1 phase arrest and p53 function in human tumor cells. Cancer Res. 55, 1842-1846.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., Smith, J. R., (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. Exp.Cell Res. 211, 90-98.

Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., Hainaut, P., (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. Hum.Mutat. 19, 607-614.

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 74, 609-619.

Pellegata, N. S., Antoniono, R. J., Redpath, J. L., Stanbridge, E. J., (1996). DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93, 15209-15214.

Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., Piwnica-Worms, H., (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. Science 277, 1501-1505.

Picksley, S. M., Lane, D. P., (1993). The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? Bioessays 15, 689-690.

Reisner, A. H., Nemes, P., Bucholtz, C., (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal.Biochem. 64, 509-516.

Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R., (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 76, 3116-3120.

Ribeiro, J. C., Barnetson, A. R., Jackson, P., Ow, K., Links, M., Russell, P. J., (1999). Caffeine-increased radiosensitivity is not dependent on a loss of G2/M arrest or apoptosis in bladder cancer cell lines. Int.J.Radiat.Biol. 75, 481-492.

Rodemann HP, Meyer R, Kandolf R. Strahleninduzierte Gentherapie. Der Onkologe 1999; 5: 910-914.

Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C., (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature 391, 496-499.

Scherer, S. J., Welter, C., Zang, K. D., Dooley, S., (1996). Specific in vitro binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2. Biochem.Biophys.Res.Commun. 221, 722-728.

Schlichtholz, B., Legros, Y., Gillet, D., Gaillard, C., Marty, M., Lane, D., Calvo, F., Soussi, T., (1992). The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. Cancer Res. 52, 6380-6384.

Sedmak, J. J., Grossberg, S. E., (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. Anal.Biochem. 79, 544-552.

Shaulsky, G., Ben Ze'ev, A., Rotter, V., (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. Oncogene 5, 1707-1711.

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

Srinivasan, R., Roth, J. A., Maxwell, S. A., (1993). Sequence-specific interaction of a conformational domain of p53 with DNA. Cancer Res. 53, 5361-5364.

Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirollo, K., Blattner, W., Chang, E. H., (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature 348, 747-749.

Stewart, N., Hicks, G. G., Paraskevas, F., Mowat, M., (1995). Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. Oncogene 10, 109-115.

Stohr, M., Vogt-Schaden, M., Knobloch, M., Vogel, R., Futterman, G., (1978). Evaluation of eight fluorochrome combinations for simultaneous DNA-protein flow analyses. Stain Technol. 53, 205-215.

Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., Paulson, D. F., (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). Int.J.Cancer 21, 274-281.

Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M. G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., Blandino, G., (2002). Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. J.Biol.Chem. 277, 18817-18826.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 76, 4350-4354.

Valenzuela, M. T., Mateos, S., Ruiz de Almodovar, J. M., McMillan, T. J., (2000). Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation. Radiother.Oncol. 54, 261-271.

Wagener Ch. Einführung in die molekulare Onkologie. Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1996.

Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J. E., Anderson, M. E., Schwedes, J. F., Tegtmeyer, P., (1994). p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. Mol.Cell Biol. 14, 5182-5191.

Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. Nat.Genet. 10, 188-195.

Weinberg, R. A., (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res. 49, 3713-3721.

Wenz, F., Yu, Y., Nagasawa, H., Imrich, A. C., Keng, P., Little, J. B., (1997). Lack of uncoupling of S phase and mitosis after irradiation in p53- human lymphoblast cell lines. Radiat.Res. 148, 129-134.

Woo, R. A., McLure, K. G., Lees-Miller, S. P., Rancourt, D. E., Lee, P. W., (1998). DNAdependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. Nature 394, 700-704.

Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T., Liber, H. L., (1995). Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. Cancer Res. 55, 12-15.

Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., (1995). Heterodimerization with Bax is required for Bcl-2 to repress cell death. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 194, 331-338.

Zolzer, F., Hillebrandt, S., Streffer, C., (1995). Radiation induced G1-block and p53 status in six human cell lines. Radiother.Oncol. 37, 20-28.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfe bei der Fertigstellung dieser Dissertationsarbeit bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Dikomey für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die anregenden Diskussionen im Rahmen der experimentellen Tätigkeit. Zudem möchte ich mich bei Frau Wegener für die tatkräftige Unterstützung im Umgang mit der Zellkultivierung sowie in der täglichen Laborarbeit bedanken. Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn PD. Dr. Dahm-Daphi aussprechen. Die unermüdliche Unterstützung in fachlichen Fragen, der praktischen Umsetzung dieser Arbeit sowie der moralische Ansporn hätten nicht besser sein können.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN	
Name Geburtsdatum Geburtsort Familienstand Staatsangehörigkeit	Florian Moritz Westphal 16. Oktober 1974 Hamburg ledig deutsch
SCHULBILDUNG	
08/1981 – 07/1985 08/1991 – 08/1992	Katholische Grundschule St. Antonius, Hamburg Austauschaufenthalt in Rochester, USA <i>High-School-Abschluβ</i>
08/1985 – 07/1994	Gelehrtenschule des Johanneums, Hamburg Abitur
STUDIUM	
10/1994 – 04/1997 04/1997 – 12/2001 12/2001	Medizinstudium an der Universität Lübeck Medizinstudium an der Universität Hamburg Ärztliche Prüfung
BERUFLICHER WERDEGANG	
04/2002-03/2005	AiP/Assistenzarzt - Abt. für Orthopädie und Unfallchirurgie AK Eilbek, Hamburg
04/2004-03/2005	Forschungstätigkeit im Arbeitsbereich Biomechanik der Technischen Universität Hamburg-Harburg
04/2005-07/2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Arbeitsbereich Biomechanik der Technischen Universität Hamburg- Harburg
seit 12/2005	Assistenzarzt – Abt. für Orthopädie, Klinik Dr. Guth, Hamburg

Hamburg, Oktober 2007

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: