Mechanismen der Zytotoxizität durch Alpha-Strahlung in humanen normalen und malignen hämatopoetischen Zellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sascha Raschke

aus Wuppertal

Düsseldorf, März 2007

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. med. R. Haas

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:PD. Dr. med. Ralf KronenwettKoreferent:Prof. Dr. rer. nat. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2007

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Sascha Raschke

Die Natur ist unerbittlich und unveränderlich, und es ist ihr gleichgültig, ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns dem Menschen verständlich sind oder nicht.

(Galileo Galilei)

Für meine Eltern

1 E	1 EINLEITUNG			
1.1	Strahlung	1		
1.2	Dosimetrische Begriffserklärungen			
1.3	Biologische Strahlungswirkung			
1.3.1	Grundlegende Wechselwirkungen			
1.3.2	Molekulare Wirkung von ionisierender Strahlung			
1.3.3	Molekulare Wirkung von (dicht ionisierender) Alphastrahlung	7		
1.4	Strahlentherapie	9		
1.5	Das maligne Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)	10		
1.6	Therapiestrategien bei Non-Hodgkin-Lymphomen	12		
1.6.1	Chemo- und Strahlentherapie			
1.6.2	Antikörpertherapie			
1.6.3	Radioimmuntherapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen			
1.7	Radioimmuntherapieansätze mit Alphastrahlern	16		
1.8	Zielsetzung der Arbeit	17		
2 M	IATERIAL UND METHODEN	19		
2.1	Chemikalien	19		
2.2	Enzyme			
2.3	Antikörper			
2.3.1	Primäre Antikörper			
2.3.2	Sekundäre Antikörper			
2.4	Molekularbiologische Kits			

2.5	Humane Zellen und ihre Gewinnung und Kultivierung	
2.5.1	Die Zell-Linie Karpas 422 als Modell eines malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms	
2.5.2	Primäre B-Zellen aus Leukozytenkonzentraten (Buffy Coats)	
2.6	Puffer und Lösungen	
2.6 2.6.1	Puffer und Lösungen	24 24

2.6.	3 Lösungen für die immunmagnetische Zellselektion	27
2.6.4	4 Lösungen für den Western Blot	27
2.7	Spezielle Materialien und Geräte	29
2.8	Software	31
2.8.	1 Programme	31
2.8.2	2 Datenbanken	31
2.9	Sequenzen	32
2.9.	1 Gene expression assays (TaqMan-Sonden) für die quantitative "Real-Time"-PCR	32
2.10	Isolation von primären CD19+ B-Zellen aus Buffy Coats	33
2.11	Reinheitsbestimmung von immunmagnetisch selektierten CD19+-Zellen	34
2.12	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität	36
2.13	Gewinnung des alpha-strahlenden Isotops Bismut-213 aus Actinium-225	37
2.14	Herstellung des Bismut-213-CD20 Konjugates und Bestimmung der Aktivität	37
2.15	Durchführung der Bestrahlung mit dem Bismut-213-CD20 Konjugat	38
2.16	Genexpressionsanalysen mit Affymetrix Microarrays	39
2.16	5.1 Theoretischer Hintergrund	39
2.16	cDNA-Synthese und in vitro Transkription von isolierter Total-RNA	40
2.16	5.3 Fragmentierung der aRNA	41
2.16	5.4 Hybridisierung der fragmentierten aRNA auf Affymetrix Microarrays	41
2.16	5.5 Scannen der hybridisierten Arrays und Analyse der Daten	42
2.16	5.6 Statistische Analysen und Ermittlung von differentiell hoch- oder herabregulierten Genen .	42
2.17	Verifizierung ausgewählter Gene mit Hilfe der quantitativen "Real-Time"-PCR	43
2.17	7.1 Reverse Transkription	43
2.17	2.2 Quantitative "Real-Time"-PCR	43
2.17	Berechnung der Signifikanz	44
2.18	Untersuchung von DNA-Schäden über γH2AX-Immunfluoreszenz	45
2.18	Immobilisierung und Fixierung der Zellen auf Objektträger	45
2.18	Antikörperfärbung von γH2AX und Kernfärbung mit Hoechst 33342	45
2.19	Messung des genomweiten Methylierungsstatus	46
2.19	2.1 Theorie und Funktionsweise des "Cytosin Extension Assays"	46
2.19	P.2 Herstellung von Positivkontrollen mit unterschiedlicher DNA-Methylierung	47
2.19	0.3 Verdauung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	48

2.19	.19.4 Durchführung des "Cytosin Extension Assays"		49
2.20	Unt	ersuchungen der Apoptose	49
2.20	0.1	Analyse über Annexin V-FITC und Propidiumiodid	
2.20	0.2	Analyse über Caspase-3	50
2.21	Unt	ersuchungen von Oberflächenproteinen	51
2.22	Zell	zyklusanalysen	52
2.23	"Co	olony-forming Assay"	53
2.24	Isol	ation von Nukleinsäuren	53
2.24	4.1	Isolation von DNA	
2.24	4.2	Isolation von RNA	53
2.25	Qua	antitäts und Qualitätskontrolle von Nukleinsäurelösungen	54
2.25	5.1	RNA-Qualitätskontrolle mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers	54
2.26	DN	A-Agarosegelelektrophorese	56
2.27	Mes	ssung der Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium	56
2.28	We	stern Blot Analysen	57
2.28	8.1	Herstellung von Zell-Lysaten für die Proteinanalyse	
2.28	8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	57
2.28	8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
2.28	8.4	Western Blot	58
2.28	8.5	Immunodetektion zum Nachweis von P53	59
2.28	8.6	Immunodetektion zum Nachweis von RB1 und Cyclin E2	

3 ER	GEBNISSE	61
3.1 Т	ranskriptionelle Veränderungen durch Alphastrahlung	61
3.1.1	Differentiell regulierte Gene nach Alpha-Bestrahlung von malignen K422 Zellen und no	ormalen
	primären CD19+ B-Zellen	
3.1.2	Cluster-Analyse	
3.1.3	Evaluation von zeit- und aktivitätsabhängiger Genexpression von K422 und CD19+ Zel	len 66
3.1.4	Funktionelle Gruppierungen von differentiell regulierten Genen	69
3.1.4	.1 DNA Reparatur	
3.1.4	.2 Veränderungen im Zellzyklus und in der Proliferation	
3.1.4	.3 Apoptose	
3.1.4	.4 Transkriptionelle Veränderungen von Genen für den Proteinabbau	

3.	1.4.5 Allgemeine Stressantwort	80
3.	1.4.6 Transkriptionelle Veränderungen bei Immun- und Interferon-assoziierten Genen	82
3.	1.4.7 Veränderungen der Proteinbiosynthese	85
3.1.5	Verifizierung der Genexpressionsdaten mit Hilfe der quantitativen "Real-Time"-PCR	86
3.2	Proteinexpression	
3.2.1	Proteinexpressionsstatus einiger ausgewählter Oberflächenantigene	
3.2.2	Proteinexpressions- und Phosphorylierungsstatus des Zellzyklusproteins RB1	
3.2.3	Proteinexpressionsstatus des Zellzyklusregulators Cyclin E2 (CCNE2)	95
3.3	Zellzyklusanalysen	97
3.4	Untersuchungen zur Apoptose	
3.4.1	Untersuchung der Induktion des Apoptose-assoziierten Proteins P53	101
3.5	Qualitativer Nachweis von DNA-Schäden	102
3.6	Klonogenes Zellwachstum und Viabilität	106
3.7	Sekretion von Zytokinen	107
3.8	Genomweite Methylierungsveränderungen	109

4 C	DISKUSSION	111
4.1	Durch Alphastrahlung induzierte funktionelle Veränderungen	111
4.1.1	Transkriptionelle Aktivierung der DNA-Reparatur bei K422 Zellen	112
4.1.2	2 DNA-Reparatur bei CD19+ Zellen	114
4.1.3	3 Zellzyklus und Apoptose bei den K422 Zellen	115
4.1.4	Transkriptionelle Veränderung in Genen des Zellzyklus bei den primären CD19+ Zellen	119
4.1.5	5 Aktivierung des proteolytischen Abbaus durch 26S Proteasomen bei den K422 Zellen	120
4.1.6	5 Induktion der oxidativen Stressantwort	121
4.1.7	7 Transkriptionelle Induktion der Immun- und Interferonantwort in K422 Zellen	123
4.1.8	3 Immunantwort bei den primären CD19+ Zellen	128
4.1.9	9 Strahlungsinduzierte genomweite DNA-Demethylierung	128
4.2	Schlussfolgerung	131
4.3	Ausblick	134

5	ZUSAMMENFASSUNG	136
5.1	Summary	137
6	LITERATUR	140
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	154
8	DANKSAGUNG	155

1 **EINLEITUNG**

1.1 Strahlung

Der allgemeine Begriff von Strahlung bezeichnet den physikalischen Transport von Energie durch Wellen oder Teilchen durch den Raum. Besitzt Strahlung auch eine Ladung, eine Masse oder andere Eigenschaften, so werden auch diese transportiert. Generell wird zwischen elektromagnetischer (Wellen-) Strahlung und Korpuskular- oder Teilchenstrahlung unterschieden, wobei diese Unterscheidung eher auf historische Betrachtungen zurückgeht, jedoch heute nach wie vor als anschauliche Aussage immer noch Bedeutung hat. Nach heutigem Wissensstand hat elektromagnetische Strahlung sowohl Wellen- als auch Teilchencharakter [Tipler, 1994], wobei spezifische Wellenlängen und damit auch spezifische Frequenzen und Energien charakteristisch für bestimmte Strahlungsarten sind. Das Spektrum elektromagnetischer Wellen reicht von Wellenlängen von 10⁻¹⁴ Meter für Gammastrahlen bis 10⁷ Meter für lange Radiowellen, wobei das für das menschliche Auge sichtbare Licht in einem Wellenlängenbereich von etwa 400-750 nm liegt. In der nachstehenden Abbildung ist das elektromagnetische Spektrum dargestellt.



Abbildung 1.1. Das Spektrum elektromagnetischer Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 10⁷ bis 10⁻¹⁴ m ist dargestellt. Auf der unteren Skala sind zusätzlich die Frequenzbereiche der entsprechenden Strahlungsarten aufgeführt. Das für das menschliche Auge sichtbare Licht nimmt nur einen winzigen Teil von etwa 400-750 nm des elektromagnetischen Spektrums ein (modifiziert nach <u>http://www.physik.unizh.ch/teaching/physik-b/WS0506/woche12/Slide2.png</u>, 2006)

Der Teil des elektromagnetischen Spektrums, der sowohl das sichtbare Licht als auch den nachfolgenden langwelligeren, und damit den Bereich mit abnehmender Frequenz und Energie umfasst, zählt zu den nichtionisierenden Strahlen, während UV-, Röntgen- und Gammastrahlung, die sich in einem Frequenzbereich oberhalb des sichtbaren Lichts befinden, als ionisierend bezeichnet werden.

Röntgen- und Gammastrahlung überschneiden sich in ihren Wellenlängen und damit auch in ihren Energien über einen weiten Bereich und sind daher in diesem Bereich bei gleicher Energie als äquivalent anzusehen. Das Unterscheidungskriterium der beiden Strahlungsarten liegt in deren Herkunft: Röntgenstrahlung entsteht durch starke Abbremsung sehr schneller Elektronen (Röntgenbremsstrahlung) oder durch Übergänge von Elektronen zwischen den kernnächsten Quantenzuständen der Atome (charakteristische Röntgenstrahlung), wobei energiereiche Photonen entstehen, deren Energie gerade so groß ist, wie die Energiedifferenz des abgebremsten Teilchens (im Falle von Bremsstrahlung) bzw. wie die Energiedifferenz zwischen den beiden Quantenzuständen (im Falle von charakteristischer Röntgenstrahlung). Im Gegensatz dazu tritt Gammastrahlung im Rahmen eines radioaktivem Zerfalls von Atomkernen als Folge eines vorhergehenden Alpha- oder Betazerfalls, aber auch bei der Paarvernichtung auf, bei der ein Teilchen-Antiteilchen-Paar unter Emission von Gammaquanten "zerstrahlt" [Bergmann, Schäfer, 1992].

Korpuskularstrahlung zeichnet sich durch sich schnell bewegende Teilchen aus. Zu dieser Strahlungsart gehören u.a. die Molekül-, Ionen-, Beta- und Alphastrahlung. Kennzeichnend für diese Teilchen ist, dass sie eine definierte Reichweite haben und zum Teil in elektrischen und magnetischen Feldern abgelenkt werden können. Bei der Betastrahlung handelt es sich um ionisierende Teilchenstrahlung, bei der aufgrund von radioaktivem Betazerfall ein Elektron und ein elektronisches Antineutrino (β^{-} -Strahlung) oder ein Positron und ein elektronisches Neutrino (β^{+} -Strahlung) emittiert werden. Die Reichweite der Betastrahlung in Luft liegt zwischen 8 Zentimetern für Tritium [³H] und 7 Metern für Phosphor-32 [³²P].

Alphastrahlung resultiert aus radioaktivem Alphazerfall, bei dem aus dem Ausgangskern ein Kern des Elements Helium, bestehend aus zwei Protonen und zwei Neutronen [⁴He²⁺], emittiert wird. Sie tritt z.B. beim Zerfall natürlicher Radionuklide auf (z. B. beim Zerfall von Radium-226 zu Radon-222). Das ausgesandte Alphateilchen stellt einen Heliumkern dar und ist aufgrund der beiden Protonen positiv geladen. Ebenso wie Betastrahler geben auch Alphastrahler ihre Energie in Form von vielen Einzelstößen ab, somit wird die Strahlung nicht exponentiell abgeschwächt wie bei der Gamma- oder Röntgenstrahlung. Im Gegensatz zu

Röntgen-, Gamma und Betastrahlung stellt Alphastrahlung so genannte "dicht-ionisierende" Teilchenstrahlung mit einem sehr hohen linearen Energietransfer (LET) dar, da beim Durchgang durch Materie die Energieübertragungen und somit die Anzahl der Ionisationen nicht punktuell, sondern aufgrund der Größe und der hohen Masse der Teilchen vielfach in einem sehr begrenzten Raum erfolgen, in dem die Teilchen sehr stark abgebremst werden. Der LET stellt somit ein Maß für die Ionisationen pro zurückgelegter Wegstrecke in biologischem Gewebe dar und beträgt für Alphastrahlung etwa 90 KeV/µm. Die Reichweiten von Alphateilchen liegen aufgrund ihrer großen Masse und ihrer Ladung bei wenigen Zentimetern in Luft, in Papier und organischem Gewebe bei etwa 30-70 µm. Tabelle 1.1. zeigt eine Aufstellung ausgewählter Alpha-, Beta- und Gammastrahler.

Alphastrahlung (dic	ht ionisierend);	Qualitätsfaktor q = 20;	LET:~90 KeV/µm
Mutternuklid	Tochternuklid	Halbwertszeit	Energie der Strahlung
²²⁶ Ra	²²² Rn	1600 Jahre	4,78 MeV
²²² Rn	²¹⁸ Po	55,6 Sekunden	6,27 MeV
²²⁸ Th	²²⁴ Ra	1,91 Jahre	5,24 MeV
²²⁵ Ac	²¹³ Bi	10 Tage	5,9 MeV
²¹³ Bi	²⁰⁸ T1	45,6 Minuten	5,9 MeV
Betastrahlung (ionis	ierend);	Qualitätsfaktor q = 1;	LET:~0,2 KeV/µm
Mutternuklid	Emission	Halbwertszeit	Energie der Strahlung
³ H	β(-)	12,3 Jahre	19 KeV
³² P	β(-)	14,3 Tage	1,71 MeV
¹⁴ C	β(-)	5730 Jahre	0,156 MeV
³⁵ S	β(-)	87,5 Tage	0,167 MeV
⁹⁰ Y	β(-)	64,1 Stunden	2,3 MeV
Gammastrahlung (i	onisierend);	Qualitätsfaktor q = 1;	LET:~0,3 KeV/µm
Mutternuklid	Emission	Halbwertszeit	Energie der Strahlung
¹³¹ I	γ	8 Tage	0,97 MeV
192 Ir	β, γ	73,8 Tage	0,37 MeV
¹⁸⁸ Re	β, γ	17 Stunden	2,12 MeV
¹³³ Xe	β, γ, Röntgen	5,3 Tage	32 KeV
¹³⁷ Cs	γ	30 Jahre	1,2 MeV

Tabelle 1.1. Herkunft, Halbwertszeiten und Energie einiger ausgewählter Strahler (modifiziert nach Burke *et al.*, 2001; Salame *et al.*, 2000).

1.2 Dosimetrische Begriffserklärungen

Das Maß für die primäre Schädigung von biologischem Gewebe wird über die zugeführte Strahlen- oder Energiedosis definiert. Sie wird in Gray [Gy] gemessen, wobei ein Gray diejenige Strahlungsmenge darstellt, die in einer Körpermasse von einem Kilogramm die Energie von einem Joule absorbiert. Die Einheit Gray stellt dabei eine SI-Einheit dar und hat die frühere Einheit Rad abgelöst. Die Aktivität oder die Anzahl der Zerfälle eines Strahlers pro Sekunde wird in Becquerel [Bq] angegeben, wobei 1Bq einem Zerfall pro Sekunde entspricht. Die Einheit Becquerel ist ebenfalls eine SI-Einheit und hat die ältere Einheit Curie [Ci] abgelöst.

Will man die Wirkung beliebiger Strahlungen auf Gewebe miteinander vergleichen, so verwendet man den Begriff der Äquivalenzdosis D_q , die in Sievert [Sv] angegeben wird. Ein Sievert entspricht ebenso der Strahlungsmenge, die in einer Körpermasse von einem Kilogramm die Energie von einem Joule absorbiert. Die Äquivalenzdosis stellt ein Maß für die biologische Wirksamkeit von ionisierender Strahlung dar und ist das Produkt aus der Energiedosis D und dem Qualitätsfaktor q. Dieser ist für Röntgen-, Gamma- und Betastrahlung 1, für Alphastrahlung dagegen 20 (siehe Tabelle 1.1.). Das bedeutet, dass die biologische Strahlungswirkung durch Alphastrahlung auf das gleiche biologische Gewebe 20-mal größer ist als die Wirkung von Röntgen-, Gamma, oder Betastrahlung von gleicher Energie. Die Formeln für die Energiedosis, Äquivalenzdosis und die Aktivität sind nachstehend aufgeführt.



Abbildung 1.2. Definitionen und Formeln zur Errechnung der Energiedosis, Äquivalenzdosis und der Aktivität. Alle Einheiten stellen SI-Einheiten dar (aus Tipler, 1994).

1.3 Biologische Strahlungswirkung

1.3.1 Grundlegende Wechselwirkungen

Generell kann die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung in ihren vielfältigen Erscheinungsformen als Resultat eines rein physikalisch beschreibbaren Prozesses angesehen werden. Bei der Strahlungsionisation wird die Energie der ionisierenden Photonen oder Teilchen von der Elektronenhülle eines neutralen Atoms absorbiert, wobei bei diesem Prozess ein Elektron abgespalten werden kann. Als biologische Strahlenwirkung werden alle Wirkungen ionisierender Strahlung auf lebendes Gewebe bezeichnet, die auf deren Energieübertragung auf Moleküle von lebenden Zellen beruhen. Die Energieabsorption auf zelluläre Moleküle erfolgt in einer extrem kurzen Zeitspanne von ca. 10⁻¹⁸ Sekunden [Bolus, 2001], wobei beim Durchgang von Strahlung durch biologisches Gewebe ausschließlich der

Energieübertragung auf Moleküle von lebenden Zellen beruhen. Die Energieabsorption auf zelluläre Moleküle erfolgt in einer extrem kurzen Zeitspanne von ca. 10⁻¹⁸ Sekunden [Bolus, 2001], wobei beim Durchgang von Strahlung durch biologisches Gewebe ausschließlich der zurückgehaltene und absorbierte Anteil der Strahlung biologisch wirksam werden kann (Grotthus-Draper-Gesetz). Der Teil der Strahlung, der ohne Wechselwirkung durch das Gewebe hindurchgeht, ist nicht biologisch wirksam [Bolus, 2001]. Abhängig von der Strahleneinwirkung können vorübergehende oder dauerhafte Funktionsstörungen der Zellen eintreten, oder die Zellen werden völlig zerstört. Wie groß die Zellschädigungen sind, hängt von verschiedenen Faktoren wie der Art der Strahlung, der aufgenommenen Dosis, der Dauer der Einwirkung und der Strahlungsempfindlichkeit des betroffenen Gewebes ab [Dahm-Daphi et al., 1994, Dikomey et al., 1998; El-Awady et al., 2003]. Die Folge der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit den Zellmolekülen stellt zunächst die Veränderung der Elektronenhülle der einzelnen Atome dar, wobei diese in reaktive und instabile Zustände übergehen. Ionisierende Strahlung kann z.B. durch zelluläre Makromoleküle wie Proteine und der DNA absorbiert werden, oder sie reagiert unter Bildung von Hydroxylradikalen mit dem umgebenden Wasser des Zytoplasmas [Hüttermann et al., 1984; Steenken, 1989]. Abbildung 1.3. zeigt einen Überblick über strahlungsinduzierte Effekte, zelluläre Reaktionen und deren biologische Konsequenzen.



Abbildung 1.3. Vereinfachte Darstellung einer strahlenbiologischen Reaktionskaskade. Trifft ionisierende Strahlung auf lebende Zellen, so erfolgt zunächst als rein physikalischer Effekt die Ionisation und Anregung der Atome und Moleküle. In weiteren chemischen und biochemischen Schritten treten neben reaktiven Spaltprodukten des Wassers auch Veränderungen von Biomolekülen auf, die nachfolgend mit einer Vielzahl von biologischen Schäden einhergehen. Als Folge von nicht reparierten Schäden kann die Zelle entweder geschädigt überleben, die Schädigungen an Nachkommen weitergeben, oder durch Nekrose oder Apoptose absterben. (modifiziert nach Vana, Grundlagen der Strahlenbiologie und Strahlenschäden, Strahlenunfälle, Risikoabschätzung).

1.3.2 Molekulare Wirkung von ionisierender Strahlung

Bei radiochemischen Reaktionen ionisierender Strahlung kommt es als indirekte Wirkung zur Bildung von Hydroxylradikalen als Reaktionsprodukte des Wassers des Zytoplasmas [Hüttermann *et al.*, 1984], die aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit zelluläre Biomoleküle oxidieren können und binnen kurzer Zeit biochemisch nachweisbare Veränderungen des Stoffwechsels und von Makromolekülen wie der DNA und Proteinen induzieren [Breen & Murphy, 1994]. Beim direkten Effekt wird ionisierende Strahlung durch die DNA absorbiert, was die Ionisation der Basen, aber auch Chromatinschäden und Strangbrüche zur Folge hat [Friedberg, 2003; Rydberg, 2001; Hoeijmakers, 2001]. Aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der Vererbung sowie der Steuerung einer Vielzahl von Zellfunktionen sind die meisten strahlungsbedingten Veränderungen an der DNA besonders gut untersucht. Neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen (DSBs) [Dugle *et al.*, 1976; Ward, 1981] können als Folge von ionisierender Strahlung auch chemische Modifikationen einzelner Basen auftreten. So konnte nachgewiesen werden, dass unter Einwirkung von UVB- und UVC-Strahlung Pyrimidindimere (zumeist Thymindimere) entstehen, die unrepariert zu Mutationen führen [Kaneko et al., 1979, Cadet et al., 1990; Douki et al., 2003]. Doppelstrangbrüche werden als die kritischsten Schäden ionisierender Strahlung angesehen. In Experimenten mit Fibroblastenzell-Linien konnte gezeigt werden, dass die Einwirkung von Röntgenstrahlung zu 30-40 DSBs/Gray und pro Zelle führen kann [Dikomey et al., 1998, 2000; El-Awady et al., 2003]. In eukarvotischen Zellen werden derartige strahlungsinduzierte Doppelstrangbrüche über zwei Reparaturmechanismen beseitigt, nämlich durch die "Nicht homologe Verknüpfung der DNA-Enden (Non homologous end joining; NHEJ)" und durch die "Homologe Rekombination (homologous recombination; HR)" [Dasika et al., 1999; Pfeiffer et al., 2000]. NHEJ verknüpft direkt zwei Enden der DNA an den Bruchstellen, ohne dass eine Sequenzhomologie erforderlich ist, sodass in vielen Fällen die korrekte Sequenz nicht wieder hergestellt ist [Jackson, 2002]. Dagegen erfordert die homologe Rekombination ausgedehnte Sequenzhomologien, um die Intaktheit der DNA wieder herzustellen. Die Präzision der Reparaturmechanismen ist dabei abhängig von der Geschwindigkeit des Rejoinings der DSBs. Die Reparatur von schnell reassoziierten DSBs resultiert in den meisten Fällen in korrekten Produkten, während es bei der Reparatur von langsam reassoziierten DSBs zu zahlreichen Fehlern kommt [Löbrich et al., 1995, 2000; El-Awady et al., 2001]. Generell ist das Rejoining von DSBs nach 12-16 Stunden beendet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Reparatur von strahlungsinduzierten DSBs von der Chromatinstruktur abhängig ist, wobei eine geringere Reparatureffizienz in Zellen mit weniger kondensiertem Chromatin gezeigt werden konnte [Lehnert et al., 1998;]. Letztendlich verantwortlich für strahlungsinduzierte, lichtmikroskopisch sichtbare chromosomale Aberrationen sind nicht erfolgte oder fehlerhafte Verknüpfungen der DSB-Bruchstellen. Solche Zellen erfahren häufig einen Arrest in der Metaphase des Zellzyklus [Bauchinger et al., 1986; Greinert et al., 1995]. Die Wirkung von ionisierender Strahlung resultiert auch häufig in einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus aufgrund von P53-abhängiger Transaktivierung von P21^{KIP1}, was eine Inhibition der Komplexe Cyclin D/CDK4 und Cyclin E/CDK2 zur Folge hat [Di Leonardo et al., 1994; Azzam et al., 2000]. Darüber hinaus ist P53 bei der strahlungsinduzierten Apoptose beteiligt, wobei es zur Freisetzung von Cytochrom c, gefolgt von einer Aktivierung von Caspasen kommt [Bates & Vousden, 1999; Brown & Wouters, 1999].

1.3.3 Molekulare Wirkung von (dicht ionisierender) Alphastrahlung

Im Gegensatz zu (ionisierender) Beta-, Gamma- und Röntgenstrahlung ist die Wirkung von (dicht ionisierender) Alphastrahlung in biologischen Systemen erst Forschungsgegenstand der

letzten rund 20 Jahre. Dies hat sicherlich auch seinen Grund darin, dass man erst seit kurzer Zeit in der Lage ist, Alphastrahler in hoher Reinheit und mit ausreichender Aktivität herzustellen und diese adäquat für biologische Experimente einzusetzen. Im Tiermodell wurde die Wirkung des Alpha-emittierenden Radioisotops ²³⁹Pu auf murine hämatopoetische (blutbildende) Stammzellen an schwangeren Mäusen untersucht und festgestellt, dass es nach ²³⁹Pu Injektion zu einer Abnahme der hämatopoetischen Zellen in der foetalen Leber kam. [Kubota et al.; 1997]. Weiterhin konnte eine Wachstumshemmung von hämatopoetischen Mauszellen nach Beschuss mit nur einem einzigen Alphapartikel des Isotops ²³⁹Pu nachgewiesen werden [Lorimore et al., 1998]. Chromosomale Veränderungen durch Einwirkung niedrig dosierter Alphastrahlung auf humane hämatopoetische Stammzellen konnten von Kadhim et al. [1998] noch in den klonalen Nachkommen mehrerer Generationen später nachgewiesen werden. Die Ursache von Alphastrahlung-induzierten chromosomalen Aberrationen sowie Zelltod, onkogene Tranformationen und Mutationen scheinen, wie bei ionisierender Strahlung auch, DNA-Doppelstrangbrüche darzustellen, wobei gezeigt werden konnte, dass diese Brüche, abhängig von repetitiven Chromatineinheiten, geclustert vorliegen [Prise et al., 1998, Frankenberg et al., 1994]. Die Reparatur von DNA-Schäden, die aufgrund von Alphastrahlung entstehen, verläuft im Gegensatz zu Gammastrahlung-induzierten Schäden sehr viel langsamer [Pinto et al., 2002], wobei der Grund darin zu sehen ist, dass Alphapartikel größere intragenische Deletionen verursachen und dass intra- und interchromosomale Insertionen und Inversionen an Orten einiger großer Deletionen entstehen. Zellen, die mit niedrig dosierter Alphastrahlung behandelt wurden, sind in der Lage, ihre Schäden auf andere Zellen zu übertragen, die nicht direkt von der Strahlung betroffen sind. In Studien mit niedrig dosierter und breit gefächerter Alphastrahlung konnten Nagasawa und Little [1992] bei diesem, als "Bystander Effect" bezeichneten Phänomen einen erhöhten Austausch der Schwesterchromatiden in 30% der Zellen nachweisen, obwohl weniger als 1% der Kerne in der Zellpopulation tatsächlich getroffen wurden. Darüber hinaus konnten die Autoren eine wesentlich höhere Mutationsrate als erwartet nachweisen [Nagasawa & Little, 1999]. Prise et al. [1998] zeigten "Bystander Effects" bezüglich der Bildung von Mikronuklei und apoptotischem Zelltod. Auf Zellzyklusebene konnte eine durch Röntgenstrahlung resultierende verminderte G1-Checkpoint-Kontrolle festgestellt werden [Syljuasen et al., 1999], wobei nicht sicher ist, ob diese mit einer Transaktivierung von P53 einhergeht, zumal dieses Gen bei diesen strahlungsinduzierten DNA-Schädigungen keine besondere Rolle zu spielen scheint [Baggio et al., 2002].

1.4 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie nutzt die schädigende Wirkung von hochenergetischer, ionisierender Strahlung auf biologische Gewebe mit dem Ziel der Bekämpfung von Krebserkrankungen. Dabei soll der Tumor so weit wie möglich geschädigt werden, ohne dass das benachbarte gesunde Gewebe unnötig stark in Mitleidenschaft gezogen wird.

Eine große Anzahl von Karzinomen wird heutzutage mit Röntgen- oder Gammastrahlung behandelt, dabei können externe Strahlenquellen wie Röntgenstrahlen-emittierende Linearbeschleuniger oder, beispielsweise für die Behandlung von Mamma- und Kolonkarzinomen, radioaktive Gamma-Emitter wie Cobalt-60 und Cäsium-137 verwendet werden. In der Vergangenheit wurde zur Bekämpfung von choroidalen Melanomen des Auges Iod-125 [Robertson, 2003] eingesetzt. Bösartige Veränderungen können auch mit Strahlern bekämpft werden, die temporär im Gewebe verbleiben. Diese Methode der Brachytherapie, bei der die Strahlenquelle in eine Körperhöhle oder in den Tumor selbst eingesetzt wird und dort einige Tage verbleibt, wird beispielsweise bei Cervixkarzinomen oder Gliomen angewandt, jedoch können diese auch mit Hilfe von externer Gammastrahlung behandelt werden. Welche Art von Strahlung letztendlich bei der Bekämpfung von Tumoren zum Einsatz kommt, hängt von Faktoren wie der Tumorart, der Lage und Verteilung des Tumors im Körper sowie von seiner Strahlensensitivität ab. Die Bestrahlungstechniken mit Röntgenund Gammastrahlen konnten in den vergangenen Jahren immer weiter verbessert werden, wobei eine immer größere Präzision erreicht und weniger umliegendes gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wurde, so dass in der Literatur des Öfteren vom so genannten "Gammaknife" [Giller et al., 2005] die Rede ist.

Neben Gamma- und Röntgenstrahlen werden in der Strahlentherapie auch Elektronenstrahlen in Form von gekapselten Strahlungsquellen (sog. "*seeds*") eingesetzt. Durch ihre geringe Reichweite sind Betastrahler, wie Strontium-90, Yttrium-90, Phosphor-32, Rhenium-186 oder Iridium-192 äußerst geeignet für die Behandlung von oberflächlichen Tumoren und werden bei Karzinomen der Haut sowie gegen Krebserkrankungen an Kopf, Hals, Wirbelsäule und Brust eingesetzt und finden darüber hinaus im Rahmen der intracoronaren und –vaskulären Strahlentherapie Verwendung [Salame *et al.*, 2001], um zu verhindern, dass sich Coronargefäße, die durch Herzkatheter-assistierte Ballondilatation wieder geweitet wurden, nach einigen Monaten erneut verengen. Maligne Non-Hodgkin-Lymphome werden, sofern der Tumor nicht mehr örtlich auf die Lymphknoten begrenzt und somit nicht mit lokaler Strahlentherapie therapierbar ist, mit dem Betastrahler Yttrium-90 behandelt. Dieses Isotop wird dabei an einen Antikörper konjugiert, welcher spezifisch an Oberflächenmoleküle der Tumorzellen bindet, so dass die Strahlung in unmittelbare Nähe der Tumorzellen gebracht werden kann [Burke *et al.*, 2002; Pohlman *et al.*, 2006] (vgl. 1.6.3.).

1.5 Das maligne Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind seltene Erkrankungen des lymphatischen Systems, deren Auftreten in den letzten dreißig Jahren im Gegensatz zu den Hodgkin-Lymphomen stetig zugenommen hat. Im Jahre 2000 wurden allein in den USA rund 55.000 neue Fälle geschätzt [Baris & Zahm, 2000]. Die Überlebensrate innerhalb von 5 Jahren beträgt 50-60% für alle Lymphome. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen (Inzidenz) in Deutschland wird auf 10 bis 15 pro 100.000 Personen geschätzt. NHL sind hämatologische Erkrankungen, sie entstehen also aus Zellen des hämatopoetischen (blutbildenden) Systems, zu dem das Knochenmark, aber auch das Lymphsystem einschließlich der Thymusdrüse, der Lymphknoten, der Milz und der Mandeln gehören. Undifferenzierte pluripotente hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (*colony stimulating factors; CSF*) in Vorläufer- und liniendeterminierte Progenitorzellen.

Die lymphatischen Vorläuferzellen gehen ebenfalls aus den pluripotenten Stammzellen hervor, jedoch differenzieren sie sich im Gegensatz zu den Zellen der erythroiden, myeloiden und megakaryozytären Reihe unter Einwirkung von Interleukin-2 (IL-2) und Thymopoetin in den lymphatischen Organen wie der Leber, der Milz und der Lymphknoten zu B- und T-Lymphozyten. Nach Abschluss der Reifungs- und Differenzierungsprozesse migrieren diese Zellen in die Blutbahn und die verschiedenen Körpergewebe. Eine Übersicht über die Eigenschaften, Vorkommen und Differenzierung aller hämatopoetischen Zellen zeigt Abbildung 1.4.



Abbildung 1.4. Ein vereinfachter Überblick über die Entwicklung, Differenzierung und die einzelnen Kompartimente von hämatopoetischen Zellen, ausgehend von der pluripotenten Stammzelle, ist dargestellt. Weiterhin sind einige zelltypspezifische Oberflächenmarker an den ausdifferenzierten Zellen im Funktionskompartiment angegeben. (Nach Haas & Kronenwett, 2005)

Annähernd 85% der Non-Hodgkin-Lymphome stammen aus einer monoklonalen Population von B-Lymphozyten, nur etwa 15% gehen auf T- oder NK-Zellen (natürliche Killerzellen) zurück. Die Ausgangszellen der NHL sind in der Regel B-Zellen in verschiedenen Stadien der Lymphozyten-Reifung und zudem das Ergebnis einer Zellreifungsstörung, deren Entwicklung auf einer bestimmten Stufe unterbrochen wurde.

NHL breiten sich in der Umgebung sowie durch Absiedlung der Tumorzellen auf dem Lymphweg und über das Blut aus. Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten, jedoch steigt mit zunehmendem Alter die Wahrscheinlichkeit, an einem NHL zu erkranken, an. Der Durchschnitt liegt bei knapp über 60 Jahren. Als mögliche Ursache können daher Mutationen angesehen werden, die sich mit dem Alter akkumulieren und häufig bei Patienten mit NHL beobachtet werden. Eine für die Entstehung des follikulären NHL, einer häufigen NHL Subgruppe, bedeutende chromosomale Mutation stellt die Translokation t(14;18) dar, bei der das auf dem Chromosom 14 gelegene *BCL-2*-Gen in einen Immunglobulinlokus auf dem

Chromosom 18 übertragen wird. Das *BCL-2*-Gen kodiert für ein Protein, welches in Mitochondrien eukaryotischer Zellen eine wichtige antiapotoptische Funktion ausübt. Apoptose wird unter anderem induziert durch Generierung von Sauerstoffradikalen und Aktivierung von Caspasen. BCL-2 kann diesen Prozess wirksam blockieren und damit die Apoptose inhibieren. Durch die Translokation wird das BCL-2 Protein permanent aktiviert [Korsmeyer, 1992], da das entsprechende Gen in den Immunglobulingenlokus transloziert wurde und somit eine verstärkte Expression von BCL-2 resultiert. Die Translokation t(14;18) führt somit zu einer Blockade der Apoptose [Korsmeyer, 1992; 1999], was die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung weiterer genetischer und möglicherweise lymphomauslösender Mutationen steigert.

Die starke Zunahme der Neuerkrankungen von NHL lässt sich jedoch nicht alleine durch die Zunahme des Lebensalters begründen, weitere Ursachen sind jedoch bisher weitgehend unbekannt. Allerdings gibt es Hinweise, dass virale und bakterielle Infektionen als Kofaktoren und/oder Auslöser an der Entstehung von NHL beteiligt sind. Beispielsweise führt eine HIV-Infektion zu einem 59-104-fach erhöhten Risiko, an einem malignen Lymphom zu erkranken [Rabkin *et al.*, 1991]. Neben seltenen genetischen Prädispositionen führt ein geschwächtes Immunsystem z.B. nach Immunsuppression (im Rahmen einer Transplantation) oder aufgrund von Autoimmunerkrankungen bei den betroffenen Patienten ebenfalls zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von NHL. Ob der nur in wenigen Studien nachweisbare Zusammenhang zwischen Bluttransfusionen (und der dadurch möglichen Exposition gegenüber Infektionen) und der erhöhten Rate von NHL mit viralen Infektionen zusammenhängt, ist unklar, zumal diese Assoziation nicht in allen Studien nachweisbar war [Nelson *et al.*, 1998].

Schließlich kann die Exposition gegenüber spezifischen chemischen Stoffen (Herbizide, Insektizide, Pestizide) das relative Risiko, an einem NHL zu erkranken, um das 2-8-fache erhöhen.

1.6 Therapiestrategien bei Non-Hodgkin-Lymphomen

1.6.1 Chemo- und Strahlentherapie

Durch die Einführung von Anthracyclinen zur Behandlung von Lymphomen durch das 1976 beschriebene CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) [McKelvey *et al.*, 1976] der South-West Oncology Group (SWOG) wurde es möglich, dass fast 2/3 der Patienten eine Remission erreichten. Jedoch konnten langfristig nur 1/3 der

Patienten geheilt werden. Trotz der ermutigenden Ergebnisse sowie den Fortschritten in der Erforschung der Erkrankung konnten in den letzten 20 Jahren keine entscheidenden Verbesserungen mehr erzielt werden. Es wurden weder wesentlich neue Chemotherapeutika in der Therapie eingeführt, noch konnten die Behandlungsergebnisse durch die Einführung teilweise kompliziert aufgebauter und toxischer Polychemotherapie-Schemata der so genannten 2. und 3. Generation verbessert werden [Armitage, 1993].

Die Rolle der Strahlentherapie (*radio therapy, RT*) bei Lymphomen ist unklar, was daran liegt, dass es sehr wenige randomisierte Therapiestudien gibt, die den Stellenwert der RT überprüft haben [Aviles *et al.*, 1994] und belegen, obwohl wenig Zweifel daran besteht, dass Lymphome strahlensensibel sind. Die NHL sprechen auf eine Strahlentherapie mit hochdosierten Röntgenstrahlen oder anderen hochenergetischen Strahlen an. Diese Behandlung ist jedoch nur lokal wirksam, da sie nur in dem Bereich wirkt, der im Bestrahlungsfeld liegt. Da die NHL jedoch nur selten begrenzt auftreten und sich bereits frühzeitig über den Blut- und Lymphweg ausbreiten, kann nur bei wenigen Patienten eine alleinige Strahlentherapie angewendet werden. In den meisten Fällen wird eine kombinierte Chemo- und Strahlentherapie durchgeführt oder eine Strahlentherapie in Erwägung gezogen, wenn eine Chemotherapie keine ausreichende Wirksamkeit gezeigt hat und lokalisierte Restherde vorliegen, die der Bestrahlung zugänglich sind.

1.6.2 Antikörpertherapie

Eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse bei der Behandlung von Lymphomen konnte durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern erzielt werden. Diese Therapie beruht auf der Tatsache, dass Antikörper bestimmte, auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimierte Antigene erkennen und einen direkten zellschädigenden Effekt auf die malignen Zellen ausüben. Im November 1997 wurde in den USA der Antikörper Rituximab (MabThera[®]) für die Behandlung von NHL genehmigt. Rituximab ist ein gentechnisch hergestellter chimärer Maus-Mensch Anti-CD20-Antikörper, bei dem die variablen leichten und schweren Ketten des ursprünglichen murinen Anti-CD20-Antikörpers an die konstante Region eines humanen Immunglobulin G (IgG) Moleküls gekoppelt wurden [Maloney *et al.*, 1994]. Das auf diese Weise entstandene Molekül hat einen annähernd 95%-igen humanen Ursprung. Rituximab erlaubt so eine effektive Interaktion mit den eigenen (humanen) immunologischen Mechanismen, ohne dass der Antikörper selbst das Ziel der körpereigenen Abwehr wird.

Das für Rituximab als Angriffspunkt dienende CD20-Antigen ist ein unglykosiliertes dicht exprimiertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 33-35 KDa, das an

cytoplasmatischen Serin- und Threoninresten phosphoryliert und auf der Oberfläche von normalen und malignen B-Zellen exprimiert wird [Tedder & Schlossmann, 1988]. Das MS4A1-Gen, welches CD20 kodiert, ist auf Chromosom 11 lokalisiert [Tedder et al., 1989; Adra et al., 1994] und wird bei Prä-B-Zellen im Rahmen der B-Zell-Reifung angeschaltet [Rosenthal et al., 1983]. CD20 wird weder auf anderen Zellen des Körpers, noch auf unreifen B-Vorläuferzellen exprimiert, was eine Rekonstitution des B-Zell-Kompartiments nach der Antikörpertherapie erlaubt. Aufgrund der ebenso fehlenden Expression des CD20-Antigens in Plasmazellen ist darüber hinaus die Immunglobulinproduktion nicht beeinträchtigt. Die Funktion des CD20-Antigens ist nach wie vor nicht gut verstanden, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass es in der Regulation des Zellzyklus und in der Apoptose eine Rolle spielt [Byrd et al., 2002], sowie als Kalziumkanal fungieren kann [Bubien et al., 1993]. Nach Bindung von Rituximab wird das CD20-Antigen weder ins Plasma abgegeben, noch wird dieses von der Zelle internalisiert [Pohlman et al., 2006]. Aufgrund von Beobachtungen, dass das Komplementsystem nach Verabreichung von Rituximab stark aufgezehrt wurde, vermutet man, dass Komplement-abhängige Zytotoxizität (complement dependent cytotoxicity; CDC) eine Rolle bei der Wirkungsweise von Rituximab spielen könnte [Winkler et al., 1999], jedoch korrelieren die Ergebnisse von in vitro CDC-Experimenten nicht mit klinischen Daten [Weng & Levy, 2001].

Die Bedeutung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC*) wurde in einer Reihe von Mausexperimenten gezeigt [Clynes *et al.*, 2000]. Der Antikörper Rituximab induzierte *ADCC*-Anti-Tumor-Effekte durch die Bindung von zytotoxischen Zellen durch den Fcγ-Rezeptor (FcγR) des chimären CD20-Antikörpers. Ein Zusammenwirken mit B-Zell-abtötenden Chemotherapeutika wurde von Demidem *et al.* [1997], Alas *et al.* [2000], und Ghetie *et al.* [2001] untersucht. Der Synergismus von Rituximab mit Chemotherapeutika wird zum Teil durch Herunterregulation von Interleukin (IL)-10 durch den CD20-Antikörper vermittelt, was wiederum eine Herabregulation des antiapoptotischen Proteins BCL-2 und eine gesteigerte Sensitivität für Apoptose zur Folge hat.

Von den multiplen Wirkungsmechanismen von Rituximab, die beschrieben wurden, bleibt jedoch bis zum heutigen Kenntnisstand unklar, welcher Mechanismus der bedeutendste ist. Insofern ist es schwierig, Kenntnisse über potentielle Resistenzmechanismen zu erlangen. Konzeptionelle Ansätze wurden von Smith *et al.* [2003] erbracht. Ein schneller Abbau von Rituximab, die Produktion von antichimären Antikörpern, eine hohe Tumorbelastung, große

Mengen an löslichem CD20 und schwache Oberflächen-CD20-Expression werden als Ursachen für die Unwirksamkeit von Rituximab diskutiert [Smith *et al.*, 2003].

1.6.3 Radioimmuntherapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen

Die Radioimmuntherapie (RIT) stellt eine relativ neue Behandlungsform von unterschiedlichen Tumoren dar, bei der ein radioaktives Isotop chemisch mittels eines Chelators an einen target-spezifischen monoklonalen Antikörper oder ein entsprechendes Antikörperfragment gebunden ist. Solche Radioimmunkonjugate kombinieren die hohe Spezifität der monoklonalen Antikörper mit der tumorzerstörenden Eigenschaft der Radioisotope und stellen eine besondere Form der Radiotherapie dar. Frühere Untersuchungen zeigten eine "Zielgerichtetheit" ("*Targeting*") von Radiumwasser und verwandten Isotopen in Knochen [Macklis *et al.*, 1990], darüber hinaus wurde an Strontium-89 und Samarium-153 als potentielle Radiopharmazeutika für die Therapie von Knochenläsionen, die bei einer Vielzahl von metastasierenden Tumoren beobachtet wurden, gearbeitet [Lattimer *et al.*, 1990]. Aufgrund der Tatsache, dass diese Substanzen jedoch eingeschränkt zielgerichtet waren sowie der sehr starken hämatologischen Toxizität, war die Entwicklung einer darauf basierenden therapeutischen Plattform unmöglich.

In späteren Studien wurden durch stark verbesserte Radiochemie organische Chelat-Seitenketten eingesetzt, um den niedrig-energetischen ß-Strahler Yttrium-90 mit einem Antikörper zu koppeln [Hnatowich et al., 1985]. Derartige Chelatkonstrukte ermöglichten eine Kopplung von unterschiedlichen positiv geladenen Radiometallen. Dies eröffnete die Ära der zielgerichteten Beta-Radioimmuntherapie. Aktuell sind zwei auf Betastrahler basierende und an CD20 monoklonale Antikörper konjugierte Radioimmunpräparate für den therapeutischen Einsatz zugelassen: Yttrium-90 Ibritumomab Tiuxetan [Zevalin®] und Iod-131 Tositumomab [BexxarTM]. Beide werden gegenwärtig bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt. Ein komplettes Ansprechen wurde bei 20-40% der behandelten Patienten erreicht, während die partielle Ansprechrate bei 60-80% lag. Die physikalischen Charakteristika der Betastrahler mit einem niedrigen linearen Energietransfer (LET) von 0,2 KeV/µm und einer Reichweite von wenigen Millimetern im menschlichen Gewebe erlauben deren Einsatz auch für die Behandlung größerer Tumoren, erzeugen jedoch gleichzeitig einen sogenannten "Kreuzfeuereffekt", dem auch gesunde Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Opfer fallen. Diese Problematik könnte durch den Einsatz von Alphastrahlern, welche einen hohen LET und eine geringere Reichweite haben, umgangen werden.

1.7 Radioimmuntherapieansätze mit Alphastrahlern

Durch ihre sehr kurze Reichweite (3-4 Zelldurchmesser) und einen 100-500 mal höheren LET im Vergleich zu Betastrahlern sind Alphastrahler für das *Targeting* einzelner Tumorzellen besonders geeignet und unterscheiden sich daher in ihren Anwendungsbereichen von Betastrahlern. Die Indikationen der Alphaimmuntherapie umfassen monozelluläre Tumorerkrankungen (Leukämie) sowie Mikrometastasen oder minimale Resterkrankungen nach einer Chemo-, Strahlen- oder chirurgischen Therapie.

Eine erfolgreiche Kopplung des Alphastrahlers Bismut-212 mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch gegen den humanen IL2-Rezeptor gerichtet ist, konnte erstmals die Gruppe um Kozak [1986] zeigen [Kozak et al., 1986]. Verglichen mit unspezifischen Radioimmunkonjugaten konnte in weiteren in vitro-Analysen eine hohe Effektivität eines Radioimmunkonjugates, bestehend aus dem Isotop Bismut-212 und einem spezifischen, gegen murine T-Zellen gerichteten Antikörper, nachgewiesen werden [Macklis et al., 1988]. In nachfolgenden Studien wurde eine Reihe von unterschiedlichen alphastrahlenden Radioimmunkonjugaten als potentielle Radiotherapeutika untersucht. So wurde das Isotop Astat-211 mit Antikörperfragmenten gegen Nierenzellkarzinome [Wilbur et al., 1993], mit osteosarcom-spezifischen monoklonalen Antikörpern [Larsen & Bruland, 1998], mit Antikörpern gegen die Alphakette des Interleukin 2 (IL2) Rezeptors [Yordanov et al., 2001] oder mit dem Anti-CD20 Rituximab Antikörper konjugiert [Aurlien et al., 2000]. Mit einer Vielzahl dieser Konjugate konnte eine hohe spezifische Zytotoxizität nachgewiesen und gezeigt werden, dass es möglich ist, Zellen selektiv mit nur 1-5 Partikeln abzutöten [Strickland et al., 1994; Larsen et al., 1998]. In verschiedenen Versuchen mit Actinium-225-Radioimmunkonjugaten in Mausmodellen wurde die Effektivität zur Behandlung von Lungenmetastasen aus Mammakarzinomen und zur Behandlung eines Ovarialkarzinoms untersucht [Kennel et al., 2000]. Weitere Analysen beschäftigten sich mit den zytotoxischen Effekten von Radioimmunkonjugaten mit den Isotopen Blei-212, Radium-223 und Terbium-149 in Tiermodellen [Ruble et al., 1996; Henriksen et al., 2004; Beyer et al., 2004]. Eine signifikante Zelltoxizität konnte auch mit dem Radioisotop Bismut-213, konjugiert mit einem spezifischen murinen Antikörper in einer Epidermiszell-Linie, nachgewiesen werden [Kaspersen et al., 1995]. Weiterhin deuteten die Resultate von Vandenbulcke et al. [2003] in einer Leukämiezell-Linie darauf hin, dass das Radioimmunkonjugat Bismut-213-Rituximab hinsichtlich der Induktion von Apoptose und Chromosomenschäden im Vergleich zu einem Gamma-emittierenden Konjugat weitaus effektiver war [Vandenbulcke et al., 2003].

Das Isotop Bismut-213, gekoppelt an den CD33 monoklonalen Antikörper HuM195 wurde erfolgreich in einer klinischen Phase I Studie im Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York eingesetzt [Jurcic *et al.*, 2002] und ist bereits im Rahmen einer Alphaimmuntherapie für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie im klinischen Einsatz; die klinische Anwendung eines ähnlichen Alphaimmunkonjugats, ²¹³Bi-CD20 für die Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen, wird derzeit noch untersucht [Heeger *et al.*, 2001]. Unterschiedliche Tumorentitäten, wie Magenkarzinom [Huber *et al.*, 2003], Prostatakarzinom [Wang *et al.*, 2006], Mammakarzinom [Ranson *et al.*, 2002], Pankreaskarzinom [Qu *et al.*, 2005 a,b], Chronische lymphatische Leukämie [Vandenbulcke *et al.*, 2003], multiples Myelom [Couturier *et al.*, 1999] und Glioblastom [Kneifel *et al.*, 2006] sind ebenfalls Gegenstand präklinischer alphaimmuntherapeutischer Untersuchungen.

Der Anstieg sowie die immer größer werdende Vielfalt der möglichen therapeutischen Anwendungen von Alphastrahlern, speziell von Bismut-213 begründet die Notwendigkeit der detaillierten Untersuchung der zellulären und molekularen Wirkungsmechanismen von Alphapartikeln.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Phänomen der Schädigung und Zerstörung menschlicher normaler und maligner hämatopoetischer Zellen durch das alphastrahlende Radioimmunkonjugat Bismut-213-CD20 Rituximab am Beispiel von gesunden primären B-Zellen und an der B-Zell-Lymphomzell-Linie K422 auf molekularer und funktioneller Ebene zu untersuchen.

Zunächst sollten mit Hilfe der Microarray-Technologie die durch die Alphastrahlung verursachten transkriptionellen Veränderungen erfasst werden. Auf dieser Basis sollten zelluläre Pathways identifiziert werden, die mit einer zellulären Antwort auf die Alphastrahlung einhergehen.

Die gefundenen transkriptionellen Veränderungen sollten anschließend mit Hilfe von weiteren RNA- und Proteinanalysen bestätigt, sowie Korrelationen zwischen RNA- und Proteinexpressionsstatus untersucht werden. Auf funktioneller Ebene sollte der Einfluss der Alphastrahlung auf die Zellproliferation und Klonogenität, den Zellzyklus, sowie die Apoptose analysiert werden.

Weiterhin sollte die Wirkung der Alphastrahlung auf die DNA untersucht werden, indem nach strahlungsinduzierten DNA-Schäden gesucht sowie etwaige Methylierungsveränderungen der DNA charakterisiert wurden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Ort
6X Ladepuffer für Agarosegele	Fermantas	St. Leon-Rot
Acrylamid Rothiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe
37,5:1, 30% (für Westernblot)	Kotii	Karistune
AlbuRx [®] 5 Human Albumin Lösung	71 B Behring GmbH	Marburg
(5%)	ZED Denning Onion	Warburg
Ammoniumpersulfat	Sigma	Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL	Paislay, Schottland
Assay-on Demand TM	Applied Piesystems	Waitarstadt
Gene Expression Assay Mix	Applied Blosystems	wenerstaut
Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen
Biotin-Anti Streptavidin	Vector Laboratories	Burlingame, CA
Bovines Serum Albumin	Invitrogen	Karlsruhe
Bovines Serum Albumin, Fraktion 5	Roche	Mannheim
CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Cisplatin	Sigma	Deisenhofen
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche	Mannheim
Cocktail Tablets	Roche	Wammenn
dATP, 100 mM Solution	Amersham Biosciences	Freiburg
dCTP, 100 mM Solution	Amersham Biosciences	Freiburg
dGTP, 100 mM Solution	Amersham Biosciences	Freiburg
dTTP, 100 mM Solution	Amersham Biosciences	Freiburg
Desoxy[5- ³ H]cytidin 5´triphosphat	Amersham Biosciences	Freiburg
Triammoniumsalz, 1 mCi/ml	Amersham biosciences	Treiburg
DNA-Längenstandard GeneRuler TM	Formentes	St. Loon Pot
DNA Ladder Mix	rennemas	St. Leon-Kot
DTT [0,1 M]	Invitrogen	Karlsruhe
EDTA	Sigma	Deisenhofen
Eurobiotaq [®] DNA Polymerase Puffer	Fisher Scientific	Schwerte
[10x]		

Chemikalie	Firma	Ort
Eurobiotaq [®] MgCl ₂ 50 mM	Fisher Scientific	Schwerte
Ethidiumbromid	Sigma	Deisenhofen
Etoposid	Sigma	Deisenhofen
FCS	РАА	Pasching
Fragmentierungspuffer	Affymetrix UK Ltd	High Wycombe,UK
Glycin	Darmstadt	AppliChem
Hoechst 33342	Invitrogen	Karlsruhe
Imunoblot Blocking Reagent	Upstate	Temecula, CA
M-MLV RT First Strand Buffer [5X]	Invitrogen	Karlsruhe
Magermilchpulver	Lavita	Kempen
MethoCult [®] H4100	Cellsystems	St. Katharinen
PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom	Berlin
pd(N) ₆ Random Hexamer-Primer	Amersham Biosciences	Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Sigma	Deisenhofen
Ponceau S-Solution	Serva	Heidelberg
Protein-Längenstandard	Formantas	St. Loon Pot
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	rennemas	St. Leon-Kot
Recombinant RNasin [®]	Promega	Mannheim
Ribonuclease Inhibitor	Tomega	Wammenn
S-Adenosyl-Methionin (SAM)	New England Biolabs	Frankfurt a.M.
Streptavidin-Phycoerythrin	Invitrogen	Karlsruhe
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	Weiterstadt
TEMED	Sigma	Deisenhofen
Triton X 100	Sigma	Deisenhofen
Trypan Blue	Biochrom	Berlin
Trypsin	Sigma	Deisenhofen
Tween 20	Serva	Heidelberg
Ultima Gold High flashpoint LSC Cocktail	Perkin-Elmer	Rodgau-Jügesheim

Die für Kopplung des Alphaemitters Bismut-213 mit dem CD20-Antikörper Rituximab (Mabthera[®]) notwendige Chelatverbindung 2-(4-Isothiocyanatobenyl)diethylenetriaminpenta-

Essigsäure (SCN-CHX-A´´-DTPA) wurde von M. Brechbiel (National Cancer Institute, Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt.

2.2 Enzyme

Enzym	Firma	Ort
Eurobiotaq [®] DNA Polymerase	Fisher Scientific	Schwerte
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen	Karlsruhe
Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	Promega	Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs	Frankfurt a.M.
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden
SssI CpG Methylase	New England Biolabs	Frankfurt a.M.

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper, Klon	Firma	Ort
Anti-CD20 Rituximab (MabThera®)	Hoffmann-La Roche AG	Grenzach-Wyhlen
Anti-Cyclin E, clone HE12	Upstate	Temecula, CA
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) clone JBW301	Upstate	Temecula, CA
Anti-RB, clone XZ-77	Upstate	Temecula, CA
Normal Goat IgG	Sigma	Deisenhofen
Human CD19 Antibody, CD19 PE	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
CD1c FITC	Hölzel Diagnostika	Köln
CD20 PE	Becton Dickinson	Heidelberg
CD47 PE	Becton Dickinson	Heidelberg
CD79b PE	Becton Dickinson	Heidelberg
CD164 PE	Becton Dickinson	Heidelberg
Monoclonal Mouse Anti-Human P53 Protein, clone DO7	DakoCytomation	Glostrup, Dänemark

Antikörper, Klon	Firma	Ort
Monoclonal Mouse Anti-rabbit		
Glyceraldehyd-3-Phosphat	HyTest	Finnland
Dehydrogenase (GAPDH), clone 6C5		
Simultest TM γ_1/γ_{2a} FITC/PE Isokontrolle	Becton Dickinson	Heidelberg

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper, Klon	Firma	Ort
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed	Invitrogen	Karlsruhe
Goat Anti-Mouse IgG, HRP-conjugate	Upstate	Temecula, CA
Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate	Upstate	Temecula, CA
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse	DakoCytomation	Glostrup,
Immunglobulins / HRP	DakoCytomation	Dänemark

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe (Reinheitsgrad *pro analysi*) bezogen. Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen) und Falcon/Becton Dickinson (Meylen Cedex, FR) bezogen. Reaktionsgefäße in den Volumina 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.4 Molekularbiologische Kits

Kommerziell erhältliche Kits folgender Firmen fanden Verwendung:

Kitsystem	Firma	Ort
Annexin V-FITC Apoptosis	BD Pharmingen	Heidelberg
Detection Kit I	DD I harmingen	Themetolog
BCA Protein Assay Kit	Pierce, über Perbio Science	Bonn
Bio Array TM High Yield TM RNA	Enzo	Farmingdale NV
Transcript Labeling Kit (T7)		i anninguale, ivi
ECL Western Blotting System	Amersham Biosciences	Freiburg
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen	Heidelberg

Kitsystem	Firma	Ort
FITC-Conjugated Monoclonal Active	BD Pharmingen	Heidelberg
Caspase-3 Antibody Apoptosis Kit I	DD T harmingen	Theraelberg
GeneChip [®] Eukaryotic Poly-A RNA	Affymetrix über Ambion	Cambridgeshire UK
Control Kit		Cumonagesinie, or
Immunoassay Kit Human CCL3/MIP1α	Biosource	Nivelles, Belgien
Immunoassay Kit Human CCL4/MIP1β	Biosource	Nivelles, Belgien
Immunoassay Kit Human IL8/NAP-1	Biosource	Nivelles, Belgien
Immunoassay Kit Human TNF	Biosource	Nivelles, Belgien
Immunoassay Kit Human TNFSF10	Biosource	Nivelles, Belgien
Message Amp aRNA Kit	Ambion	Cambridgeshire,UK
QIAamp [®] DNA Blood Mini Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy [®] Micro Kit	Qiagen	Hilden

2.5 Humane Zellen und ihre Gewinnung und Kultivierung

2.5.1 Die Zell-Linie Karpas 422 als Modell eines malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms

Die Zell-Linie Karpas 422 (K422) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Ihre Identität wurde von der DSMZ überprüft. Die Zellen stammen ursprünglich von einer 73-jährigen Patientin mit einem chemoresistenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom. Sie wurden aus der Pleura entnommen und im Jahre 1987 als Zell-Linie etabliert. Neben der für NHL charakteristischen Translokation t(14;18) (q32.1;q21.3), zeigt die Zell-Linie mit den Translokationen t(2;10) (p23;q22.1), t(4;11) (q21.3;q23.1) und t(4;16) (q21.3;p13.1) noch weitere auffällige chromosomale Rearrangements [Dyer *et al.*, 1990].

Die Zell-Linie wurde regelmäßig auf eventuelle Kontaminationen durch Mykoplasmen getestet. Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen in 10 ml RPMI-1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert und alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:5 passagiert.

Hierzu wurden 2 ml der Zellsuspension und 8 ml auf 37°C vortemperiertes Medium in eine neue 25 cm² Kulturflasche überführt.

Zur Kryolagerung wurden die Zellen 5 min bei 1200 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit Einfriermedium, bestehend aus RPMI 1640, 10% DMSO und 25% FCS, in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Nach einer 4 stündigen Lagerung bei -20°C und einer anschließenden Lagerung über Nacht bei -80°C wurden sie zuletzt in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen so kurz wie möglich bei 37°C inkubiert und anschließend direkt in vortemperiertem Medium in einer 25 cm² Kulturflasche aufgenommen.

2.5.2 Primäre B-Zellen aus Leukozytenkonzentraten (Buffy Coats)

Normale CD19+ B-Zellen wurden aus frischem peripherem Blut gewonnen. Ausgangsmaterial waren Buffy Coats mit einem Volumen zwischen 60 und 100 ml, die im Institut für Hämostasiologie und Transfusionsmedizin aus venösem Blut von gesunden, anonymen Spendern nach Einverständniserklärung hergestellt und bezogen wurden. Die primären B-Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Selektion 2.10) gewonnen. Anschließend immunmagnetischer (vgl. erfolgte die durchflußzytometrische Reinheitsbestimmung (vgl. 2.11). Jeweils 1×10^6 selektierte Zellen wurden pro Well in 2 ml Kulturmedium in einer 24 Well-Platte maximal 24 Stunden kultiviert. Bei größeren Zellzahlen erfolgte die Inkubation in 25 cm² Kulturflaschen, wobei die Kulturbedingungen, einschließlich der Zusammensetzung des Mediums, denen der Zell-Linie K422 entsprachen.

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Standardlösungen

5x TBE (1000 ml):

54 g	Tris-Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad	dH ₂ O

Phosphatpuffer-Waschpuffer:

0,5 M	Na ₂ HPO ₄
0,5 M	NaH ₂ PO ₄
0,2 %	SDS

auf einen pH-Wert von 7 einstellen

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 mM	EDTA pH 8,0

2.6.2	Lösungen	für die	Genexpress	sionsanalysen
-------	----------	---------	------------	---------------

12x MES (2-[N-Morpholino] Ethansulfonsäure)-Puffer (1000 ml):

MES free acid m	nonohydrate
	MES free acid n

193,3 g MES Sodium Salt

 $ad \qquad \qquad dH_2O$

Sterilfiltrieren und auf einen pH-Wert von 6,5-6,7 einstellen

2x Hybridisierungspuffer (50 ml):

8,3 ml	12x MES-Stock
17,7 ml	5 M NaCl
4 ml	0,5 M EDTA
0,1 ml	10% Tween 20
19,9 ml	dH ₂ O

2x Stain Buffer (250 ml):

41,7 ml	12x MES-Puffer
92,5 ml	5 M NaCl
2,5 ml	10% Tween-20
113,3 ml	dH ₂ O

-	
30 µl	fragmentierte aRNA (10 µg)
3,3 µl	Kontroll Oligonukleotid B2 (3 nM)
10 µl	20x Eukaryotische Hybridisierungskontrolle (bioB, bioC, bioD, cre)
2 µl	Heringssperma DNA (10 mg/ml)
2 µl	acetyliertes BSA (50 mg/ml)
100 µl	2x Hybridisierungspuffer
52,7 µl	dH ₂ O

Hybridisierungscocktail (200 µl; für einen Array):

Antikörperlösung (600 µl; für einen Array):

300 µl	2x MES Stain Buffer
24 µl	acetyliertes BSA (50 mg/ml)
6 µl	Normal Goat IgG-Antikörper (10 mg/ml)
6 µl	Biotin Anti-Streptavidin (0,5 mg/ml)
264 µl	ddH ₂ O

Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (600 µl; für einen Array):

300 µl	2x MES Stain Buffer
24 µl	acetyliertes BSA (50 mg/ml)
6 µl	Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml)
270 µl	ddH ₂ O

Waschpuffer A: nicht stringenter Waschpuffer (1000 ml):

300 ml	20x SSPE
1 ml	10% Tween-20
699 ml	dH ₂ O

sterilfiltrieren durch einen 0,2 μ m Filter

Waschpuffer B: stringenter Waschpuffer (1000 ml):

83,3 ml	12x MES-Puffer

5,2 ml	5 M NaCl
3,2 mi	J WI MACI

1 ml 10% Tween-20

910,5 ml dH₂O

sterilfiltrieren durch einen 0,2 μ m Filter und lichtgeschützt bei 2-8°C lagern

2.6.3 Lösungen für die immunmagnetische Zellselektion

MACS-Puffer (500 ml):

0,5%	humanes Serumalbumin
2 mM	EDTA
ad	PBS

2.6.4 Lösungen für den Western Blot

5x Laufpuffer (1000 ml):

192 mM	Glycin
25 mM	Tris
0,1 %	SDS
ad	dH_2O

Polyacrylamidgel (12%):

(a) Trenngel (Ansatz für 2 Gele à 5,5 cm x 8,5 cm)

3,3 ml	dH ₂ O
4,0 ml	Acrylamid
2,5 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
100 µl	10% SDS
100 µl	10% APS
4 µl	TEMED

(b) Sammelgel (Ansatz für 2 Gele à 5,5 cm x 8,5 cm)

3,43 ml	dH ₂ O
0,83 ml	Acrylamid
0,63 ml	1 M Tris, pH 6,8
50 µl	10% SDS
50 µl	10% APS
5 µl	TEMED
Blotting-Transfer-Puffer (Bjerrum-Puffer pH 9,2):

48 mM	Tris-Base
39 mM	Glycin
20 %	Methanol
0,0375 %	SDS
ad	dH2O

2x Lämmli-Puffer:

0,2 M	Tris-Acetat
4 %	SDS
5 %	Glycerol
2%	β-Mercaptoethanol
0,1%	Bromphenolblau

Blockpuffer:

5	0/_	Magarmilahnulyar in	DDC
2	/0		L D O
		\mathcal{O} I	

Waschpuffer (TBS):

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
auf einen pH-	Wert von 7,2 - 7,6 einstellen.

Lysepuffer (Ripa):

50 mM	Tris
150 mM	NaCl
5 mM	NaEDTA
1 %	Triton X-100
0,1 %	Natriumdesoxycholat
0,1 %	SDS
10 11	

pro 10 ml Lysepuffer 1 Tablette Proteaseinhibitor (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche) auflösen

2.7 Spezielle Materialien und Geräte

Material/Gerät	Firma	Ort
96-Well Optical Plate	Applied Biosystems	Weiterstadt
ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems	Weiterstadt
Alpha Imager TM	Biozym	Oldendorf
Axiovert 25	Zeiss	Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus	Hanau
Brutschrank	Heraeus	Hanau
Curix 60 Entwicklungsmaschine	Agfa	Mortsel, Belgien
Cytospin 3	Shandon	Runcorn, UK
Digitalkamera für das Fluoreszenz- Mikroskop	Visotron AG	Wettingen, CH
EasyCast TM Mini Gel Electrophoresis System	Owl Separation Systems	Portsmouth, NH
Easy Reader EAR 400AT	SLT Lab Instruments	Crailsheim
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson	Heidelberg
FLUOstar* Optima ELISA-Reader	BMG-Technologies	Offenburg
GB 003 Gel-Blotting Papier	Schleicher&Schuell	Dassel
Gene Array Scanner G2500A	Agilent Technologies	Waldbronn
Gene Chip [®] Fluidics Station 400	Affymetrix UK Ltd	High Wycombe,UK
Gene Chip [®] Human Genome Focus Array	Affymetrix UK Ltd	High Wycombe,UK
Gene Chip [®] Hybridzation Oven 640	Affymetrix UK Ltd	High Wycombe,UK
Hettich Rotanta/RPC	Hettich	Tuttlingen
Hybond-N+	Amersham Pharmacia	Freiburg
Hybridisierungsofen	Saur Laborbedarf	Reutlingen
Hyperfilm TM (ECL)	Amersham Biosciences	Freiburg
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore	Schwalbach
Konfokales Lasermikroskop Leica TCS SP2 AOBS	Leica Microsystems	Heidelberg

Material/Gerät	Firma	Ort
LS 6500 Multi Purpose Scintillation Counter	Becton Dickinson	Heidelberg
Lymphoprep TM	Axis-Shield	Oslo, Norwegen
Master Cycler Gradient	Eppendorf	Köln
MACS LS Separation Columns	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
MidiMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Mikro 24-48 R	Hettich	Tuttlingen
Micro Diff II, automatisches Zellzählgerät	Beckmann Coulter	Krefeld
MicroSpin [™] Colum	Amersham Pharmacia	Freiburg
Mini Poly-Q Vial (für Scintillationszählung)	Beckman Coulter	Krefeld
Mini Protean II TM	Biorad	München
Megafuge 3 S-R	Heraeus	Hanau
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems	Weiterstadt
pH-Meter Inolab Level 1	WTW	Weilheim
Power Pac 200	Biorad	München
Power Pac 300	Biorad	München
RNA 6000 Nano Lab Chip	Agilent Technologies	Waldbronn
RNA 6000 Pico Lab Chip	Agilent Technologies	Waldbronn
Shandon Filter Cards für Cytospin	Shandon	Runcorn, UK
Spektralphotometer	Eppendorf	Köln
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	PeqLab	Erlangen
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
TB1 Thermoblock	Biometra	Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf	Köln
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad	München
Whatman DE81 Ionenaustauscher- Papier	Whatman	Maidstone, UK
Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Göttingen

2.8 Software

2.8.1 Programme

Programm	Firma/Bezugsquelle	Ort
AlphaEase® FC Version 4.1.0	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
Biosizing, Version. A02.12 (SI292)	Agilent Technologies	Waldbronn
Cellquest, Version 3.3	Becton Dickinson	Heidelberg
FLUOstar* Optima, Version 1.30-0	BMG-Technologies	Offenburg
G-COS-Software, Version 1.2.1	Affymetrix UK Ltd	High Wycombe,UK
Nanodrop, Version 3.1.0	PeqLab	Erlangen
"R", Version 2.2.1	[http://www.biocon	ductor.org/]
SDS, Version 2.1	Applied Biosystems	Weiterstadt
Significance Analysis of Microarrays (SAM), Version 2.23	[http://www-stat.stanford.edu/	/_tibs/SAM/]
Spot, Version 3.5	Zeiss	Göttingen

2.8.2 Datenbanken

Affymetrix NetaffxTM Analysis Center [<u>https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx</u>] Charting pathways of life [<u>http://www.biocarta.com/</u>]

Human Genome Browser [http://www.genome.cse.ucsc.edu/goldenPath/octTracks.html]

Human Genome Server - The Sanger Centre [http://www.ensembl.org]

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [http://www.genome.jp/kegg/]

PubMed, Nucleotide, Protein, OMIM [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]

The GDB Human Genome Database [http://www.gdb.org/]

2.9 Sequenzen

2.9.1 Gene expression assays (TaqMan-Sonden) für die quantitative "Real-Time"-PCR

Zur Verifizierung der Arraydaten wurden nachfolgend aufgeführte genspezifische, exonübergreifende Primer der Firma Applied Biosystems verwendet. Sowohl der Genname als auch die Hersteller-eigene Assay-ID sind aufgeführt:

Gensymbol	Assay-ID	
β-Actin	Hs99999903_m1	
BRCA1	Hs00173233_m1	
BTG2	Hs00198887_m1	
CD79B	Hs00236881_m1	
CDKN1A / P21KIP1	Hs00355782_m1	
CDKN1B / P27KIP1	Hs00153277_m1	
CCNE2 / Cyclin E2	Hs00180319_m1	
DUSP2	Hs00358879_m1	
FANCG	Hs00184947_m1	
GADD45A	Hs00169255_m1	
MSH2	Hs00179887_m1	
IRF7	Hs00185375_m1	
ISGF3 y	Hs00196051_m1	
MAGEA1	Hs00607097_m1	
MT2A	Hs02379661_g1	
MX1	Hs00182073_m1	
OAS1	Hs00242943_m1	
PKR	Hs00169345_m1	
RAD51	Hs00153418_m1	
RB1	Hs00153108_m1	
RPL15	Hs00705011_s1	
STAT1	Hs00234829_m1	
TLR7	Hs00152971_m1	
TNF	Hs00147128_m1	

2.10 Isolation von primären CD19+ B-Zellen aus Buffy Coats

Um für nachfolgende Bestrahlungsexperimente mit dem Bismut-213-konjugierten Anti-CD20-Antikörper das CD20-Antigen nicht zu blockieren, wurden die B-Zellen über das CD19-Oberfächenantigen selektiert. Dies ist möglich, da B-Zellen auf ihrer Oberfläche sowohl CD19- als auch CD20-Oberflächenmoleküle exprimieren [Tedder et al., 1988; 1989a, b]. Das Leukozytenkonzentrat (Buffy Coat) wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Nach Aufschichtung von 25 ml dieser Suspension auf 15 ml Ficoll®-Gradient erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 1600 rpm. Die in dem Interphasering befindlichen mononukleären Zellen (MNCs) wurden anschließend abgenommen, zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und bei 1600 rpm pelletiert, bevor die Zellzahl mit einem automatischen Zählgerät bestimmt wurde (vgl. 2.12). Entsprechend der Zellzahl wurden für die nachfolgende Selektion pro 1x10⁷ MNCs 20 µl CD19-Micro-Beads und 80 µl MACS-Puffer in das Zellpellet gegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem 10-fachen des Inkubationsvolumens mit MACS-Puffer aufgefüllt, gewaschen, erneut bei 1600 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Für die immunmagnetische Selektion wurde die Zellsuspension danach auf die in einem starken Magneten befestigte und mit MACS-Puffer angefeuchtete Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit MACS-Puffer wurden die magnetisch zurückgehaltenen Zellen mit 5 ml MACS-Puffer mit Hilfe eines Stempels in ein neues Gefäß gedrückt. Um eine höhere Reinheit zu erhalten, wurden die auf diese Weise isolierten CD19+ Zellen ein zweites Mal in derselben Weise immunmagnetisch selektiert, wobei die Elution der selektierten Zellen im zweiten Schritt mit 3 ml MACS-Puffer durchgeführt wurde. Für die durchflußzytometrische Reinheitsbestimmung (vgl. 2.11) wurden von der selektierten Zellfraktion 2x10⁵ Zellen abgenommen. In einer 24 Well-Platte wurden in einem Volumen von 2 ml pro Well 1x106 selektierte Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin am Leben erhalten. Die nachstehende Abbildung verdeutlicht den Ablauf der immunmagnetischen Selektion.



Abbildung 2.1. Schematischer Ablauf der immunmagnetischen Selektion von CD19+ Zellen. Nach Dichtegradientenzentrifugation eines Leukozytenkonzentrats (*Buffy Coats*) werden die in der Interphase befindlichen mononukleären Zellen (MNCs) abgenommen und mit Magnet-Beads-konjugierten CD19 Antikörpern markiert. Nach Durchfluss durch eine in einem Magneten eingespannte Separationssäule werden nur die markierten Zellen zurückgehalten. Ist der Magnet entfernt, können die markierten Zellen aus der Säule eluiert werden.

2.11 Reinheitsbestimmung von immunmagnetisch selektierten CD19+-Zellen

Bei der Durchflußzytometrie (*FACS; fluorescence activated cell sorting*) handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe Zellen auf Basis von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden können. Dabei können parallel die Zellgröße und Granularität sowie bis zu vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Die zu analysierenden Zellen werden zunächst mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene inkubiert. Zur Unterscheidung zwischen Oberflächenantigen-positiven

und -negativen Zellen werden zur Kontrolle in einem Parallelansatz Zellen mit unspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps markiert. Die markierten Zellen werden dann im Gerät mit Überdruck in die Messküvette geleitet, wodurch es zur Beschleunigung der Zellen und somit zur Auflösung von kleineren Zellaggregaten kommt. Dies hat zur Folge, dass die Zellen nacheinander die Messeinheit des Gerätes passieren. Am Analysepunkt trifft monochromatisches Licht (λ =488 nm) eines Argonlasers auf die hindurchfließenden Zellen, die sowohl das einfallende Licht streuen als auch durch die Fluorochrome an den Antikörpern Fluoreszenzlicht emittieren. Diese Signale werden von der Detektionseinheit erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Die Abschwächung der Laserstrahlung in ihrem geraden Verlauf wird dabei als forward scatter (FSC) bezeichnet und stellt ein Maß für die Zellgröße dar, während die Streuung der Laserstrahlung beim Durchtritt durch die Zellen infolge von granulären Bestandteilen im sog. side scatter (SSC) gemessen wird und ein Maß für die Dichte und Granularität der Zellen ist. Das emittierte Licht der unterschiedlichen Fluorezenzfarbstoffe wird in verschiedenen Kanälen gemessen (FL1; λ =530 nm, FL2 ; λ =585 nm, FL3; λ =650 nm) und dient nicht nur der Unterscheidung zwischen Vorliegen und Abwesenheit eines Oberflächenantigens, sondern stellt auch ein Maß für den Expressionsgrad der Oberflächenmarker dar, da die emittierte Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper ist.

Je $2x10^5$ immunmagnetisch selektierte und mit PBS-Puffer gewaschene Zellen wurden 10 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert und das nicht sichtbare Pellet in 100 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl Isotyp-Kontrollantikörper bzw. PE-konjugiertem CD20-Antikörper erfolgte ein 20 minütiger Inkubtionsschritt bei 4°C. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 ml PBS aufgefüllt, 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Für die nachfolgende Messung am Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson) wurden jeweils 10.000 Ereignisse acquiriert, d.h. es wurden 10.000 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte über Punktwolkendiagramme (Dotplots), bei denen der SSC-Parameter auf der X-Achse und die PE-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse dargestellt werden sowie mit Hilfe von Histogrammen, bei denen die gezählten Ereignisse (counts) in Abhängigkeit von der PE-Fluoreszenzintensität gezeigt werden. Um Informationen über die Reinheit der selektierten Zellen zu erhalten, wurde zunächst der Grenzwert der Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle bestimmt und festgesetzt. Alle Ereignisse, deren Fluoreszenzintensität über dem Schwellenwert der Isotypkontrolle lag, wurden als positiv erachtet. Die Reinheit der auf diese Weise selektierten CD19 positiven Zellen lag im Mittel bei etwa 98%. In der folgenden Abbildung ist ein Beispiel einer durchflusszytometrischen Reinheitsbestimmung von selektierten CD19+ Zellen über einen CD20-Antikörper dargestellt.



Abbildung 2.2. Exemplarisches Ergebnis einer durchflusszytometrischen Reinheitsbestimmung von selektierten CD19+ Zellen. **A:** Messung der Isotypkontrolle. Die mit dem unkonjugierten Isotypkontrollantikörper markierten Zellen zeigen eine geringe Eigenfluoreszenz, die unter dem festgesetzten Schwellenwert liegt (mittlerer Dotplot und rechtes Histogramm von Abb. A). **B:** Messung der CD20+ Zellen. Durch Bindung des CD20PE-konjugierten Antikörpers an freie CD20-Antigene der selektierten CD19+ Zellen steigt die Fluoreszenzintensität weit über den Schwellenwert (mittlerer Dotplot und rechtes Histogramm von Abb. B) und gibt damit Informationen über die Menge und Reinheit der selektierten Zellpopulation in Bezug auf die Isotypkontrolle. Die Zellgröße (FSC) und die Granularität (SSC) ändern sich in beiden Fällen nicht (jeweils linke Dotplots).

2.12 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Zellzahlen wurden unter Verwendung eines automatischen Zellzählgerätes (Coulter Micro Diff II, Beckman Coulter) ermittelt. Die Bestimmung der Vitalität von Zellen erfolgte durch Zugabe eines äquivalenten Volumens einer 0,5% igen (w/v) Trypanblau-Lösung zu PBSgewaschenen Zellen. Tote Zellen wurden aufgrund von Membranschädigungen von diesem Farbstoff komplett blau angefärbt, während vitale Zellen ungefärbt blieben. Blaugefärbte und ungefärbte Zellen wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauerzählkammer betrachtet und ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde dabei durch Auszählung von insgesamt 4 Eckquadraten á 16 Kleinquadrate ermittelt und über folgende Formel errechnet:

$$[Zellkonzentration pro \mu l] = \frac{Gezählte Zellzahl x 10 x Verdünnungsfaktor mit Trypanblau}{Anzahl der ausgezählten Eckquadrate}$$

wobei sich der Faktor 10 aus dem Volumen $(0,1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}) = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$ eines jeden Eckquadrates ergibt. Die Zellzahl pro Eckquadrat wird durch das Volumen von 0,1 µl geteilt bzw. mit dem Kehrwert multipliziert.

2.13 Gewinnung des alpha-strahlenden Isotops Bismut-213 aus Actinium-225

Die Gewinnung des Alphastrahlers Bismut-213 erfolgte im Institut für Transurane (Karlsruhe) der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission. Als Ausgangsprodukt für die Herstellung des Alphastrahlers diente das aus dem US-Amerikanischen Kernwaffenprogramm als Abfallprodukt verbleibende Radionuklid Thorium-229, aus dem anschließend das Mutternuklid Actinium-225 gewonnen wurde (vgl. Tabelle 1.1.). Vor der Elution des Bismut-213 aus dem Actinium-225 wurde das aufgereinigte ²²⁵Ac in einen Generator mit 2 ml 6 M HNO₃ geladen und dieser durch sequentielle Waschschritte mit 2 ml 0,05 M HNO₃, 2 ml 2 M HCl und 2 ml 0,01 M HCl mit Chloridionen gefüllt. Die Elution des Bismut-213 aus dem Generator erfolgte mit 600 µl 0,1 M NaI / 0,1 M HCl, wobei das Eluat in Form von BiI_4^{-}/BiI_5^{2-} Anionen vorlag. Das Eluat wurde anschließend durch Zugabe von 100 µl 4 M Natriumacetatlösung und 50 µl einer 20%-igen Ascorbinsäurelösung auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt.

2.14 Herstellung des Bismut-213-CD20 Konjugates und Bestimmung der Aktivität

Für die Markierung wurden 100 µg des chelatierten CD20-Antikörpers (CHX-A''-DTPA-CD20) zum Bismut-213-Eluat gegeben und 5 Minuten inkubiert, um die Komplexierung mit dem Alphastrahler stattfinden zu lassen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl einer DTPA-Lösung (1,5 mg/ml) gestoppt. Der Bismut-213 markierte Antikörper wurde danach umgehend durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer PD-10 Säule von freiem Bismut gereinigt und schließlich mit 2 ml PBS-Puffer eluiert. Die radiochemische Reinheit der eluierten Fraktion wurde über *Instant Thin Layer Chromatography (ITLC*) kontrolliert und die Aktivität in einem Gamma-Counter (Cobra, Canberra, USA) gemessen. Abbildung 2.3. zeigt den schematischen Ablauf der Herstellung des ²¹³Bi-CD20-Konjugates.



Abbildung 2.3. Schematischer Ablauf der Herstellung des alphastrahlenden Radioimmunkonjugats ²¹³Bi-CD20. Mit Hilfe von Salzsäure und Natriumiodid wird das Bismut-213 aus Actinium-225 eluiert. Nach Kopplung des Radioisotops mit dem chelatierten CD20-Antikörper wird das Konjugat mit Hilfe von Größenausschlußchromatographie über eine PD10-Säule aufgreinigt. Im Anschluß erfolgen die Bestimmung der Aktivität des fertigen Konjugates sowie die Zugabe zu den K422 und primären CD19+ Zellen.

2.15 Durchführung der Bestrahlung mit dem Bismut-213-CD20 Konjugat

Für die Bestrahlung der Zellen wurde das aufgereinigte ²¹³Bi-CD20 Radioimmunkonjugat in Aktivitäten von 100 μ Ci und 200 μ Ci für jeweils 46 Minuten (entspricht einer Halbwertszeit

des Bismut-213) und 24 Stunden Expositionszeit zu den Zellsuspensionen gegeben. Die einer Konzentration von 1x10⁶ / 2 ml Medium mit dem Zellen wurden in Radioimmunkonjugat in einer 24 Well-Platte 37°C 5% bei und CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

2.16 Genexpressionsanalysen mit Affymetrix Microarrays

2.16.1 Theoretischer Hintergrund

Für die Untersuchung der differentiellen Genexpression von alpha-bestrahlten und unbestrahlten primären CD19+ Zellen und K422 Zellen wurden mRNA-Präparationen unter Verwendung der DNA Microarray-Technologie analysiert. Mit dieser Technik ist es möglich, den aktuellen Zustand der Expressionsstärke von mehreren Tausend Genen gleichzeitig zu bestimmen und auf diese Weise Genexpressionsprofile zu erstellen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Microarrays handelt es sich um die "Human Genome Focus Oligonukleotid-Arrays" (HG-Focus Arrays) der Firma Affymetrix, auf denen 8.793 Gene repräsentiert sind. Diese Arrays enthalten ein ca. 1,7 cm² großes, mit Silan beschichtetes Quarzplättchen. Durch kombinierte Verfahren aus der Photolithographie und der kombinatorischen Chemie sind cDNA-Nukleotidketten mit einer Länge von 25 Basen (25-mer Oligonukleotid) auf diese Silan-Matrix synthetisiert. Ein Array enthält bis zu 500.000 verschiedene Areale (sog. Tiles) mit einer Fläche von jeweils 20 μ m x 20 μ m, auf denen jeweils 1x10⁶ bis 1x10⁷ Kopien einer spezifischen Oligonukleotid-Sequenz (Sonde) liegen und die für die quantitative Detektion der aRNAs (antisense RNAs) mit komplementärer Sequenz dienen. Durch die Hybridisierung der mit Streptavidin-Phycoerythrin konjugierten spezifischen Gentranskripte an die Sonden auf der Arrayoberfläche, kann die Expression spezifischer Gene über die Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.

Zu jeder exakten cDNA Oligonukleotidsequenz, die perfekt mit der komplementären Sequenz der Ziel-mRNA übereinstimmt (*Perfect-Match*-Sonde), gibt es auch eine *Mismatch*-Sonde, die bis auf einen 1-Basen-*Mismatch* im zentralen Bereich der Sonde die identische Sequenz aufweist. Über die *Mismatch*-Sonden werden störende Hintergrundsignale, unspezifische Hybridisierungen oder Kreuzhybridisierungen quantifiziert und über Verrechnung der Signalintensitäten von *Perfect-Match*- und *Mismatch*-Sonde eliminiert. Die Unterschiede in der Hybridisierungsintensität zwischen den *Perfect-Match* und den *Mismatch*-Sondenpaaren dienen als Indikator für die spezifische Bindung an die Zielsequenz. Von den 8.793 repräsentierten Genen enthalten ca. 8700 Gensequenzen von humanen Genen. Um später mehrere Arrays vergleichen zu können, enthält jeder Array zusätzlich Gensequenzen der *Housekeeping*-Gene *GAPDH*, β -Actin und STAT1. Zusätzliche prokaryotische Kontrollsequenzen von Genen des bakteriellen Biotinsyntheseweges von E. coli (*BioB*, *BioC* und *BioD*) sowie Sequenzen des *CRE*-Rekombinasegens des Bakteriophagen P1, geben Informationen über die Hybridisierungseffizenz. Um ein genaues Ausrichten des Gitters zu gewährleisten und damit die Zuordnung der Oligonukleotide zu erleichtern, befinden sich an allen vier Ecken des Arrays zusätzlich von Affymetrix genannte B2 -Oligonukleotide.

Nach Vorinkubation des Arrays erfolgt die Hybridisierung der aRNA an die Oligonukleotidsonden auf dem Chip. Nach Wasch- und Färbeschritten verbleiben nur die in der Probe enthaltenen Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund von Basenkomplementarität an die entsprechenden Oligonukleotidsonden binden. Durch die in der Färbeprozedur stattfindende Bindung des Streptavidin-Phycoerythrinkomplexes an die biotinylierte aRNA können die hybridisierten Nukleinsäuresequenzen bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 488$ nm detektiert werden. Die gemessenen Signalintensitäten werden anschließend bioinformatisch ausgewertet.

2.16.2 cDNA-Synthese und in vitro Transkription von isolierter Total-RNA

Für die Erstellung der Genexpressionsprofile wurde zunächst aus Zell-Lysaten, die aus jeweils 1×10^6 Kontroll- und bestrahlten Zellen hervorgingen, die Total-RNA extrahiert (vgl. 2.24.2.). Da für die Arrayanalysen ausschließlich vollständig intakte RNA verwendet werden sollte, wurde diese anschließend vor ihrer weiteren Aufarbeitung mit dem *Agilent Bioanalyzer 2100* auf ihre Integrität überprüft (vgl. 2.25.1).

Die Aufarbeitung von isolierter Total-RNA zu amplifizierter und biotinylierter aRNA erfolgte mit Hilfe des MessageAmpTM aRNA Kits der Firma Ambion. Die Methode basiert auf dem RNA-Amplifikationsprotokoll von James H. Eberwine [Van Gelder *et al.*, 1990] und gliedert sich in die beiden Hauptschritte "cDNA-Synthese des Erst- und Zweitstranges" und "*in vitro*-Transkription", denen jeweils ein Aufreinigungsschritt folgt. Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng isolierter RNA der bestrahlten K422 Zellen oder, aufgrund der niedrigeren Ausbeute, 250 ng RNA der bestrahlten primären CD19+ Zellen eingesetzt und unter Zusatz von 1 µl Spike-RNA (1:25.000 mit dH₂O verdünnt) mit Hilfe von

Oligo (dt)-Primern revers transkribiert. Die Primer enthielten eine 5'-angehängte T7 Promotersequenz, die als Ansatzstelle für die spätere *in vitro*-Transkription diente. Nach erfolgter Zweitstrangsynthese schloss sich, ausgehend von diesem cDNA-Produkt, die 6 stündige *in vitro*-Transkription zur Synthese der biotinylierten aRNA (*antisense* RNA), unter Verwendung von biotinylierten dNTPs (Enzo; Farmingdale, NY), an. Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurde die fertig biotinylierte und amplifizierte aRNA erneut mit Hilfe des *Agilent Bioanalyzers 2100* (vgl. 2.25.1) auf ihre Qualität hin getestet.

2.16.3 Fragmentierung der aRNA

Zur optimalen Hybridisierung der biotinylierten aRNA mit den komplementären Oligonukleotidsequenzen musste diese vorher fragmentiert werden. Eine für die Hybridisierung notwendige Menge von 3 µg - 10 µg aRNA (optimale Menge ist 10 µg) wurde hierzu entnommen und, wenn nötig, in einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 24 µl eingeengt. Anschließend wurde die Probe mit 6 µl Fragmentierungspuffer (200 mM TRIS-Actat, pH 8,2, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc; Affymetrix) versetzt und 35 Minuten bei einer Temperatur von 94°C inkubiert. Um zu vermeiden, dass sich Kondensat an der Deckelinnenseite des Reaktionsgefäßes bildete, wurden die Proben mehrmals kurz abzentrifugiert.

2.16.4 Hybridisierung der fragmentierten aRNA auf Affymetrix Microarrays

Die Hybridisierung der Arrays wurde in der von Prof. Bojar geleiteten Affymetrix Core Lab Facility im Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Vor der Hybridisierung wurden die Arrays zunächst 10 Minuten mit 140 μ l 1xMES- Hybridiserungspuffer bei 45°C und 60 rpm im Gene Chip[®] Hybridisierungsofen 640 (Affymetrix) prähybridisiert. In dieser Zeit wurden 200 μ l des Hybridisierungscocktails (vgl. 2.6.2) einschließlich der fragmentierten aRNA zusammenpipettiert, für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf 45°C abgekühlt und bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach Entfernen der Prähybridisierungslösung wurde der Array mit der vorbereiteten Hybridisierungslösung gefüllt und anschließend für 16 Stunden bei 45°C und 60 rpm hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend entfernt und der Array wurde mit 280 μ l Waschpuffer A befüllt. Anschließend wurden die Arrays in die Waschstation (*Gene Chip[®] Fluidics Station 400*; Affymetrix) eingelegt. Nach Befüllung der Station mit Puffer A und Puffer B wurden die Arrays (maximal 4 Arrays gleichzeitig) mit

dem für den jeweiligen Arraytyp entsprechenden Programm (Midi-euk2v3) gewaschen. Unmittelbar nach der Waschprozedur wurden 600 µl der zwischenzeitlich angesetzten Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung dem Array zugesetzt und 40 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 600 µl der Antikörperlösung. Nach einer 10 minütigen Inkubation in dem Array wurde diese entfernt und zur Signalverstärkung durch weitere 600 µl Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung ausgetauscht, die ebenfalls 10 Minuten in dem Array inkubierte. Um sämtliche Reste der Färbelösung sowie überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde der Array erneut gewaschen.

2.16.5 Scannen der hybridisierten Arrays und Analyse der Daten

Die fertig hybridisierten Arrays wurden in einem *GenArray*[®] 2500 Scanner von Agilent bei einer Pixelauflösung von 3 µm und einer Anregungswellenlänge des Phycoerythrins von λ =488 nm gescannt. Die emittierte Wellenlänge betrug λ =570 nm. Jeder Scan eines Arrays wurde quantifiziert, indem die mittlere Signalintensität auf eine Zielintensität von 100 gesetzt wurde. Anschließend erfolgte die bioinformatische und statistische Auswertung der Arraydaten.

2.16.6 Statistische Analysen und Ermittlung von differentiell hoch- oder herabregulierten Genen

Für die Durchführung der Qualitätskontrolle, Normalisierung und Datenanalyse wurde ein im Bioconductor Projekt (http://www.bioconductor.org/) integriertes Paket von statistischen Funktionen mit der Programmiersprache "R" verwendet. Zur Qualitätskontrolle der einzelnen Proben und Hybridisierungen wurden Histogramme der Perfekt-Match-Intensitätsverteilungen, Boxplots, 5' nach 3' RNA Degradationsplots und Scatter-Plots erstellt. Für die Normalisierung der Rohdaten der Arrays wurde die VSN-Methode (variance stabilization normalization) verwendet. Diese Methode gleicht experimentell bedingte Unterschiede in den relativen Fluoreszenzintensitäten untereinander aus. Bei dieser Methode werden die Intensitäten logarithmisch aufgetragen, wobei die Varianz der Proben unabhängig voneinander letztendlich sehr gering ausfällt.

Um bestrahlte und unbestrahlte Proben miteinander vergleichen und differentiell exprimierte Gene identifizieren zu können, wurde auf die normalisierten Daten der SAM-Algorithmus (*Significance Analysis of Microarrays*; <u>http://www-stat.stanford.edu/_tibs/SAM/</u>) für gepaarte Proben angewendet. Der Algorithmus enthält eine stufenlos einstellbare Skala für die *false* *discovery rate* (FDR) für signifikant hoch- oder herunterregulierte Gene. Bei der Methode wurden alle Daten mit Hilfe des Zwei-Klassen-Modus für ungepaarte Proben über 1000 Zyklen permutiert. Die FDR bezeichnet die Anzahl der falsch positiven Gene innerhalb einer Gruppe von signifikanten Genen und wurde auf einen Wert von 5% festgesetzt. Der q-Wert gibt für jedes einzelne Gen die FDR an, bei der dieses Gen noch als signifikant detektiert wird. Der q-Wert ist somit für jedes Einzelgen ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, als falsch positiv angegeben zu werden. Bei einer festgesetzten FDR von 5% hat jedes Gen somit einen q-Wert von $\leq 5\%$. Um die Anzahl differentiell exprimierter Gene weiter zu reduzieren, wurden nur Gene betrachtet, die eine Expressionsänderung (*fold change*) von $\geq 1,4$ und $\leq 0,7$ zeigten. Bei der *fold change*-Ermittlung wurden die Fluoreszenzintensitäten der normalisierten, korrespondierenden Proben gemittelt und relativ zu den bestrahlten und unbestrahlten Proben berechnet. Die hierarchische Clusteranalyse (*unsupervised*) wurde unter Verwendung der "hclust" Funktion durchgeführt, die ebenfalls im Paket des Bioconductor Projekts integriert ist.

2.17 Verifizierung ausgewählter Gene mit Hilfe der quantitativen "Real-Time"-PCR

2.17.1 Reverse Transkription

Die Transkription von mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe der M-MLV Reversen Transkriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Invitrogen durchgeführt. In einem Voransatz von 20 μ l wurden 500 ng zelluläre RNA aus K422 Zellen und 250 ng zelluläre RNA aus CD19+-Zellen mit RNase-freiem Wasser für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 20 μ l eines Ansatzes, bestehend aus 8 μ l Transkriptase Puffer [5x], 0,4 μ l DTT [0,1M], 4 μ l dNTPs [10mM], 1,2 μ l N6-Random Primer [0,5 μ g/ μ l], 4,5 μ l Rnase freiem Wasser, 250 U M-MLV-Reverse Transkriptase und 26 U RNase-Inhibitor wurden die Proben 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die M-MLV-RT 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Die entstandenen cDNAs wurden bei -80°C gelagert.

2.17.2 Quantitative "Real-Time"-PCR

Die quantitative "Real-Time"-PCR zur Verifizierung der Genexpressionsdaten, die aus den Microarrays gewonnen wurden, wurde am ABIPrism 7900HT Sequence Detection System

durchgeführt. Die PCRs wurden als Duplikatmessungen zur statistischen Absicherung für jedes Gen mindestens drei Mal durchgeführt. Eine Reaktion bestand aus 2 μ l cDNA (vgl. 2.17.1), 10 μ l TaqMan[®] Universal PCR MasterMix, 1 μ l 20x Assay-on DemandTM Gene Expression Assay Mix und 7 μ l Nuklease-freiem Wasser, wobei in einer 96-Well-Platte simultan 96 verschiedene Reaktionen stattfinden und ausgewertet werden konnten. Neben ausgewählten Targetgenen (vgl. 2.9) wurde als Referenz das *Housekeeping*-Gen β -Actin mitgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
UNG-Aktivierung	50°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 sec	10
Primer-Anlagerung/Verlängerung	60°C	1 min	¥۲0

Die aus der PCR für jedes einzelne Target-Gen generierten Daten wurden von der Software als C_t (*threshold cycle*)-Werte ausgegeben. Zur Normalisierung wurde zunächst für jede Probe die Differenz jedes Targetgens und des Referenzgens berechnet (so genannter ΔC_t -Wert). Anschließend erfolgte die Berechnung des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes, indem der ΔC_t -Wert der unbehandelten Kontrollprobe von dem der entsprechenden behandelten Probe abgezogen wurde. Die entlogarithmierten Werte dieser Differenz beschreiben die *fold change*. Folgende Formel veranschaulicht die Berechnung der *fold change*:

Fold Change = 2
$$\begin{bmatrix} C_{t_{(Targetgen)}} - C_{t_{(Referenzgen)}} \end{bmatrix}_{unbehandelte Probe} - \begin{bmatrix} C_{t_{(Targetgen)}} - C_{t_{(Referenzgen)}} \end{bmatrix}_{behandelte Probe}$$

Zu beachten ist, dass bei der Verwendung dieser Formel vorausgesetzt bzw. angenommen wird, dass die Effizienz der PCR bei einem Wert von 2 liegt.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend zur Kontrolle in einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel visualisiert.

2.17.3 Berechnung der Signifikanz

Die Berechnung, ob ein Gen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant unterschiedlich reguliert ist, wurde mit dem in MS Excel integrierten Students-T-Test durchgeführt. Grundlage der Berechnung waren die aus den unterschiedlichen PCR- Reaktionen ermittelten Δ Ct-Werte. Die Berechnung wurde mit einem zweiseitigen T-Test vom Typ 2 (zwei Stichproben mit gleicher Varianz (homoskedastisch)) für ungepaarte Proben durchgeführt. Die Gene wurden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen als signifikant (unterschiedlich reguliert) angesehen, wenn die Signifikanz unter einem Wert von 0,05 und als hoch signifikant angesehen, wenn der Wert unter 0,001 lag.

2.18 Untersuchung von DNA-Schäden über γH2AX-Immunfluoreszenz

2.18.1 Immobilisierung und Fixierung der Zellen auf Objektträger

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz mussten die in PBS gewaschenen Zellen zunächst auf Glasobjektträger gebracht werden. In einem Volumen von 80 μ l wurden 4x10⁵ K422 Zellen bzw. 5x10⁵ primäre CD19+ Zellen mit Hilfe einer Zytozentrifuge 5 Minuten bei 350 rpm und einer mittleren Rotorbeschleunigung auf die Objektträger zentrifugiert. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte durch Aufträufeln von je 60 μ l einer 4% igen Paraformaldehydlösung auf jedes Zellpräparat und einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden nachfolgend kurz mit PBS gewaschen und getrocknet und konnten bei Bedarf bei -20°C gelagert werden.

2.18.2 Antikörperfärbung von YH2AX und Kernfärbung mit Hoechst 33342

Die auf den Objektträgern immobilisierten und fixierten Zellen wurden zunächst 20 Minuten mit 0,1% PBT (PBS mit 0,1% Triton X-100) bei Raumtemperatur permeabilisiert. Um unspezifische Bindestellen innerhalb der Zellen bzw. Zellkerne abzusättigen, wurden die Präparate anschließend mit einer Block-Lösung, bestehend aus 0,1% PBT und 5% BSA eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer kurzen Waschung mit 0,1% PBT wurde der primäre Antikörper (γ H2AX, clone JBW301; Upstate) 1:50 in der Block-Lösung verdünnt, auf die Zellpräparate pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden nachfolgend 4x 20 Minuten mit 0,1% PBT gewaschen, bevor die Präparate mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG; Invitrogen) 1:100 in der Block-Lösung verdünnt ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Präparate erneut 4x 20 Minuten mit 0,1% PBT und 2x 20 Minuten mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Es schloss sich eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (Invitrogen) in einer Konzentration von 10 µg/ml an. Die Zellen wurden 5 Minuten mit dem Farbstoff inkubiert, bevor sie letztmalig 10 Minuten mit PBS gewaschen wurden. Die Präparate wurden anschließend mit Eindeckmedium (Prolong AntiFade Reagenz; Invitrogen)

eingebettet und mit einem Deckgläschen geschützt. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit handelsüblichem, farblosem Nagellack versiegelt, um ein seitliches Austreten des Eindeckmediums zu verhindern. Anschließend wurden die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von λ =493 nm (für γ H2AX) und λ =352 nm (für Hoechst 33342) und im Durchlicht sowie unter einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet und fotografiert.

2.19 Messung des genomweiten Methylierungsstatus

2.19.1 Theorie und Funktionsweise des "Cytosin Extension Assays"

Assav" bietet ...Cytosin Extension die Möglichkeit, genomweite DNA-Der Methylierungsveränderungen zu untersuchen. Die Grundlage für die Messung der Methylierung sind CpG-Dinukleotide, die oft als so genannte CpG-Inseln in einer hohen Anzahl im Genom vorkommen und deren Cytosine häufig methyliert sind. Ausgangspunkt des Assays ist die für das methylierungssensitive Restriktionsenzym Hpa II spezifische Erkennungssequenz 5'-C\CGG-3', die statistisch alle 256 Basen zu finden ist. Die Reaktion findet nur statt, wenn das Cytosin des CpG-Dinukleotids der Erkennungssequenz unmethyliert ist und hinterlässt nach Restriktion ein 5'-überhängendes Ende. Nach der Restriktion können die 3'-Enden mit einem Tritium-markierten Desoxycytidin aufgefüllt und die auf diese Weise markierten DNA-Fragmente anschließend in einem Beta-Szintillations-Counter gemessen werden. Die Intensität der Radioaktivität wird über die gemessenen *counts* pro Minute (cpm) ermittelt und ist proportional zur Menge der inkorporierten markierten Nukleotide. Die cpm sind ein Maß dafür, wie oft Hpa II an unmethylierten Erkennungssequenzen schneiden konnte und daher auch ein Maß für den Methylierungszustand der DNA. In Abbildung 2.4. wird das Prinzip dieser Methode schematisch dargestellt.



Abbildung 2.4. Funktionsweise des "Cytosin Extension Assays" zur Analyse genomweiter Methylierungsveränderungen: 1 und 2: Die zu untersuchende DNA wird mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym Hpa II in den Erkennungssequenzen (grün markiert) geschnitten und hinterläßt 5' überhängende Enden. Erkennungssequenzen, deren CpG-Dinukleotid methyliert sind, werden nicht angegriffen. 3: Nach Inkorporation von Tritium-markiertem Cytidin können über die Intensität der Radioaktivität Rückschlüsse über den Methylierungszustand gewonnen werden.

2.19.2 Herstellung von Positivkontrollen mit unterschiedlicher DNA-Methylierung

Zur Herstellung von zunächst komplett methylierter DNA wurde die aus unbehandelten Zellen isolierte DNA mit SssI-Methylase und dem Methylgruppendonator S-Adenosyl-Methionin (SAM) behandelt. Die SssI-Methylase katalysiert die Bindung von Methylgruppen an Cytosinreste der DNA in CpG-Dinukleotiden. 3 µg isolierte DNA wurden zunächst mit Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 µl Reaktionspuffer [10x], 4,8 µL SAM [32 mM], 18 U SssI Methylase und 25,7 µl Wasser wurde der Ansatz zunächst 4 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 20 Minuten. Zur Fällung und Aufreinigung wurde der fertige 50 µl Ansatz mit der methylierten DNA zunächst mit 1/5 Volumen 4M LiCl vermischt. Nach Zugabe des zweieinhalbfachen Volumens an absolutem Ethanol wurde die Lösung vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei -70°C gefällt. Anschließend vorsichtig abgenommen. Das erhaltene Pellet

wurde kurz getrocknet und in 25 μ l Wasser aufgenommen. Danach erfolgte die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung (vgl. 2.25). Zur Herstellung von unterschiedlich methylierten Kontrollproben für die Etablierung des Assays wurden schließlich unterschiedliche Mengen an methylierter und unmethylierter DNA entsprechend der nachstehenden Tabelle in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, wobei darauf geachtet wurde, dass die resultierende Menge an DNA immer gleich war.

Tabelle 2.1. Dargestellt sind die Mischungsverhältnisse von unmethylierter und methylierter DNA, um eine DNA-Standardreihe mit aufsteigendem Methylierungszustand zu erhalten.

X Teile unmethylierter DNA	Y Teile methylierter DNA	Methylierung in Prozent
1	0	0 % methyliert
0,75	0,25	25 % methyliert
0,5	0,5	50 % methyliert
0,25	0,75	75 % methyliert
0	1	100 % methyliert

2.19.3 Verdauung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Qualitätsprüfung der methylierten DNA für die Positivkontrollen des "Cytosin Extension Assays" wurden in einem 50 μ l Reaktionsansatz 0,5 μ g DNA mit 5 U Hpa II bzw. 5 U Msp I in 5 μ l der entsprechenden Puffer [10x] über Nacht bei 37°C verdaut und die Enzyme anschließend 20 Minuten bei 65°C inaktiviert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte für die Msp I geschnittene methylierte DNA eine Degradation über den gesamten Auftrennungsbereich erwartet werden, während für die Hpa II (un-)geschnittene methylierte DNA nur eine Bande in einem Größenbereich von 30 Kb erwartet wurde.

Zur Abschätzung der Qualität der unterschiedlich methylierten DNA-Kontrollen wurden jeweils 0,5 µg DNA mit den Restriktionsenzymen Hpa II und Msp I nach obiger Vorschrift verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Während nach Restriktion mit Msp I unabhängig vom Methylierungszustand bei allen Proben eine Degradation über die gesamte Laufstrecke zu erwarten war, sollte nach Verdauung der Proben mit Hpa II diese Degradation mit steigender Methylierung immer weiter abfallen.

Für den eigentlichen "Cytosin Extension Assay" wurden in einem 50 µl Restriktionsansatz 2 µg DNA (Proben-DNA und DNA der Standardreihe) mit 10 U Hpa II in dem passenden

Restriktionspuffer [10x] über Nacht bei 37°C verdaut und das Restriktionsenzym anschließend 20 Minuten bei 65°C inaktiviert. In einem Parallelansatz wurde für die spätere Hintergrundberechnung ebenfalls $2 \mu g$ der oben genannten DNA denselben Restriktionsbedingungen unterworfen, jedoch wurde das Restriktionsenzym durch die entsprechende Menge an Wasser ersetzt, so dass keine Restriktion stattfinden konnte.

2.19.4 Durchführung des "Cytosin Extension Assays"

In einem 25 µl-Reaktionsansatz, bestehend aus 250 ng Hpa II-verdauter DNA, 0.5 µl ³HdCTP [1 mCi/ml], 2,5 µl Polymerasepuffer [10x], 0,5 µl MgCl₂ [50 mM], 0,25 U Taq-Polymerase und 15,2 µl Wasser wurde die Verlängerung in 3'-Richtung mit Hilfe des Tritium-markierten Desoxycytidins gestartet. Die Reaktion erfolgte über eine Stunde bei 56°C in einem Hybridisierungsofen. Von jedem 25 µl Ansatz wurden zweimal 10 µl abgenommen (Doppelbestimmung), auf je ein DE81-Ionenaustauschpapier pipettiert und kurz trocknen gelassen. Jedes Filterpapier wurde zweimal 10 min mit 50 ml Natriumphosphatpuffer/0,2% SDS (pH 7) gewaschen, dazwischen schloss sich immer ein 5 minütiger Trocknungsschritt bei 56°C im Hybridisierungsofen an. Nach letzmaliger Trocknung wurde jedes Filterpapier in ein eigenes Szintillationsröhrchen gegeben und dieses mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Perkin-Elmer) aufgefüllt. Die Messung der Radioaktivität des eingebauten Tritiummarkierten Cytosins erfolgte in einem Beta-Szintillations-Counter, wobei jede Probe 5 Minuten gemessen wurde. Bei der Szintillationsmessung wird die radioaktive Strahlung indirekt anhand der sekundär erzeugten Luminiszenz, die die Strahlung in den organischen Molekülen der Szintillationsflüssigkeit induziert, gemessen. Die gemessenen counts pro Minute (cpm) sind proportional zur Intensität der Radioaktivität und somit zur Menge der inkorporierten markierten Nukleotide. Daher stellen sie ein Maß dafür dar, wie oft Hpa II an unmethylierten Erkennungssequenzen schneiden konnte.

2.20 Untersuchungen der Apoptose

2.20.1 Analyse über Annexin V-FITC und Propidiumiodid

Die Apoptosemessung der alpha-bestrahlten Zellen wurde mit dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 1 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Neben der Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns sowie der internukleosomalen Spaltung der DNA geht der programmierte Zelltod mit dem Verlust der Plasmamembran-Integrität einher. Der Verlust der Plasmamembran ist eines der frühen Ereignisse in der Apoptose. In apoptotischen Zellen transloziert das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) aus der inneren Membranschicht und wird auf der äußeren Seite exponiert. Annexin V ist ein 35-36 KDa schweres Ca²⁺ abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, das sich durch seine hohe Affinität für PS auszeichnet und an Zellen mit exponiertem PS bindet. Die Bindung des Annexins stellt somit die Basis der Apoptosemessung dar. Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden die Zellen in demselben Ansatz mit Propidiumiodid gegengefärbt. Vitale Zellen mit intakten Membranen nehmen kein Propidiumiodid auf, binden kein Annexin und bleiben daher ungefärbt. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden maximal 10.000 Zellen gezählt, wobei Annexin V-FITC gefärbte Zellen im FL1 Kanal bei einer Wellenlänge von λ =530 nm und Propidiumiodid gefärbte Zellen im FL3 Kanal bei einer Wellenlänge von λ =650 nm registriert wurden. Annexin V-FITC positive und Probidiumiodid negative Zellen befinden sich in der frühen Phase der Apoptose, während Zellen, die für beide Komponenten positiv gefärbt sind, die Endphase der Apoptose vollziehen, nekrotisch, oder bereits tot sind. Die Informationen über Spezifität und Fluoreszenzintensitäten wurden grafisch als zweidimensionale Dotplots dargestellt, bei denen die Fluoreszenzintensität des Annexins auf der X-Achse und die des Propidiumiodids auf der Y-Achse dargestellt wurden.

2.20.2 Analyse über Caspase-3

Eine wichtige Rolle in der Apoptose spielen die Cysteinproteasen, zu denen die Caspase-Familie gehört. Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in der Induktion und Progression der Apoptose sowie in Entzündungsreaktionen. Die Caspase-3 stellt eine wichtige Protease dar, die in einem frühen Stadium der Apoptose aktiviert wird. Wie andere Mitglieder dieser Proteasefamilie auch, wird sie als ein inaktives Proenzym synthetisiert und bei Eintritt in die Apoptose durch Selbstproteolyse oder proteolytische Spaltung durch andere Proteasen prozessiert. Die aktive Caspase-3 spaltet proteolytisch weitere Caspasen und weitere Targets wie D4-GDI und BCL-2 im Zytoplsma und PARP im Nukleus und stellt einen Marker für apoptotische Zellen dar.

Die Caspase-3 Messungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Messung wurden mit kaltem PBS-Puffer gewaschene, bestrahlte und unbestrahlte Zellen in Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendiert und auf eine Konzentration von $1x10^{6}$ Zellen / 0,5 ml gebracht. Die Zellen wurden in diesem Puffer 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit 0,5 ml Perm/Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen wurden. Jeweils $1x10^{6}$ Zellen wurden anschließend mit 120 µl Antikörperlösung (100 µl Perm/Waschpuffer und 20 µl FITCkonjugierter Anti-Caspase-3-Antikörper) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze erneut mit 1 ml Perm/Waschpuffer gewaschen, für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet für die durchflusszytometrische Messung in 0,5 ml Perm/Waschpuffer resuspendiert. Für die Analyse wurden im Durchflusszytometer maximal 10.000 Zellen gezählt. Die Auswertungen wurden als zweidimensionale Dotplots dargestellt, bei denen die Fluoreszenzintensität des FITCkonjugierten Anti-Caspase-3-Antikörpers auf der Y-Achse und die Granularität der Zellen auf der X-Achse aufgetragen wurde.

2.21 Untersuchungen von Oberflächenproteinen

Für die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen wurden die bestrahlten und unbestrahlten Zellen mit den folgenden FITC- oder PE-konjugierten Antikörpern markiert: CD1c FITC, CD47 PE, CD79B PE und CD164 PE.

Für die Immunophänotypisierung wurden $2x10^5$ mit PBS gewaschene Zellen in einem Volumen von 100 µl PBS-Puffer in beschriftete FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden den Zellen jeweils 10 µl der FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörper zugesetzt und 30 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen, 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert und das nicht sichtbare Zellpellet in 250 µl einer 0,5%-igen Formalin-Lösung in *FACS-Flow* fixiert. Für jede Messung wurden maximal 10.000 Zellen gezählt und ausgewertet.

Um die Spezifität und Stärke der Antikörperbindungen zu erfassen und damit Informationen über die Existenz bzw. die Expressionsstärke der entsprechenden Oberflächenantigene zu erhalten, wurden die Signale der Fluoreszenzintensitäten mit denen von unspezifischen Isotyp-Antikörpern verglichen. Dabei wurden die Fluoreszenzintensitäten der Fluorochrom-konjugierten Antikörper auf der Y-Achse und die Granularität der Zellen auf der X-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse wurden als das Verhältnis der positiv markierten Zellen zu allen Zellen in Prozent oder als mittlere Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescence intensity; MFI*) ausgedrückt. Graphisch wurden die Ergebnisse ebenfalls als zweidimensionale Dotplots dargestellt.

2.22 Zellzyklusanalysen

Die Zellzyklusanalysen bestrahlten und unbestrahlten Zellen von wurden durchflusszytometrisch unter Verwendung des Thymidinanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich für einzelne Zellen der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus nachweisen. Nach Zugabe zu den Zellen wird dabei das BrdU in Konkurrenz zu dem intrazellulär synthetisierten Thymin während der Replikation in die neusynthetisierte DNA von denjenigen Zellen eingebaut, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Das inkorporierte BrdU kann anschließend mit entsprechenden BrdU-spezifischen Antikörpern (Anti-BrdU-FITC) im Durchflusszytometer detektiert werden. In einer Gegenfärbung wurden die Zellen mit dem Farbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) behandelt, der in der Lage ist, färben. Mit dieser Kombination erlaubt eine Zweifarbenkomplette DNA zu durchflusszytometrische Analyse die Bestimmung der Anzahl sowie die Charakterisierung von Zellen hinsichtlich der einzelnen Zellzyklusphasen, die durch die Intensitäten des Farbstoffs 7-AAD definiert sind. Die Zellzyklusanalysen wurden gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

Jeweils 1x10⁶ bestrahlte Zellen sowie die entsprechenden Kontrollen wurden mit 10 µl der BrdU-Lösung bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen jeweils in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendiert und 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Perm/Waschpuffer wurden die Zellen 5 Minuten pelletiert, das Zellpellet in 100 µl Cytoperm Plus-Puffer aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die Zellen erneut gewaschen und pelletiert wurden. Nach einer 5 minütigen Fixierung mit 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer bei Raumtemperatur wurden die Zellen anschließend erneut der oben genannten Waschprozedur unterzogen. Um das inkorporierte BrdU besser detektieren zu können, wurden die Zellen in 100 µl DNase-Lösung eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor diese nach obiger Prozedur gewaschen wurden. Die Zellen wurden in 50 µl Anti-BrdU-Antikörperlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wonach sich erneut ein Waschschritt anschloss. Für die Färbung der kompletten DNA wurde das Zellpellet schließlich in 20 µl 7-AAD-Lösung resuspendiert und mit 1 ml Färbepuffer versetzt. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden maximal 10.000 Ereignisse aquiriert. Die Auswertungen wurden **Dotplots** dargestellt, die als bei denen *BrdU*-FITC-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse und die 7-AAD-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse aufgetragen wurde.

2.23 "Colony-forming Assay"

Zur Untersuchung des klonogenen Wachstums der bestrahlten Zellen wurde der "Colonyforming Assay" durchgeführt. In einem semisoliden Medium sind die untersuchten K422-Zellen in der Lage, mikroskopisch sichtbare Kolonien von Tochterzellen zu bilden. Die Zellen werden dazu in einem Methylzellulosemedium inkubiert. Während der Proliferation wird durch die Viskosität des Mediums eine Wanderung der Zellen größtenteils verhindert. Durch die Proliferation entstehen somit aus den Tochterzellen Kolonien, die unter einem Mikroskop ausgezählt werden können.

In einem Doppelansatz wurden 2,7 ml Methylzellulosemedium mit 300 μ l einer Zellsuspension von 1x10⁴ Zellen gemischt. Von dieser Suspension wurden jeweils 1,5 ml in eine kleine Gewebekulturschale von 35 mm Durchmesser gegeben. Um ein Austrocknen des Methylzellulosemediums zu vermeiden, wurden die beiden Schalen mit einer mit 3 ml Wasser gefüllten dritten Schale in eine große Gewebekulturschale (Durchmesser 94 mm) gestellt. Nach einer Inkubation von 14 Tagen unter normalen Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂) wurden die Kolonien unter dem Mikroskop betrachtet und ausgezählt.

2.24 Isolation von Nukleinsäuren

2.24.1 Isolation von DNA

Die Isolation genomischer DNA aus bestrahlten sowie unbehandelten K422-Zellen und primären CD19+ Zellen erfolgte mit dem QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen. $1x10^{6}$ Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, für 5 Minuten bei 2400 rpm abzentrifugiert und anschließend in einem Volumen von 200 µl PBS aufgenommen. Die Isolation sowie der vorgeschaltete essentielle proteolytische Abbau der Zellproteine mit Proteinase K wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in einem Volumen von 70 µl eluiert, ihre Qualität gelelektrophoretisch überprüft (vgl. 2.26) und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 2.25).

2.24.2 Isolation von RNA

Für die RNA-Extraktion wurden zunächst 1×10^6 bestrahlte und unbestrahlte K422- und primäre CD19+ Zellen in ein Reaktionsgefäß gegeben und 5 Minuten bei 2400 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einem Volumen von 1000 µl PBS resuspendiert und erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Nach erneutem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen sofort in 350 µl RLT-Puffer (enthält Guanidin-Isothiozyanat (GITC) und 1% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Proben konnten bis zur Präparation der RNA bei –20°C gelagert werden. Zur Isolierung der Total-RNA wurde das RNeasy[®] Micro Kit der Firma Qiagen, in Kombination mit dem RNase freien DNase-Set (Qiagen) verwendet. Die auf Eis aufgetauten RLT-Zell-Lysate wurden zunächst in eine QIAshredder-Säule gegeben und 2 Minuten bei 13.000 rpm homogenisiert. Durch diesen Prozess wurden hochmolekulare Substanzen wie DNA in dem Säulenfilter fragmentiert und die Viskosität der Lösung herabgesetzt. Die weitere Extraktion mit einem Zwischenschritt des DNA-Abbaus durch DNase wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in einem Volumen von 14 µl eluiert und anschließend einer Qualitätskontrolle mit Hilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzers* (vgl. 2.25.1) unterzogen.

2.25 Quantitäts und Qualitätskontrolle von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte für genomische DNA durch Messung der optischen Dichte von 1 μ l Nukleinsäurelösung bei 260 nm und 280 nm im NanoDrop^RND-1000. Die Extinktion von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist nach Bestimmung des Quotienten OD260/OD280 ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf. Die Intaktheit von genomischer DNA wurde durch Auftragen von 1 μ g unverdauter DNA auf ein 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch überprüft. Die quantitative Charakterisierung von RNA erfolgte in derselben Weise wie die oben beschriebene DNA-Untersuchung, wobei eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml entspricht.

2.25.1 RNA-Qualitätskontrolle mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers

Die Grundvoraussetzung für die Detektion von geringen Genexpressionsveränderungen mit Micrarrays ist die Intaktheit der präparierten Total-RNA aus den RLT-Lysaten bzw. der erhaltenen *antisense* RNA nach Amplifikation und Biotinylierung. Die RNA wurde daher nach den Präparationen auf Degradation hin, mit Hilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzers* am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ), überprüft. In Kombination mit den entsprechenden Analyse-Chips ist dieses System in der Lage, RNA-Präparationen einer Konzentration zwischen 200 und 5000 pg/µl zu analysieren. Die RNA-Analyse wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Analysemethode basiert auf einer Kapillargelelektrophorese, die in den für die Untersuchung verwendeten Analyse-Chips stattfindet. Die zu analysierenden RNA-Proben migrieren in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und werden der Größe nach aufgetrennt. Während der Wanderung interkaliert der in der Gelmatrix enthaltene Fluoreszenzfarbstoff in die Nukleinsäuren und die Fragmente können mit Hilfe von Laserinduzierter Fluoreszenz registriert und mit Hilfe der Agilent Bioanalyzer Software ausgewertet werden. Das Ergebnis der etwa 40 Minuten dauernden Analyse wird schließlich in Form eines Elektropherogramms dargestellt, bei dem die gemessene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. Total-RNA guter Qualität zeichnet sich hierbei durch zwei scharf abgegrenzte Banden der ribosomalen 18S - und 28S RNA aus, die im Elektropherogramm als zwei scharfe Peaks auf der sonst flachen Basislinie zu erkennen sind. Bei degradierter RNA fehlt ein Peak, während der Verbleibende meist durch eine Verschiebung zu kürzeren Migrationszeiten sowie durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität gekennzeichnet ist. Abbildung 2.5. zeigt isolierte Total-RNA und amplifizierte aRNA von guter und schlechterer Qualität.



Abbildung 2.5. A: Die Hauptbestandteile der isolierten Total-RNA sind die ribosomalen RNAs (18S- und 28S rRNA), die als diskrete, deutlich voneinander abgrenzbare Peaks zu erkennen und vom Hintergrundsignal klar unterscheidbar sind. Die 28S rRNA liefert eine etwa doppelt so hohe Signalintensität wie die 18S rRNA. B: Bei der amplifizierten aRNA handelt es sich um eine homogene Verteilung unterschiedlich langer RNA-Fragmente. Die Größe variiert und liegt im Mittel bei etwa 1500 Basen. C: Degradierte Total-RNA weist nur einen Peak auf, der eine leichte Verschiebung zu kürzeren Migrationszeiten hin aufweist. D: Qualitativ schlechtere Proben von amplifizierter aRNA zeigen eine niedrigere Fluoreszenzintensität, verbunden mit einer Verschiebung des Intensitätsmaximums hin zu kleineren Nukleotidlängen.

2.26 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben sowie ein geeigneter Längenstandard wurden mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei 120 V aufgetrennt. Die Prozentigkeit des Gels variierte von 0,8% - 2,0% und wurde dabei in Abhängigkeit von der Fragmentgröße gewählt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung, wobei das Gel etwa 15 Minuten in einer Lösung aus 10 µl Ethidiumbromid / 100 ml destilliertem Wasser gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von λ =302 nm betrachtet und fotografiert wurde.

2.27 Messung der Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium

Etwaige Veränderungen der Zytokinsekretion von bestrahlten Zellen wurden anhand von Konzentrationsunterschieden dieser Signalstoffe im Zellkulturmedium unter Verwendung von fertigen ELISA-Assays untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende fünf Zytokine analysiert: CCL3, CCL4, IL8, TNF und TNFSF10. Für die Untersuchung wurden die in

einem Volumen von 2 ml bestrahlten Zellen zunächst in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt und konnte dauerhaft bei -80°C gelagert werden. Die Assays wurden den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet.

Die Assays funktionieren auf Basis eines *four-member-sandwich* mit zwei Antikörpern, dem zu detektierenden Target für die Generierung einer Standardreihe und einer Streptavidin-Peroxidase. In eine mit einem targetspezifischen primären Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte wurden, abhängig von dem zu detektierenden Zytokin, zwischen 50 und 100 μ l des Mediums für die Analysen eingesetzt. In weiteren Schritten erfolgte die Zugabe eines biotinylierten targetspezifischen Sekundärantikörpers, der die in einem weiteren Schritt zugesetzte Streptavidin-Peroxidase bindet. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung der nachfolgend zugeführten Substratlösung und induziert damit einen Farbumschlag der Lösung. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des Targets und wurde in einem ELISA-Reader (FLUOstar* Optima, BMG Technologies) bei einer Absorption von λ =450 nm gemessen. Die Konzentration der untersuchten Zytokine wurde über eine den jeweiligen Assays entsprechende Standardreihe berechnet.

2.28 Western Blot Analysen

2.28.1 Herstellung von Zell-Lysaten für die Proteinanalyse

Zur Proteinextraktion wurden 100 μ l Proteinlysepuffer auf ein mit PBS gewaschenes Pellet von 1x10⁶ Zellen gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Um die noch vorhandene DNA zu fragmentieren und damit die Viskosität des Lysats zu minimieren, wurde es 3-4-mal mit Hilfe einer Spritze durch eine 27G Nadel gedrückt.

2.28.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte in einer 96-Well ELISA-Platte mit Hilfe von Bicinchoninsäure [Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988] unter Verwendung des BCA Protein Assay Reagent Kits. Für die Durchführung der Proteinbestimmungen wurden 10 μ l des Lysats mit je 200 μ l der im Kit enthaltenen Lösung B (4% Kupfersulfat) und Lösung A (Bicinchonin-Lösung) (Mischungsverhältnis von Lösung B und A 1:50) vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen. Eine BSA- Verdünnungsreihe diente als Proteinstandard und der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde über die Standardreihe berechnet.

2.28.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer Methode von Laemmli mittels einer Mini Protean IITM -Kammer mit einer Laufstrecke von 7,2 cm. Es wurden jeweils 20 µg/30 µl Zell-Lysat mit 10 µl Lämmlipuffer vermischt, 15 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung ins Eisbad gestellt. Zur Erstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurde nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels und Reinigung des zuvor mit Isobutanol überschichteten Gelrandes, das Sammelgel gegossen. Nach einer erneuten 30-minütigen Polymerisation wurden die Proben sowie 5 µl des Protein-Längenstandards (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas) in die mit 1x Laufpuffer ausgespülten Taschen pipettiert und eine Proteintrennung in 1x Laufpuffer bei 80 V für ca. 2,5 Stunden durchgeführt.

2.28.4 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel zusammen mit den Blotting-Papieren und der vorher mit Methanol angefeuchteten Membran für 15 Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Auf 2 Lagen feuchtem Blotting-Papier wurde die Membran gelegt, danach folgte das Trenngel und zuletzt wurden erneut 2 Lagen Blotting-Papier gelegt. Der fertige Sandwich wurde mit der Gelseite zur Kathode gerichtet in die Blotkammer gelegt. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei 15 V. Der Proteinlängenstandard wurde dabei mit auf die Membran geblottet und war auf dem Blot als blaue Leiter mit einer roten Bande in einem Größenbereich von 72 KDa gut sichtbar. Die Membran konnte anschließend feucht bei 4°C, oder getrocknet bei -20°C gelagert werden. Folgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau des Blotsystems:



Abbildung 2.6. Schematischer Aufbau des Western Blots. Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wandern durch die angelegte elektrische Spannung von der Kathode zur Anode und werden dadurch auf die Membran transferiert.

2.28.5 Immunodetektion zum Nachweis von P53

Vor der Detektion wurde die Membran zunächst eine Minute mit Isopropanol inkubiert, danach kurz mit Methanol benetzt, und schließlich 10 Minuten in Blotpuffer rehydratisiert. Die Membran wurde danach 10 Minuten mit TBS gewaschen und anschließend eine Stunde mit Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran 3 mal 20 Minuten mit TBS gewaschen und anschließend 3 Stunden mit dem Primärantikörper (1:500 in TBS verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde weitere 3 Male mit TBS gewaschen und 1,5 Stunden mit dem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper (1:800 in TBS verdünnt) inkubiert. Nach abschließender dreifacher Waschung mit TBS wurde 1 ml ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 gemischt und zur Proteindetektion exakt 1 Minute lang auf die abgetropfte Membran aufgebracht. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei dünne Klarsichtfolien gelegt und in einer Filmkassette untergebracht. Die Detektion erfolgte durch Auflegen geeigneter Filme (HyperfilmTM, (ECL), Amersham Biosciences) bei Expositionszeiten zwischen 5 und 20 Sekunden. Die Entwicklung der Filme wurde mit einer automatischen Entwicklermaschine (Curix 60, Agfa) durchgeführt.

2.28.6 Immunodetektion zum Nachweis von RB1 und Cyclin E2

Die noch feuchte Membran aus dem Western Blot wurde zunächst eine Stunde in Blockpuffer Milchpulver in PBS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des (3%) Primärantikörpers (1:1500 verdünnt in 0,5% Blockpuffer) unter Schütteln über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde 2 mal 15 Minuten mit Wasser gewaschen, bevor sie mit dem Peroxidasegekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper (1:5000 in 0,5% Blockpuffer verdünnt) inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran 2x 15 Minuten mit Wasser, 1 mal 5 Minuten mit PBS/0,05% Tween 20 und letztmalig 2 Stunden mit Wasser gewaschen, wobei etwa jede halbe Stunde das Wasser gewechselt wurde. Die Proteindetektion erfolgte in derselben Weise variierten wie in Kapitel 2.28.5 beschrieben, jedoch hier die Expositionszeiten des Films zwischen 2 und 10 Minuten.

3 ERGEBNISSE

3.1 Transkriptionelle Veränderungen durch Alphastrahlung

3.1.1 Differentiell regulierte Gene nach Alpha-Bestrahlung von malignen K422 Zellen und normalen primären CD19+ B-Zellen

Um einen Einblick in die Wirkung von Alphastrahlung auf maligne und normale B-Zellen zu erhalten, wurden mit Hilfe der Microarray-Technologie Genexpressionsprofile der B-Zell-Lymphomzell-Linie Karpas 422 (K422) und von primären CD19+ B-Zellen erstellt. Hierdurch sollte ermittelt werden, wie viele und welche Gene infolge der differentiell reguliert wurden. die Erstellung Alphastrahlungswirkung Für der Genexpressionsprofile wurden die K422 Zellen mit Aktivitäten von 100 μ Ci (3,7x10⁶ Bq) und 200 μ Ci (7,4x10⁶ Bq) für Expositionszeiten von jeweils 46 Minuten (entspricht einer Halbwertszeit) und 24 Stunden mit dem Radioimmunkonjugat Bismut-213-CD20 bestrahlt. Die Bestrahlung der primären CD19+ Zellen mit beiden Aktivitäten beschränkte sich hingegen nur auf eine Expositionszeit von 46 Minuten, da eine 24-stündige Strahleneinwirkung Zellen zum Absterben der führte. Zusätzlich wurden Genexpressionsprofile beider Zelltypen erstellt, die ausschließlich dem unkonjugierten ("kalten") CD20-Antikörper (AK) ausgesetzt waren, um hier die Wirkung des Antikörpers alleine zu erfassen. Die Expositionszeiten entsprachen denen des Bismut-213-CD20-Konjugates. Insgesamt wurden 35 Proben von je 1x10⁶ K422 Zellen und 25 Proben von ebenfalls je 1x10⁶ CD19+ Zellen bestrahlt bzw. dem unkonjugierten CD20-Antikörper ausgesetzt. In Tabelle 3.1. sind die verwendeten Proben und Bedingungen, auf deren Basis die Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden, aufgelistet.

K422 Zellen			Anzahl der Proben
Probe	Aktivität	Expositionszeit	
unbehandelte Kontrolle	-	-	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
²¹³ Bi-CD20-Konjugat	100 µCi	46 Minuten	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
²¹³ Bi-CD20-Konjugat	100 µCi	24 Stunden	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
²¹³ Bi-CD20-Konjugat	200 µCi	46 Minuten	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
²¹³ Bi-CD20-Konjugat	200 µCi	24 Stunden	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
unkonjugierter CD20-AK	-	46 Minuten	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
unkonjugierter CD20-AK	-	24 Stunden	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
<u>Primä</u>	re CD19+ Zellen	•	Anzahl der Proben
Probe	Aktivität	Expositionszeit	
unbehandelte Kontrolle	-	-	8 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
²¹³ Bi-CD20-Konjugat	100 µCi	46 Minuten	7 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
²¹³ Bi-CD20-Konjugat	200 µCi	46 Minuten	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen
unkonjugierter CD20-AK	-	46 Minuten	5 Proben à 1x10 ⁶ Zellen

Tabelle 3.1. Überblick über die für die Erstellung der Genexpressionsanalysen verwendeten experimentellen Ansätze mit Angabe der Behandlungsart, der verwendeten Aktivität und der Expositionszeit. Die RNA jeder Einzelprobe von 1×10^6 K422 und CD19+ Zellen wurde auf je einem Microarray analysiert.

Um aus der großen Datenmenge der 8.793 erfassten Gene diejenigen zu selektieren, die Qualitäts- und Relevanzkriterien standhalten, wurden bestimmten anhand einer Zweiklassenanalyse, bei der für die jeweilige Aktivität (100 bzw. 200 μ Ci) unbehandelte Kontrollen mit den jeweiligen bestrahlten (46 Minuten bzw. 24 Stunden) Proben verglichen wurden, folgende Auswahlbedingungen festgelegt: Als signifikant differentiell hoch- oder herunterregulierte Gene wurden solche angenommen, die eine Expressionsänderung (fold change) von >1,4 oder <0,7 und einen q-Wert von <0,05 (<5%) zeigten. Die Analyse ergab bei einer Bestrahlung von K422 Zellen mit 100 µCi 469 signifikant differentiell regulierte Gene und 517 deregulierte Gene bei einer Aktivität von 200 µCi. Die CD19+ Zellen wurden ebenfalls mit einer Zweiklassenanalyse ausgewertet. Beim Vergleich der bestrahlten Zellen nach 46 Minuten mit den unbestrahlten Kontrollen waren nur insgesamt 69 Gene differentiell reguliert. Erstaunlicherweise fand sich, basierend auf den Auswahlkriterien, unter den 8.793 auf dem Array annotierten Genen keines, welches im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nach Behandlung mit dem unkonjugierten ("kalten") CD20-Antikörper signifikant differentiell reguliert war. Aus diesem Grund wurde von weiteren Untersuchungen dieser mit dem CD20-Antikörper behandelten Zellen abgesehen.

3.1.2 Cluster-Analyse

Mit Hilfe der Cluster-Analyse [Eisen *et al.*, 1998] können differentiell regulierte Gene und die verwendeten Proben entsprechend ihres Expressionsmusters in Gruppen eingeteilt werden. Dadurch entstehen hierarchische Cluster von Genen, die in den einzelnen Proben ähnlich exprimiert werden, außerdem erfolgt eine Gruppierung der verwendeten Proben anhand der Ähnlichkeit ihres Genexpressionsprofils.

Da die verwendeten K422-Proben aus einer Zell-Linie stammen und somit die unterschiedlichen Kontroll- und Bestrahlungsbedingungen mit demselben Zelltyp durchgeführt wurden, war zu erwarten, dass sich die unter gleichen Bedingungen behandelten Proben sehr ähnlich sind und sich somit von den unterschiedlich behandelten Proben stark voneinander abgrenzen. Bei den primären CD19+ B-Zellen war dies in dieser Stringenz nicht unbedingt zu erwarten, da diese Zellen von insgesamt vier unterschiedlichen Spendern gewonnen wurden und damit naturgemäß eine gewisse Spender-abhängige Heterogenität vorlag.

Die Ähnlichkeiten unter den Proben werden in einem Dendrogramm abgelesen, das sich über der Clusteranalyse befindet. Abbildung 3.1.und Abbildung 3.2. zeigen Clusteranalysen von K422 Zellen mit insgesamt (**A**) 469 differentiell regulierten Genen (bei einer Bestrahlung von 100 μ Ci für 46 Minuten und 24 Stunden) bzw. (**B**) mit 517 deregulierten Genen (bei einer Bestrahlung von 200 μ Ci für 46 Minuten und 24 Stunden) sowie (**C**) für die primären CD19+ B-Zellen, die beiden Aktivitäten nur eine Halbwertszeit des ²¹³Bi-CD20-Konjugates ausgesetzt waren, im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen.


Abbildung 3.1. Hierachische Clusteranalysen der Bismut-213-CD20-Rituximab bestrahlten K422 Zellen. Die verwendeten Proben sind hierbei horizontal, die deregulierten Gene vertikal sortiert. Die Clusteranalysen wurden durchgeführt **A**: auf der Basis von 469 signifikant differentiell regulierten Genen für eine Bestrahlung von 100 μ Ci, **B**: basierend auf 517 deregulierten Genen von Zellen, die mit einer Aktivität von 200 μ Ci für beide Expositionszeiten behandelt wurden. Rot = höherer Expressionswert, grün = niedrigerer Expressionswert als der Mittelwert des jeweils betrachteten Gens. K = unbehandelte Kontrollprobe; 46 = Expositionszeit von 46 Minuten; 24 = Expositionszeit von 24 Stunden; Die Indizes stellen die Nummerierungen der einzelnen Proben dar.



Abbildung 3.2. Clusteranalyse wie in Abbildung 3.1., jedoch auf Basis von insgesamt 69 deregulierten Genen in bestrahlten (100 μ Ci und 200 μ Ci, 46 Minuten) primären CD19+ Zellen. Die Indizes stellen in diesem Falle die jeweiligen Spender (Spender 1-4) dar. Die Farbmarkierungen entsprechen denen von Abbildung 3.1.

Die Clusteranalysen der K422 Zellen (Abbildung 3.1. A und B) zeigen eine eindeutige Abgrenzung derjenigen Proben, die dem Alphastrahler 24 Stunden ausgesetzt waren von den Kontroll- und den 46 Minuten bestrahlten Proben. Dieses Ergebnis gilt für beide verwendeten Aktivitäten. Die Analysen zeigen, dass der größte Teil der Gene der 24 Stunden bestrahlten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben, aber auch im Vergleich zu den nur 46 Minuten exponierten Proben, hochreguliert ist.

Die 46 Minuten exponierten Proben können dagegen nicht klar von den Kontrollproben abgegrenzt werden und es zeigen sich nur geringe Unterschiede im Genexpressionsmuster.

Im Gegensatz dazu ist eine eindeutige Abgrenzung zwischen Kontroll- und bestrahlten Proben bei den primären CD19+ Zellen bereits nach 46 Minuten Bestrahlung möglich (Abbildung 3.2. C). Wie bei der Zell-Linie zeigt sich auch in diesem Fall der Großteil der Gene hochreguliert. Die transkriptionellen Veränderungen sind unabhängig von der verwendeten Aktivität, was dadurch ersichtlich wird, dass die unterschiedlich bestrahlten Proben innerhalb ihres Clusters verteilt vorliegen. Interessanterweise verhalten sich die Proben der Spender 1 und 2 etwas anders als diejenigen von Spender 3 und 4, so dass das Ausmaß transkriptioneller Veränderungen durch Alphastrahlung individuelle Unterschiede aufzuweisen scheint.

3.1.3 Evaluation von zeit- und aktivitätsabhängiger Genexpression von K422 und CD19+ Zellen

Frühe transkriptionelle Veränderungen bereits nach einer Strahlungsdauer von 46 Minuten sind nur bei einer geringen Anzahl an Genen von bestrahlten K422 Zellen nachweisbar. Der überwiegende Teil der Gene zeigt sich erst nach 24 Stunden dereguliert, von denen wiederum der größte Teil hochreguliert ist. Anhand ihrer zeitlichen Verläufe wurden die differentiell regulierten Gene in insgesamt 6 unterschiedliche Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe einen bestimmten zeitlichen Verlauf der Genexpression entsprechend der Expositionszeiten von 46 Minuten und 24 Stunden darstellt. Abbildung 3.3. zeigt die 6 Gruppen zeitlicher Genexpressionsveränderungen der K422 Zellen mit der entsprechenden Anzahl der dazugehörigen Gene für beide Aktivitäten. Exemplarisch und aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in jeder Darstellung der Verlauf von maximal 5 Genen gezeigt. Da die primären CD19+ Zellen mit nur einer Expositionszeit von 46 Minuten bestrahlt

wurden, ist ein entsprechender zeitlicher Verlauf der Genexpression nicht dargestellt.



Abbildung 3.3. Verläufe der zeitlichen Änderungen der Genexpression von 469 Genen nach Zuführung einer Aktivität von 100 μ Ci bzw. von 517 Genen nach Bestrahlung mit einer Aktivität von 200 μ Ci, betrachtet zu den Zeitpunkten t_{46 Minuten} und t_{24 Stunden} bei den untersuchten K422 Zellen. Die Änderung der Genexpression (*fold change*) am Punkt t₀ wurde immer als 1 (unverändert) definiert. Dieser Zeitpunkt bezeichnet den Beginn der Bestrahlung. Zusätzlich ist in jeder Darstellung die entsprechende Anzahl der Gene für beide Aktivitäten (100 μ Ci / 200 μ Ci) angegeben. Gezeigt sind exemplarisch bis zu 5 Gene in jeder Gruppe.

Abbildung 3.3. zeigt die beobachteten zeitlichen Änderungen der Genexpression der K422 Zellen. Verglichen mit der Gesamtzahl deregulierter Gene konnte eine differentielle Regulation bereits nach einer Expositionszeit von 46 Minuten für beide verwendeten Aktivitäten nur bei sehr wenigen Genen nachgewiesen werden (Abb. 3.3. A, B, C, F). Der weitaus größte Anteil der gefundenen Gene zeigt sich erst nach 24 Stunden dereguliert. Mit 417 Genen für 100 μ Ci und 420 Genen für 200 μ Ci ist nach einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden die größte Anzahl davon signifikant hochreguliert (Abb. 3.3. D), was damit offensichtlich die Hauptwirkung der Alphastrahlung markiert und mit den Ergebnissen der Clusteranalysen (Abbildung 3.1.) in Einklang steht.

Eine detaillierte Aufschlüsselung der exakten Anzahl an deregulierte Genen bei allen betrachteten Aktivitäten und Expositionszeiten wird in den Venn-Diagrammen, die in Abbildung 3.4. dargestellt sind, wiedergegeben.



Abbildung 3.4. Dargestellt sind zwei Venn-Diagramme, **A:** für die bestrahlten K422 Zellen und **B:** für K422und CD19+ Zellen mit den entsprechend dazugehörigen Anzahlen an deregulierten Genen. Zusätzlich sind "aktivitätsübergreifende" sowie "expositionszeitübergreifende" Schnittmengen aufgeführt. Eine Farbe markiert jeweils die beiden Bedingungen, die miteinander verglichen werden (z.B. grün: 100 µCi und 200 µCi für jeweils 46 Minuten Expositionszeit).

Die Daten der K422 Zellen belegen eine sehr starke Zeitabhängigkeit, die sich in den Einzelbedingungen zeigt, sich aber auch in den Schnittmengen innerhalb der 46 Minuten und der 24 Stunden bestrahlten Proben widerspiegelt (27 vs. 325 deregulierte Gene; Abb. 3.4.A) und sind konsistent mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.3.D.

Obwohl in den K422 Zellen und in den primären CD19+ Zellen nach 46 Minuten Expositionszeit eine annähernd ähnliche Anzahl an deregulierten Genen nachzuweisen ist und damit eine zelltypunabhängige strahlungsinduzierte differentielle Regulation vermutet werden kann, werden offensichtlich unterschiedliche Gene transkriptionell verändert, was die relativ niedrige Anzahl an gemeinsam deregulierten Genen (9 bzw. 25 Gene nach 100 μ Ci bzw. 200 μ Ci) verdeutlicht.

3.1.4 Funktionelle Gruppierungen von differentiell regulierten Genen

Alle differentiell regulierten Gene wurden anschließend anhand ihrer Funktionen, die aus der Literatur bzw. durch Informationen des "*Affymetrix NetaffxTM Analysis Centers*" [https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx] entnommen werden konnten, in sechzehn (für K422 Zellen) bzw. zwölf Kategorien (für die primären CD19+ Zellen) eingeteilt und sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst (Tabelle 3.2.- 3.11.).

Tabelle 3.2. Deregulierte Gene von bestrahlten K422 Zellen, eingeteilt in 16 Kategorien anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktionen. Für jede Kategorie ist die entsprechende Anzahl hoch- (rot markiert) oder herunterregulierter Gene (grün markiert) für jede Bestrahlungsbedingung aufgeführt. Die Summen entsprechen den Zahlen in dem Venn-Diagramm (vgl. Abbildung 3.4.)

K422 Zellen	Anz	zahl differentie	ll regulierter C	Bene
Kategorie	100 μCi, 46 Minuten	100 μCi, 24 Stunden	200 μCi, 24 Stunden	
Apoptose-assoziiert	1↑	8↑	2↑	4↑ 1↓
DNA-Reparatur		15↑		15↑
DNA-Replikation		21↑		18↑
Enzyme	4↑	70↑ 3↓	2↑	65↑ 11↓
Hitzeschock und Stressantwort	3↑	3↑ 1↓	5↑	7↑ 2↓
Immun- und Interferonantwort		27↑	1↑	31↑ 1↓
Membran-assoziiert	5↑	47↑ 2↓	4↑	47 7↓
Proteinsynthese	1↑		2↑	1↑ 6↓
Proteintransport	1↑	15↑		8↑
Proteolytischer Abbau		21↑		21↑
RNA-Prozessierung	2↑	14↑	2↑	9↑ 2↓
Transkriptionsregulation	8↑	37↑ 1↓	11↑	39↑ 3↓
Zelladhäsion		5↑		4↑ 1↓
Zellzyklus	4↑	33↑ 2↓	5↑	31↑ 4↓
Gene anderer Funktion	11↑	78↑ 3↓	11↑ 1↓	98↑ 12↓
Gene unbekannter Funktion	3↑	46↑	4↑	36↑ 1↓
Summe	42	451	50	485

Primäre CD19+ Zellen	Anzahl differentiell regulierter Gene				
Kategorie	100 μCi, 46 Minuten	200 μCi, 46 Minuten			
Apoptose-assoziiert	3↑	3↑			
DNA-Reparatur		1↑			
Enzyme	1↑	2↑			
Hitzeschock und Stressantwort	3↑	5↑			
Immun- und Interferonantwort	9↑	9↑			
Membran-assoziiert	2↑	2↑ 1↓			
Proteinsynthese	1↑	2↑			
RNA-Katabolismus	1↑	1↑			
Transkriptionsregulation	10↑	15↑ 1↓			
Zellzyklus	5↑ 1↓	9↑ 1↓			
Gene anderer Funktion	1↑	6↑ 3↓			
Gene unbekannter Funktion	4↑ 1↓	5↑ 1↓			
Summe	42	67			

Tabelle 3.3. Wie Tabelle 3.2., jedoch deregulierte Gene in primären selektierten CD19+ B-Zellen. Die Gene sind, basierend auf ihren Funktionen, hier nur in 12 Kategorien eingeteilt.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass eine eindeutige Eingruppierung vieler Gene basierend auf ihren Funktionen nicht immer gewährleistet ist. Entsprechend ihren Funktionen oder ihren Eigenschaften können viele Gene auch in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. So sind beispielsweise in der Kategorie DNA-Reparatur oder Immunantwort auch Gene enthalten, deren Proteine enzymatische Funktionen aufweisen (z.B. TREX1, OAS1) und demnach in die Kategorie Enzyme eingruppiert werden könnten, während das Gen des Membranproteins TLR7 und der Transkriptionsfaktor ISGF3 γ auch Funktionen in der Immunantwort wahrnehmen.

Die kompletten Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der K422 und der CD19+ Zellen sind in der GEO DataSets- Datenbank unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo] zu finden.

In den folgenden Abschnitten wird auf die wichtigsten dieser funktionellen Kategorien detaillierter eingegangen:

3.1.4.1 DNA Reparatur

Die Exposition von zellulärer DNA mit ionisierender Strahlung resultiert in unterschiedlichen Typen von DNA-Schäden, von denen DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) als die prinzipiellen Läsionen angesehen werden [Willers *et al.*, 2004]. Werden derartige Schäden nicht repariert, kann dies zu Mutationen führen, oder infolge von chromosomalen Aberrationen oder durch Induktion von Apoptose, zum Untergang der Zellen. Anhand der Genexpressionsanalysen konnten in den bestrahlten K422 Zellen einige differentiell hochregulierte Gene nachgewiesen werden, deren Produkte DNA-Reparaturproteine darstellen. Im Vergleich dazu fand sich in den bestrahlten CD19+ Zellen lediglich ein entsprechendes Gen (Tabelle 3.4.).

Tabelle 3.4. Deregulierte Gene der DNA-Reparatur in K422 Zellen und primären selektierten CD19+ Zellen. *Fold change*-Werte von differentiell hochregulierten Genen sind rot dargestellt. Schwarze *fold change*-Werte markieren Gene, die nicht differentiell reguliert sind und die *fold change*-Kriterien von >1,4 bzw. <0,7 nicht erfüllen. NHEJ = DNA-Reparatur durch *"Non homologous DNA end joining"*; HR = Reparatur durch *"homologe* Rekombination".

	K422 Zellen	fold chang	<i>ge</i> 100 μCi	fold chang	<i>ge</i> 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
BLM (bloom syndrome)	ATP-abhängige DNA Helikase-Aktivität	1,04	1,68	0,97	1,73
BRCA1 (breast cancer, early onset)	Regulation und Koordination der DNA- Reparatur	1,15	2,56	1,20	2,52
<i>FANCA</i> (Fanconi anemia, complementation group A)	Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen	1,09	1,57	1,03	1,72
FANCG (Fanconi anemia, complementation group G)	Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen	1,0	1,65	0,94	1,41
<i>FEN1</i> (flap structure- specific endonuclease 1)	Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen	1,1	1,71	0,99	1,57
<i>MLH1</i> (mutL homolog 1)	DNA-Mismatch-Reparatur	1,16	1,64	1,03	1,48
MRE11A (meiotic recombination 11)	Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen durch NHEJ			0,95	1,51
MSH2 (mutS homolog 2)	DNA-Mismatch-Reparatur	1,1	1,81	1,09	1,69
PIR51 (RAD51- interacting protein)	Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen	1,15	1,86	1,13	1,97
RAD51 (RecA homolog, E. coli)	Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen durch HR	1,0	1,78	0,95	1,58
I	Primäre CD19+ Zellen	fold chang	ge 100 µCi	fold chang	ge 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
TDG (Thymine DNA-glycosylase)	Basen-Exzisions-Reparatur	1,29		1,42	

Die Feststellung, dass nach Bestrahlung einige Gene, die für DNA-Reparaturproteine kodieren, signifikant hochreguliert sind, stellt angesichts der Tatsache, dass ionisierende Strahlung DNA-Schäden induziert, keine Überraschung dar und ist ein Ergebnis, das letztendlich zu erwarten war. Eine signifikante Hochregulation, meist von Genen, die mit der DNA-Doppelstrangreparatur zu tun haben, ist ausschließlich bei den nach 24 Stunden bestrahlten K422 Zellen nachzuweisen und nur in einem Fall bei den 46 Minuten bestrahlten CD19+ Zellen. Die *fold changes* zeigen interessanterweise relativ niedrige Werte und nehmen nur bei BRCA1 einen Wert von über 2 an. Ob letztendlich eine DNA-Reparatur stattfindet, lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten, jedoch weisen sie darauf hin, dass DNA-Schäden zumindest erkannt werden.

3.1.4.2 Veränderungen im Zellzyklus und in der Proliferation

Das Wachstum und die Proliferation einer Zelle werden durch den Zellzyklus, bestehend aus der G1-, S-, G2- und der M-Phase, sehr präzise kontrolliert. Sich nicht teilende Zellen befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus, die die Ruhephase der G1-Phase darstellt. Der Eintritt in jede neue Phase erfolgt durch externe Signale und wird streng durch zyklisch auftretende Proteine, den Cyclinen, und durch Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases; CDKs*) reguliert. Komplexe aus spezifischen CDKs und Cyclinen phosphorylieren entsprechend der jeweiligen Zellzyklusphase Substratproteine und regulieren damit die Transition durch die einzelnen "Checkpoints" des Zellzyklus. Die Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen erfolgt über Inhibitorproteine, (*cyclin dependent kinase inhibitors; CKIs*), wie P21^{KIP1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P16^{INK4a} und P15^{INK4b}. In der folgenden Tabelle 3.5. sind die in den Genexpressionsanalysen gefundenen, zumeist differentiell hochregulierten Gene zusammengefasst.

Tabelle 3.	5. Zus	samm	enfassung diff	erentie	ll regulierter	Gene	, dere	en Produ	ıkte	in der R	egulation	des Zellz	yklus
involviert	sind.	Rot:	hochreguliert,	grün:	herunterreg	uliert.	Bei	Genen,	die	die fold	change-	Kriterien	nicht
erfüllen, si	nd die	fold	change-Werte	schwai	z geschriebe	n.							

	K422 Zellen	fold chang	ge 100 µCi	fold chang	<i>ge</i> 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
ATR (ataxia telangiectasia)	Zellzyklus-Checkpoint, Proteinkinase- Aktivität			1,16	1,55
CCNA2 (Cyclin A2)	Aktivierung von CDK2 und CDC2 in der S-Phase des Zellzyklus	1,16	1,87	1,05	1,65
CCND3 (Cyclin D3)	Aktivierung von CDK4 und CDK6 in der G1-Phase des Zellzyklus	1,1	1,87	0,96	1,79
CCNE2 (Cyclin E2)	Aktivierung von CDK2; Transition von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus	1,37	2,71	1,3	2,68

K4	122 Zellen (Fortsetzung)	fold chang	ge 100 µCi	fold chang	<i>ge</i> 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
CDC2 (cell division cycle 2)	Histon H1-Phosphorylierung; Übergang in die M-Phase des Zellzyklus	1,1	1,48		
CDC20 (cell division cycle 20)	Bestandteil des " <i>Anaphase-promoting complex</i> ", Progression von der M- in die G1-Phase des Zellzyklus	1,04	0,48	0,85	0,46
CDC25A (cell division cycle 25A)	Dephosphorylierung und Aktivierung des Cyclin E-CDK2-Komplexes in der G1- Phase	1,23	1,85	1,11	1,73
CDC6 (cell division cycle 6)	Bestandteil des sog. <i>"licensing factor"</i> in der S-Phase	1,22	2,22	1,15	2,14
CDC7 (cell division cycle 7)	Phosphorylierung von MCM2 im Replikationskomplex der S-Phase	1,01	1,72	1,0	1,7
CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)	Phosphorylierung des DNA- Replikationskomplexes in der S-Phase	1,16	2,11	1,05	2,03
CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)	Phosphorylierung von RB1 in der G1- Phase des Zellzyklus	1,09	1,53		
PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	Hilfsprotein, das während der DNA Reparatur und -Replikation als "Ringklemme" (<i>"sliding clamp</i> ") fungiert	1,20	1,74	1,22	1,62
RB1 (retinoblastoma 1)	Zellzyklus-Checkpoint (G1)-Regulator; Tumorsuppressoraktivität	1,05	1,73	1,01	1,42
l	Primäre CD19+ Zellen	fold chang	ge 100 µCi	fold chang	<i>ge</i> 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
<i>CDKN1A</i> (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p21, Cip1)	Bindung und Inhibition von Cyclin-CDK- Komplexen	2,2		2,48	
<i>CDKN1B</i> (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; p27, Kip1)	Blockierung der G1-S-Transition im Zellzyklus	0,69		0,65	
GADD45A (growth arrest and DNA-damage- inducible, alpha)	Stimuliert DNA-Exzisions-Reparatur Blockiert den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus	1,73		1,93	
PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	Hilfsprotein, das während der DNA Reparatur und -Replikation als "Ringklemme" (<i>"sliding clamp</i> ") fungiert	1,45		1,49	

Differentiell exprimierte proliferationsassoziierte Gene sind in den K422 Zellen nur nach einer Bestrahlung von 24 Stunden nachzuweisen. Dabei handelt es sich interessanterweise zumeist um solche, deren Proteine eine essentielle Rolle in der Transition von der G1- in die Replikationsphase (S-Phase) des Zellzyklus spielen. Bei den CD19+ Zellen dagegen zeigen sich bereits nach 46 Minuten Bestrahlung differentiell hoch- und herabregulierte Gene. Mit den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) CDKN1A (P21^{KIP1}) und CDKN1B (P27^{KIP1}) sowie mit GADD45A sind dies Proteine, die einen (strahlungsinduzierten) Zellzyklusarrest in der G1-Phase induzieren können. Bei den bestrahlten K422 Zellen ist eine Deregulation der Gene solcher Inhibitorproteine hingegen nicht nachweisbar, was

möglicherweise auf eine gestörte Zellzykluskontrolle bei der Progression von der G1-Phase in die S-Phase hindeuten könnte.

Ein Anzeichen für Aktivitäten in der S-Phase der bestrahlten K422 Zellen stellt die Hochregulation von Genen dar, die mit der DNA-Replikation assoziiert sind. Mit MCM (minichromosome maintenance) sind dies DNA-Bindeproteine, die in einem hexameren Proteinkomplex bei der Umwandlung des Prä-Replikationskomplexes in den Replikationskomplex beteiligt sind. Sie stellen ferner mit CDC6, CDT1 und anderen Proteinen einen sog. "licensing-factor" dar, der eine Rolle bei der Bewegung an der Replikationsgabel spielt. Die Hochregulation von Genen von Polymerasen sowie der Primase, Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase und diversen Replikations-Hilfsfaktoren könnte die Vermutung von S-Phase-Aktivitäten erhärten. Die differentiell exprimierten Replikationsassoziierten Gene sind in der nachfolgenden Tabelle 3.6.aufgelistet.

	K422 Zellen	fold chang	ge 100 µCi	<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
MCM3 (minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae))		1,19	1,57	1,11	1,62
MCM5 (minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae))	Als MCM-Proteinkomplex ein Bestandteil der Replikationsmaschinerie	1,20	1,44		
MCM6 (minichromosome maintenance deficient 6 (S. cerevisiae))		1,06	1,55	0,99	1,53
ORC1L (origin recognition complex, subunit 1-like (yeast))		1,10	1,61	0,95	1,63
<i>ORC3L</i> (origin recognition complex, subunit 3-like (yeast))	Essentiell für die Initiation der DNA- Replikation	1,01	1,58	1,01	1,56
ORC6L (origin recognition complex, subunit 6 homolog-like (yeast))		1,13	1,46	1,08	1,49
POLA (polymerase (DNA directed), alpha)	Polymerase- und 3'-5'-Exonuklease- Aktivität	1,1	1,45		

Tabelle 3.6. Auflistung Replikations-assoziierter deregulierter Gene. Die Farbgebung entspricht der von Tabelle3.5.

K4	22 Zellen (Fortsetzung)	fold chang	<i>ge</i> 100 μCi	<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
POLE2 (polymerase (DNA directed), epsilon 2 (P59 subunit))	Polymerase und Transferase-Aktivität	1,1	1,92	0,98	1,7
PRIM1 (primase, polypeptide 1, 49kDa)	Synthese von Primern für die DNA- Replikation	1,06	2,02	1,01	2,01
RFC1 (replication factor C (activator 1) 1, 145kDa		1,09	1,51	0,89	1,42
RFC2 (replication factor C (activator 1) 2, 40kDa)	Hilfsfaktoren für die DNA-	1,06	1,5	1,01	1,41
RFC4 (replication factor C (activator 1) 4, 37kDa)	Replikation und -Reparatur	0,96	1,84	0,98	1,83
<i>RFC5</i> (replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa)		1,23	1,46		
RNASEH2A (ribonuclease H2, large subunit)	Exonuklease-Aktivität; Degradation von RNA	1,14	1,98	1,05	1,85
RPA1 (replication protein A1, 70kDa)		1,08	1,5		
RPA2 (replication protein A2, 32kDa)	Hilfsfaktoren für die DNA- Replikation und -Reparatur und Rekombination	1,03	1,7	0,99	1,56
RPA3 (replication protein A3, 14kDa)		1,19	1,7	1,08	1,5
RRM1 (ribonucleotide reductase M1 polypeptide)	Ribonukleosid-Diphosphat- Reduktase-Aktivität; essentiell für die	1,14	1,65	1,21	1,79
RRM2 (ribonucleotide reductase M2 polypeptide)	Synthese von dNTPs für die DNA- Replikation	1,22	3,11	1,06	2,8

Zusammengenommen mit den Zellzyklusdaten der Genexpressionsanalysen lässt sich vermuten, dass in den nach 24 Stunden bestrahlten K422 Zellen eine weitere Progression des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase möglich scheint. Dies wird dadurch gestützt, dass im Gegensatz zu den primären CD19+ Zellen keine deregulierten Gene gefunden wurden, die für Zellzyklus-Inhibitoren wie CDKN1A, CDKN1B oder GADD45A kodieren (vgl. Tabelle 3.5.).

3.1.4.3 Apoptose

Apoptose kann durch externe Stimuli wie Entzündungen, durch die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren oder durch bestimmte chemische Substanzen sowie durch ionisierende Strahlung induziert werden. Solche Signale verursachen die Bindung von spezifischen Liganden an Todesrezeptoren wie FAS, dem bekanntesten Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie. Die *downstream* Signaltransduktion umfasst die Bildung eines DISC-Komplexes (*death receptor inducing signaling complex*), die u.a. mit der Aktivierung von Caspase-8, Caspase-3 und der Fragmentierung der DNA durch DFF (*DNA fragmentation factor*) einhergeht. In den bestrahlten Zellen konnten einige Apoptose-assoziierte Gene gefunden werden, die in Tabelle 3.7. zusammengestellt sind.

	K422 Zellen	fold chang	ge 100 μCi	fold chang	ge 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
APAF1 (apoptotic protease activating factor)	Proteolytische Aktivierung des apoptotischen Proteins Procaspase 9	1,15	1,55		
BCL2A1 (BCL2-related protein A1)	Unterdrückung der Apoptose ähnlich wie BCL2			1,67	1,06
CASP8AP2 (CASP8 associated protein 2)	Bestandteil des "death receptor inducing signaling complex" (DISC); Todesrezeptor-Aktivität; Induktion der Apoptose durch extrazelluläre Signale	1,19	1,6	1,01	1,52
NFKBIA (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha)	Bindung und Inhibition des Transkriptionsfaktors NFKB,	6,34	2,36	7,42	3,09
PDCD4 (programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor))	Tumorsuppressoraktivität; reguliert die EIF4A und EIF4G abhängige Proteintranslation	1,22	1,83	1,19	2,01
	Primäre CD19 Zellen	fold chang	ze 100 μCi	fold chang	ge 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
NFKBIA (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha	Bindung und Inhibition des Transkriptionsfaktors NFKB,	2,16		2,47	
BCL2A1 (BCL2-related protein A1)	Unterdrückung der Apoptose in BCL2 ähnlicher Weise	2,1		2,42	

 Tabelle 3.7. Auflistung Apoptose-assoziierter Gene. Farbmarkierung siehe Tabelle 3.5.

Bei den ausschließlich hochregulierten Genen handelt es sich zumeist um Apoptoseassoziierte oder verwandte Gene. Schlüsselgene, wie die oben erwähnten Caspasen oder DNA-Fragmentierungsfaktoren, wurden nicht nachgewiesen. Mit *APAF1* und *BCL2A1* zeigen sich auch zwei Gene hochreguliert, die Funktionen in der von Mitochondrien vermittelten Apoptose innehaben. Mit *NFKBIA* ist weiterhin das Gen eines Inhibitors des Transkriptionsfaktors NFKB hochreguliert, welcher üblicherweise Todespathways supprimiert. Die Frage, ob Apoptose eingeleitet wird, kann auf Basis dieser Genexpressionsdaten jedoch nicht beantwortet werden.

3.1.4.4 Transkriptionelle Veränderungen von Genen für den Proteinabbau

Der wichtigste Mechanismus, um sowohl die korrekte Menge als auch die Qualität von intrazellulären Proteinen zu sichern, ist die selektive Degradation von fehlgefalteten oder beschädigten Polypeptiden. In eukaryotischen Zellen wird die Akkumulation von nichtfunktionellen und potentiell toxischen Proteinen durch den ATP-abhängigen Ubiquitin-26S-Proteasomen-Pathway verhindert. Die Degradation von Proteinen, die durch Einwirkung von oxidativem Stress infolge von ionisierender Strahlung oder durch Hitzeschock eine fehlerhafte oder ungefaltete Struktur aufweisen, wird neben dem Ubiquitin-abhängigen 26S-Proteasomenkomplex alternativ auch durch das Ubiquitin-unabhängige 20S-Proteasomensystem vermittelt [Pervan et al., 2005; Asher et al., 2006]. Korrelierend mit den Literaturdaten konnten -lediglich in den 24 Stunden bestrahlten K422 Zellen- eine Reihe von hochexprimierten Genen nachgewiesen werden, die für Untereinheiten der 26S-Proteasomen kodieren. Die entsprechenden Gene sind nachfolgend in Tabelle 3.8. aufgeführt.

K422 Zellen		fold chang	ge 100 µCi	fold chang	ge 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
PMSA2 (proteasome subunit, alpha type, 2)	Ubiquitin-abhängiger und -unabhängiger			1,12	1,46
PMSA3 (proteasome subunit, alpha type, 3)	Proteinabbau; Endopeptidase-Aktivität; Bestandteil des Proteasomen-Core-	1,14	1,78	1,18	1,70
PMSA4 (proteasome subunit, alpha type, 4)	Komplex			1,11	1,41

Tabelle 3.8. Zusammenstellung der hochexprimierten Gene, deren Proteinprodukte Proteasomenuntereinheiten darstellen. Die Farbgebung entspricht der aus Tabelle 3.5.

K4	22 Zellen (Fortsetzung)	fold chang	ge 100 µCi	fold chang	<i>ge</i> 200 μCi
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
PMSA5 (proteasome subunit, alpha type, 5)		1,17	1,57	1,14	1,49
PMSB2 (proteasome subunit, beta type, 2)	Ubiquitin-abhängiger und -unabhängiger	1,15	1,62	1,08	1,55
PMSB5 (proteasome subunit, beta type, 5)	Proteinabbau; Endopeptidase-Aktivität; Bestandteil des Proteasomen-Core-	1,2	1,53		
PMSB8 (proteasome subunit, beta type, 8)	Komplex			0,95	1,95
PMSB9 (proteasome subunit, beta type, 9)		1,19	2,47	0,96	2,17
<i>PMSC2</i> proteasome 26S subunit, ATPase, 2)		1,20	1,53	1,12	1,46
<i>PMSC3</i> proteasome 26S subunit, ATPase, 3)	Proteasomen ATPase-Aktivität	1,09	1,53	0,98	1,48
PMSC4 (proteasome 26S subunit, ATPase, 4)		1,16	1,45	1,09	1,42
PMSC6 (proteasome 26S subunit, ATPase, 6)		1,13	1,5		
PMSD11 (proteasome 26S subunit, non- ATPase, 11)	Bestandteil des Proteasomen-Core- Komplex;	1,22	1,52	1,14	1,43
PMSD12 (proteasome 26S subunit, non- ATPase, 12)	Non-ATPase	1,06	1,48		
PMSE1 (proteasome activator subunit 1 (PA28 alpha))	Interferon-induziert;	1,18	1,78	1,11	1,73
PMSE2 (proteasome activator subunit 2 (PA28 beta))	Bestandteil des "Immunoproteasoms"	1,17	1,93	1,08	1,94

Den Genexpressionsdaten ist zu entnehmen, dass es, auf Basis der mäßigen Hochregulation der entsprechenden Gene, zu einer leicht erhöhten Proteindegradation infolge von strahlungsbedingten strukturellen Schäden von Proteinen kommt. Die *fold changes* der 24 Stunden bestrahlten K422 Zellen weisen relativ niedrige Werte auf und nehmen nur bei dem Gen *PSMB9* einen Wert von über 2 an. Die Frage, ob letztendlich Proteindegradation stattfindet, kann mittels dieser Daten nicht geklärt werden, jedoch weisen sie darauf hin, dass unstrukturierte Proteine nach der Bestrahlung erkannt wurden.

3.1.4.5 Allgemeine Stressantwort

Unter normalen physiologischen Bedingungen existiert ein homöostatisches Gleichgewicht zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species; ROS*) und ihrer Beseitigung durch endogene ROS-abfangende Komponenten. Zytotoxischer und oxidativer Stress entsteht, wenn die Balance durch die Akkumulation von ROS (Superoxide, Hydrogenperoxide und Hydroxylradikale) und/oder durch eine gestörte antioxidative zelluläre Abwehr gestört ist. Stresszustände sind das Resultat von äußeren Extrembedingungen wie hohe Temperatur, veränderte molekulare Zusammensetzung und Osmolarität des umgebenden Mediums oder die Exposition von Strahlung. Anhand der Genexpressionsanalysen konnten in den unter allen Bestrahlungsbedingungen behandelten Zellen einige Stress-assoziierte Gene nachgewiesen werden, welche in der folgenden Tabelle 3.9. dargestellt sind.

Tabelle 3.9. Zusammenfassung deregulierter Gene für die zytotoxische Stressantwort. Die Farbgebungentspricht der aus Tabelle 3.5.

	K422 Zellen	fold chang	<i>ge</i> 100 μCi	<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
Clorf24 (chromosome 1 open reading frame 24)	Bindung an ungefaltete Proteine; Proteinfaltung			1,23	2,73
DNAJB1 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1)	Hitzeschockprotein-Aktivität; Proteinfaltung	1,5	0,99	1,62	0,98
DUSP1 (dual specificity phosphatase 1)	Proteindephosphorylierung Inaktivierung von MAP-Kinasen	2,28	0,67	2,34	0,69
HIF1A (hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor))	Untereinheit eines Komplexes, der die Transkription von Genen des Energiemetabolismus, der Angiogenese und der Apoptose reguliert	1,3	1,62	1,21	1,57
HSPA1B (heat shock 70kDa protein 1B)	Hitzeschockprotein-Aktivität; Erhaltung der Sekundärstruktur anderer Proteine			1,44	1,5
<i>MCL1</i> (myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related))	Regulator für die Erhaltung der Homöostase in frühen hämatopoetischen Zellen	1,78	0,97	1,67	1,01
<i>MT1H</i> (metallothionein 1H)	Bindung von Metallionen;			1,04	2,19
MT1X (metallothionein 1X)	Schwermetalldetoxifikation			1,16	2,75

K422 Zellen (Fortsetzung)		<i>fold change</i> 100 μCi		<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
MT2A (metallothionein 2A)	Bindung von Metallionen; Aufgaben in der Schwermetalldetoxifikation			1,07	3,06
SOD2 (superoxide dismutase 2, mitochondrial)	Bestandteil des zellulären Antioxidant- Systems; essentiell für die Metalldetoxifikation	0,98	1,47		
Primäre CD19+ Zellen		fold change 100 µCi		<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
DNAJB1 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1)	Hitzeschockprotein-Aktivität; Erhaltung der Sekundärstruktur anderer Proteine	1,25		1,49	
DUSP1 (dual specificity phosphatase 1)		1,85		2,23	
<i>DUSP2</i> (dual specificity phosphatase 1)	Proteindephosphorylierung;	4,95		5,74	
<i>DUSP5</i> (dual specificity phosphatase 1)	makuvierung von MAF-Kinasen	1,55		1,8	
DUSP10 (dual specificity phosphatase 1)		1,3		1,52	

Die Präsenz von zumeist heraufregulierten Genen, deren Proteine an der Hitzeschockantwort beteiligt sowie in der Vermeidung und Beseitigung von oxidativen Schäden involviert sind, gibt einen Hinweis auf existierende Stresszustände, die durch die Alphastrahlung wahrscheinlich aufgrund der Bildung von reaktiven radiolytischen Verbindungen induziert werden. Nach den stärksten Bestrahlungsbedingungen (200 μ Ci, 24 Stunden) zeigen sich mit MT1A, MT1X und MT2A auch drei Metallothioneine hochreguliert, deren Genprodukte eine wichtige Rolle im Schwermetallmetabolismus bzw. in der Schwermetalldetoxifikation spielen, indem sie mit hoher Affinität Schwermetalle binden. Zum anderen fungieren sie generell als Radikalfänger. Die bestrahlten CD19+ Zellen zeigen dagegen neben einem *heat shock*-assoziierten Gen (*DNAJB1*) ausschließlich hochregulierte *DUSP*-Gene. Sie stellen duale Threonin/Tyrosin-Phosphatasen dar, die spezifisch MAP-Kinasen (*mitogen-aktivated protein kinases*) dephosphorylieren und inaktivieren, welche u.a. in der Regulation der Immunzellfunktion, der Lymphozytenentwicklung, der Differenzierung und der Apoptose involviert sind. 3.1.4.6 Transkriptionelle Veränderungen bei Immun- und Interferon-assoziierten Genen

Ein überraschendes Ergebnis ist die Feststellung, dass in den Genexpressionsanalysen eine Vielzahl an signifikant hochexprimierten Interferon- (IFN) assoziierten Genen nachgewiesen werden konnte. Die weitreichenden biologischen Wirkungen von Interferonen werden durch eine Reihe von Interferon-stimulierten Genen (*interferon stimulating genes; ISG*) vermittelt. ISGs werden spezifisch durch IFN α und IFN β (Typ I-Antwort) oder durch IFN γ (Typ II-Antwort) induziert. Neben der antiviralen Aktivität vermitteln Interferone auch antiproliferative Wirkungen und üben Kontrollfunktionen bei der Differenzierung und Proliferation im zellulären Immunsystem aus. Die Induktion der ISGs erfolgt nach Bindung des Interferons an seine Rezeptoren, die nach Bindung der Liganden dimerisieren. Die Signalweiterleitung, bei der keine Proteinsynthese notwendig ist, sondern über latent im Zytoplasma vorliegende Faktoren aktiviert wird, führt zur transkriptionellen Aktivierung verschiedener ISGs. Eine Auswahl von ISGs und immunassoziierter Gene ist in Tabelle 3.10. dargestellt.

K422 Zellen		fold change 100 µCi		<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
CCL3 (chemokine (C-C motif) ligand 3)	Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion; aktiviert und verstärkt die Zytotoxizität von NK-Zellen: Involviert in der	1,32	2,89	1,24	3,31
CCLA (chemokine (C-C motif) ligand 4)	Aktivierung von B- und T-Zellen und Monozyten; proinflammatorische Wirkung			1,13	2,53
<i>IFI16</i> (interferon, gamma-inducible protein 16)	Regulation von CDKN1A und P53; Induktion von S-Phase-Arrest-Situationen	1,05	2,37	1,09	2,65
<i>IFIT1</i> (interferon- induced protein with tetratricopeptide repeats 1)	Inhibition der Bindung des Translationsinitiationsfaktors eIF3 an die 40S ribosomale Untereinheit	1,03	10,95	1,05	11,67
IFIT4 (interferon- induced protein with tetratricopeptide repeats 4)	Regulation der Zelldifferenzierung; antiproliferative Wirkung	0,96	7,22	0,99	8,33
<i>IFITM1</i> (interferon induced transmembrane protein 1 (9-27))	Transduktion von antiproliferativen Signalen			0,98	3,73
<i>IRF1</i> (interferon regulatory factor1)	Transkriptionsregulation von Interferon- stimulierten Genen	1,32	1,54	1,22	1,84

Tabelle 3.10. Übersicht über hochregulierte Gene der Immun- und Interferonantwort. Farbgebung siehe vorangegangene Tabellen.

K422 Zellen (Fortsetzung)		<i>fold change</i> 100 μCi		<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
<i>IRF2</i> (interferon regulatory factor2)	Transkriptionsregulation von Interferon- stimulierten Genen	0,98	1,5	1,09	1,47
<i>IRF3</i> (interferon regulatory factor3)		1,28	1,6	1,12	1,65
IRF7 (interferon regulatory factor7)		1,35	4,13	1,14	4,3
<i>ISG20</i> (interferon stimulated gene 20kDa)	Interferon-induzierte RNase; 3'-5'- Exonuklease-Aktivität	1,08	2,93	0,95	2,99
MX1 (myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon- inducible protein p78 (mouse))	Mitglied der Dynamin-Familie, Mitglied der GTPase-Familie, Verantwortlich für die Etablierung und die Erhaltung eines zellulären antiviralen Status bei Virusinfektion			0,95	4,86
MX2 (myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse))		1,01	5,01	0,99	6,22
OAS1 (2',5'- oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa)	Vermittelt durch Aktivierung von zellulärer RNaseL die Degradation zelleigener und viraler RNA und damit Translationsinhibition	1,15	5,75	1,05	5,37
OAS2 (2'-5'- oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa)		1,02	2,79	1,07	2,77
OAS3 (2'-5'- oligoadenylate synthetase 3, 100kDa)		0,95	4,47	0,92	4,66
OASL (2'-5'- oligoadenylate synthetase-like)		1,02	3,1	1,03	5,18
PRKR (protein kinase, interferon- inducible double stranded RNA dependent)	Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2α und Inhibition der Translation	0,99	2,04	1,18	2,12
TNF (tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2))	Multifunktionelles proinflammatorisch wirkendes Zytokin mit Effekten auf u.a. die Immunantwort, Koagulation und Lipidstoffwechsel; wird sezerniert von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten	1,33	2,28	1,23	2,59
<i>TNFSF10</i> (tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10)	Proinflammatorische Wirkung; Induktion von Apoptose	0,97	1,66	0,92	2,45

CD19+ Zellen		<i>fold change</i> 100 μCi		<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
CCL3 (chemokine (C-C motif) ligand 3)	Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion; aktiviert und verstärkt die Zytotoxizität von NK-Zellen [.]	1,74		1,71	
CCLA (chemokine (C-C motif) ligand 4)	Ist involviert in der Aktivierung von B- und T-Zellen und Monozyten; proinflammatorische Wirkung	1,58		1,4	
<i>CXCL2</i> chemokine (C-X- C motif) ligand 2	Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion	1,74		2,19	
<i>CXCL3</i> chemokine (C-X- C motif) ligand 3	Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion	1,41		1,78	
<i>TNF</i> (tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2))	Multifunktionelles proinflammatorisch wirkendes Zytokin mit Effekten auf u.a. die Immunantwort, Koagulation und Lipidstoffwechsel; wird sezerniert von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten	2,57		2,69	
IL8 (interleukin 8)	Proinflammatorisches Heparan-bindendes Protein, das die Aktivierung und Migration von Neutrophilen aus dem peripheren Blut ins Gewebe mediiert	1,21		1,95	

In beiden untersuchten Zelltypen konnten eine Reihe von hochregulierten Genen nachgewiesen werden, die für Zytokine und Chemokine und damit für Signalpeptide kodieren, die im Rahmen der Immunantwort für die Vermittlung von inflammatorischen Signalen eine bedeutende Rolle spielen. Darüber hinaus konnte für die 24 Stunden bestrahlten K422 Zellen der Nachweis einer hohen Anzahl an hochexprimierten Interferon-stimulierten Genen erbracht werden. Von allen in den Genexpressionsanalysen gefundenen Genen zeigen diese die höchsten fold changes bis zu einem Wert von 11,67 (IFIT1) im Vergleich zu den unbehandelten K422 Zellen. Die Wirkungen vieler dieser gefundenen ISGs resultieren in antiviralen zellulären Translationseinem Status, RNA-Degradation, und Proliferationsinhibition und stellen üblicherweise Reaktionen dar, die sonst nur bei viralen Infektionen zu beobachten sind. Interessanterweise konnte eine differentielle Genexpression von Interferonen selbst, die letztendlich eine IFN-induzierte Antwort auslösen, nicht beobachtet werden. Da keine virale Infektion vorliegt, kann die durch Alphastrahlung gefundene **IFN-Antwort** hier eher als Teil eines generellen unspezifischen Abwehrmechanismus angesehen werden (vgl. 4.1.7.).

3.1.4.7 Veränderungen der Proteinbiosynthese

Interessanterweise konnten nach Bestrahlung in beiden untersuchten Zelltypen differentiell exprimierte Gene gefunden wurden, deren Produkte in der Proteinsynthese involviert sind. Diese Produkte stellen Translations-Initiationsfaktoren sowie Proteine der großen und kleinen ribosomalen Untereinheiten dar, wobei sich die entsprechenden Gene in den K422 Zellen hoch- und herabreguliert zeigen, in den CD19+ Zellen dagegen lediglich hochreguliert. In der folgenden Tabelle 3.11. sind die entsprechenden Gene aufgeführt.

 Tabelle
 3.11.
 Zusammenfassung
 differentiell
 regulierter
 Gene,
 deren
 Produkte
 eine
 Rolle
 in
 der

 Proteinbiosynthese spielen.
 Farbmarkierung siehe vorhergehende
 Tabellen.
 Tabellen.
 Image: State State

K422 Zellen		<i>fold change</i> 100 μCi		fold change 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
<i>EIF1AY</i> (eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked)	Translationsinitiation			0,99	0,63
<i>EIF5</i> (eukaryotic translation initiation factor 5)		1,68	1,12	1,58	1,0
<i>MRPL17</i> (mitochondrial ribosomal protein L17)				1,04	1,73
RPL10 (ribosomal protein L10)	Strukturelle Bestandteile der großen			0,99	0,68
RPL15 (ribosomal protein L15)	ribosomalen Untereinheit			1,04	0,33
RPL29 (ribosomal protein L29)				1,0	0,7
RPL9 (ribosomal protein L9)	Struktureller Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit			1,44	0,97
RPS4Y (ribosomal protein S4, Y-linked)	Struktureller Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit			1,08	0,5
Primäre CD19 Zellen		fold change 100 µCi		<i>fold change</i> 200 μCi	
Name	Funktion	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt	46 Min. vs unbehandelt	24 Std. vs unbehandelt
<i>EIF5</i> (eukaryotic translation initiation factor 5)	Translationsinitiation	1,27		1,51	
<i>SUI</i> (putative translation initiation factor)	Regulation der Translationsinitiation	1,34		1,5	
RPS27L (ribosomal protein S27-like)	Strukturelle Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	1,46		1,35	

Bei den K422 Zellen zeigen sich die meisten Proteinsynthese-assoziierten Gene signifikant herabreguliert. Dazu zählen insbesondere solche, die für Komponenten der ribosomalen Untereinheiten kodieren. Zusammen mit der ebenfalls beobachteten Herabregulation des Gens Translationsinitiationsfaktors EIF1AY dies des könnte einen Hinweis auf eine strahlungsbedingte generelle Verringerung der Proteinsynthese geben, wenngleich der übrige kleinere Anteil der fold change-Werte das Gegenteil impliziert. Mit der Hochregulation von drei Genen in den CD19+ Zellen ergibt sich ein ähnlicher Sachverhalt, wobei die entsprechenden fold changes eher grenzwertig sind. Generell kann man aus diesen Daten keine eindeutige Aussage über eine etwaige Reduktion oder Aktivierung der Proteinsynthese treffen.

3.1.5 Verifizierung der Genexpressionsdaten mit Hilfe der quantitativen "Real-Time"-PCR

Um die Ergebnisse der Arraydaten mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden für beide betrachtete Zelltypen ausgewählte Kandidatengene mittels quantitativer "Real-Time"-PCR hinsichtlich der Hoch- oder Herabregulation ihrer mRNA untersucht. Im Gegensatz zur Northern Blot-Analyse kann dieses hochsensitive Verfahren mit sehr wenig RNA-Material durchgeführt werden. Durch die gleichzeitige Amplifikation und Messung von 96 Proben in einem Analysendurchgang können die Anzahl der Läufe und etwaige Fehler zwischen diesen möglichst gering gehalten werden.

Für die Zell-Linie K422 wurden insgesamt 17 Kandidatengene untersucht, wobei 5 davon auf solche Gene entfielen, die sich nur bei einer Aktivität von 200 μCi dereguliert zeigten. Für die untersuchten primären CD19+ Zellen wurde eine Anzahl von insgesamt 7 Targets analysiert. Basierend auf den Genexpressionsdaten wurden für die Verifizierung Vertreter aus den Kategorien DNA-Reparatur, Zellzyklus, Immunantwort, Transkriptionsregulation, zytotxischer Stress, Proteinsynthese, Enzyme und Membranproteine ausgewählt. Die Auswahl der zu verifizierenden Targets für die PCR richtete sich nach dem subjektiven Interesse, wobei nicht nur besonders hoch- oder herunterregulierte Gene ausgewählt wurden, sondern absichtlich auch solche, die die *fold change*-Auswahlkriterien knapp erfüllten.

Einen exemplarischen Verlauf einer solchen PCR im *ABI Prism Sequence Detection System*, bei dem die Gene *OAS1* (in diesem Beispiel *fold change:* 4,22) und *RPL15* (*fold change:* 0,38) jeweils mit dem *Housekeeping*-Gen β -Aktin als internen Standard amplifiziert wurden, zeigt Abbildung 3.5.



Abbildung 3.5. A: Amplifikation des Gens OAS1 und des "Housekeeping-Gens" β -Aktin aus unbestrahlten Kontrollen und bestrahlten Proben von K422 Zellen. Die Expression von β -Aktin bei Bestrahlung ändert sich nicht; eine Zunahme der Expression von OAS1, sichtbar durch eine Verschiebung beider Amplifikationskurven in den Bereich einer niedrigeren Zyklenzahl, ist zu beobachten. B: Umgekehrter Fall für das Gen RPL15. Die Amplifikationskurve verschiebt sich in die entgegengesetzte Richtung, da für die Detektion mehr Amplifikationszyklen benötigt werden. Zusätzlich sind in allen Darstellungen die für diese Messungen ermittelten Δ Ct-Werte aufgeführt.

Zur statistischen Absicherung wurde jedes Gen mindestens drei Mal im Duplikat gemessen, wobei bei jeder Messung immer das *Housekeeping*-Gen β -Aktin als internes Referenzgen mitgeführt wurde. Die in jedem Lauf gemessenen Werte der Targetgene wurden auf die als Standard definierte Expression des β -Aktins bezogen. Anschließend wurde die Differenz der Δ Ct-Werte der unbehandelten Kontrollproben und der bestrahlten Proben ermittelt ($\Delta\Delta$ Ct-Werte) und entlogarithmiert, so dass als Endergebnis die Expressionsänderungen (*fold changes*) vorlagen. Zum direkten Vergleich sind in den folgenden Abbildungen die *fold change*-Werte der Affymetrixanalyse (blaue Balken) zusammen mit den über die quantitative "Real-Time"-PCR (violette Balken) ermittelten Expressionsänderungen für ausgewählte Kandidatengene dargestellt.



Abbildungsunterschrift auf der nachfolgenden Seite.



Abbildung 3.6. Verifizierung der Affymetrix-Microarraydaten (blau) mit quantitativer "Real-Time"-PCR (violett) basierend auf dem *ABIPrism 7900HT Sequence Detection System*. A: Expressionsmessung der K422 Zellen nach Bestrahlung mit einer Aktivität von 100 μ Ci für jeweils 46 Minuten und 24 Stunden. B: Messung nach einer Aktivität von 200 μ Ci für beide Bestrahlungszeiten. C: Keine signifikante differentielle Genexpression bei Behandlung von K422 Zellen mit dem unkonjugierten CD20-Antikörper. D: Expressionsmessung der primären CD19+ Zellen. Auf der X-Achse befinden sich jeweils die untersuchten Targetgene, die *fold change*-Werte auf der Y-Achse stellen logarithmierte (log2) $\Delta\Delta$ Ct-Werte dar. Ein $\Delta\Delta$ Ct-Wert von 1 entspricht einem *fold change*-Wert von 2 (eine PCR-Effizienz von 2 vorausgesetzt). Die Signifikanzen wurden in Bezug auf die unbestrahlten Kontrollproben berechnet.

Die strahlungsinduzierte differentielle Expression der getesteten Gene konnte in allen Fällen bei einer Expositionszeit von 24 Stunden in K422 Zellen sowie bei einer Bestrahlungsdauer von 46 Minuten in CD19+ Zellen bestätigt werden (Abb. 3.6. A, B, D). Auffallend ist, dass die mit Hilfe der quantitativen "Real-Time"-PCR gemessene Genexpression bei einem Teil der Gene höher ist als die mit den Microarrays ermittelte Genexpression. Dies trifft vor allem auf die 24 Stunden lang bestrahlten K422 Proben zu (Abb. 3.6. A, B). Die Ursache ist darin der Normalisierung zu finden. dass im Rahmen der Microarrayrohdaten die Fluoreszenzintensitäten einiger Gene herabgesetzt werden, woraus letztendlich eine etwas niedrigere fold change resultiert.

Bei den primären CD19+ Zellen konnte die differentielle Genexpression nach 46 Minuten verifiziert werden (Abb. 3.6. D). Für die betrachteten herunterregulierten Gene *CD79B* und *CDKN1B* ist eine signifikante Deregulation offenbar nicht gegeben, obwohl die Daten der quantitativen "Real-Time"-PCR denen der Microarrays folgen. Dies hängt mit der sehr begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden Spendermaterials zusammen und hätte mit weiteren PCR-Analysen sicherlich auch signifikant verifiziert werden können.

Dass der unkonjugierte CD20-Antikörper offenbar keine differentielle Regulation induziert, konnte ebenfalls bestätigt werden (3.6. C). Die Unterschiede innerhalb der beiden betrachteten Expositionszeiten und im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben sind nicht signifikant. Die zum Teil hohen Standardabweichungen belegen dieses Ergebnis.

An den Unterschieden in der Genexpression ist ersichtlich, dass die Verifizierung der Affymetrix-Microarraydaten unerlässlich ist. Gleichzeitig ist erkennbar, dass die Auswahlkriterien der Affymetrix-Analyse für Kandidatengene für die 24 Std. bestrahlten K422 Zellen und die 46 Minuten bestrahlten primären CD19+ Zellen hoch genug angesetzt sind, um einer Bestätigung der differentiellen Expression mit der quantitativen "Real-Time"-PCR standzuhalten.

3.2 Proteinexpression

3.2.1 Proteinexpressionsstatus einiger ausgewählter Oberflächenantigene

Mit Hilfe der Genexpressionsanalysen durch Microarrays konnte eine differentielle Hochoder Herunterregulation einer Vielzahl von Genen auf RNA-Ebene untersucht werden. Eine Expressionsanalyse für die entsprechenden Proteinprodukte ist in diesem Umfang nicht möglich. Um dennoch einen Einblick in eine mögliche Korrelation zwischen Genexpression und Proteinexpression zu erhalten, wurde anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen die Proteinexpression bzw. die Expressionsdichte von Oberflächenmolekülen an den bestrahlten K422 Zellen exemplarisch für die vier Membranproteine CD164, CD47, CD79B und CD1c analysiert. In der nachstehenden Tabelle sind die untersuchten Proteintargets mit ihren in der Literatur beschriebenen Funktionen aufgeführt.

Name	Eigenschaft/Funktion			
CD164 - Sialomucin; wird normalerweise in humanen hämatopoetischen CD34+ Progenitorzellen exprimiert; - erleichtert die Adhäsion von CD34+ Progenitorzellen im Knochenmarkstroms - reguliert das Wachstum von CD34+ hämatopoetischen Progenitorzellen				
CD79B	 Transmembranrezeptoraktivität; Signaltransduktionsaktivität nach Ig-Bindung an B-Zellen Teil eines Komplexes, der essentiell für die Assemblierung, den Transport und die funktionelle Aktivität des Antigen-Rezeptor-Komplexes in B-Lymphozyten ist 			
CD47	 Ist beteiligt an der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration, die bei der Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix stattfindet. Wirkt wie MHC-Moleküle als <i>"marker of self" / "</i>körpereigen"-determinierendes Protein 			
CD1c	Antimikrobielle humorale Immunantwort;Antigenpräsentation			

Tabelle 3.12. Übersicht über die untersuchten Oberflächenmoleküle sowie ihre in der Literatur beschriebenen zellulären Funktionen und Eigenschaften.

Um die Proteinexpression zu ermitteln, wurden die bestrahlten Zellen mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch auf eine verstärkte oder verminderte Präsenz (Expressionsdichte) ihrer Oberflächenantigene untersucht. Die Ergebnisse wurden als "mittlere Fluoreszenzintensität" (*mean fluorescence intensity; MFI*) der bestrahlten Proben, jeweils in Bezug auf die unbehandelte Kontrollprobe dargestellt. Der Unterschied im Vergleich zur Kontrollprobe wurde in *fold change*-Werte umgerechnet und diese in einem direkten Vergleich den *fold change*-Werten der Genexpressionsdaten gegenübergestellt. In Abbildung 3.7. sind diese Ergebnisse für die K422 Zellen zusammengefasst.



Abbildung 3.7. Proteinexpression der betrachteten Oberflächenantigene in den bestrahlten K422 Zellen. A: Exemplarische Dotplots für die Messung von CD164 mit den ermittelten MFI-Werten. Auf der X-Achse ist die Granularität der Zellen, auf der Y-Achse logarithmisch die Fluoreszenzintensität aufgetragen. B: Vergleich des Genexpressionsstatus mit dem ermittelten Proteinexpressionsstatus der untersuchten Oberflächenantigene. Zur Ermittlung der *fold change*-Werte der Proteinexpression wurde das Verhältnis der MFI-Werte der jeweils bestrahlten Probe zu der unbehandelten Probe berechnet. Auf der X-Achse befinden sich jeweils die untersuchten Oberflächenantigene, die *fold change*-Werte auf der Y-Achse stellen logarithmierte (log2) Werte dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte immer in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen.

Die höchste Proteinexpression konnte bei den Oberflächenmarkern CD164 und CD1c nach einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 3.7. B), während sich der Proteinexpressionsstatus der beiden anderen betrachteten Marker CD79B und CD47 als weitaus geringer darstellt. Der Marker CD79B zeigt nach einer Bestrahlung von 46 Minuten bei beiden Aktivitäten leicht gegenläufiges Expressionsverhalten der RNA und des Proteins (Abbildung 3.7. B). Signifikante Proteinüberexpression nach einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden konnte nur für CD164 gezeigt werden. Bei den Markern CD164 und CD1c konnte nach 24 Stunden Bestrahlungsdauer eine höhere Protein- als RNA-Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sowie die Tatsache, dass die Proteinexpression aller

untersuchten Oberflächenmarker nach einer Bestrahlungsdauer von 46 Minuten generell auf einem erheblich niedrigeren Level liegt als nach 24 Stunden, stehen im Einklang mit den Genexpressionsanalysen. Eine Korrelation zwischen dem Proteinexpressionstatus der betrachteten Oberflächenmarker und den Genexpressionsdaten der Microarrays konnte somit bis auf CD79B für alle anderen Marker nachgewiesen werden.

3.2.2 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsstatus des Zellzyklusproteins RB1

Eine mögliche Korrelation zwischen Genexpression und Proteinexpression wurde neben den oben erwähnten Oberflächenmarkern auch für das RB1 Protein untersucht. Das RB1-Protein nimmt im Zellzyklus eine zentrale Stellung ein. Es stellt das Schlüsselprotein für den G1-Restriktionspunkt dar und ist aufgrund seiner Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus und damit auch für Differenzierung und Apoptose als entscheidendes Substrat der Cyclinabhängigen Kinasen von großer Bedeutung. Der Phosphorylierungszustand von RB1 ändert sich im Laufe des Zellzyklus. In der GO- und zu Beginn der G1-Phase liegt es in einer hypophosphorylierten Form vor und wird in der späten G1-Phase an mehreren Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird bis zur Mitose beibehalten, in deren Verlauf RB1 wieder dephosphoryliert wird. Durch Phosphorylierung wird die Interaktion des RB1 mit E2F-Transkriptionsfaktoren blockiert, so dass diese an Promotoren verschiedener S-Phase Gene binden können und so den Übertritt von der G1- in die S-Phase ermöglichen. In den Genexpressionsanalysen wurden für das RB1-Gen fold change-Werte von 1,73 (100 µCi, 24 Stunden) bzw. 1,42 (200 µCi, 24 Stunden) für die K422 Zell-Linie ermittelt, die mit quantitativer "Real-Time"-PCR (fold change 1,61 bzw. 1,79) verifiziert werden konnten.

Anhand von Western Blot Analysen wurde untersucht, ob eine Expressionsveränderung von RB1 auch auf Proteinebene nachzuweisen ist. Gleichzeitig wurde der Phosphorylierungszustand des Proteins analysiert, anhand dessen auf eine spezifische Zellzyklusphase geschlossen werden sollte. Da sich RB1 nur in den K422 Zellen als signifikant dereguliert erwies, wurde die Western Blot-Analyse nur mit diesen Zellen durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse ist der nachstehenden Abbildung 3.8. entnehmbar.



Abbildung 3.8. Western Blot-Analyse des RB1-Proteins in den unterschiedlich behandelten Proben der K422 Zell-Linie. Im oberen Teil des Gels sind die Banden der phosphorylierten (pRB1) und unphosphorylierten (RB1, 105 KDa) Form des Proteins gezeigt. Die Detektion von RB1 wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der sowohl die phosphorylierte, als auch die unphosphorylierte Variante erkennt. Der untere Teil des Blots zeigt die Proteinexpression des *Housekeeping*-Gens *GAPDH*, das als interne Kontrolle mitgeführt wurde.

Das obere Bandenmuster enthält eine Doppelbande, die die phosphorylierte und unphosphorylierten Form des RB1-Proteins kennzeichnet. Alle bestrahlten Proben sowie die unbehandelte Kontrolle zeigen eine weitgehend identische Intensität der Banden. Das gilt für die Banden der phosphorylierten und der unphosphorylierten Form von RB1. Unterschiede im Phosphorylierungszustand, die durch große Intensitätsschwankungen der entsprechenden Banden oder aber durch das komplette Ausbleiben der phosphorylierungsspezifischen Banden erkennbar wären, sind in diesem Fall nicht festzustellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe sind die auf Transkriptionsebene nach einer Expositionszeit von 24 Stunden gefundenen Wirkungen in der Western Blot Analyse auf Proteinebene nicht nachvollziehbar. Dies gilt jedoch mit Einschränkung, da in der letzten Spur anhand der GAPDH-Bande eine geringere Proteinmenge zu erkennen ist und die RB1-Banden relativ zur GAPDH-Bande etwas stärker sind. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Phosphorylierung von RB1 in allen Proben als weitgehend homogen und ohne signifikante Unterschiede erweist, kann keine Aussage über Veränderungen des Zellzyklus getroffen werden.

3.2.3 Proteinexpressionsstatus des Zellzyklusregulators Cyclin E2 (CCNE2)

Zur Bestimmung der Proteinexpression von Cyclin E2 in den betrachteten Proben wurde nach Bestimmung auf Transkriptionsebene ebenfalls eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Das Zellzyklusprotein Cyclin E2 ist ein wichtiger Regulator, der vor allem in der Transition von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus eine große Rolle spielt. Das entsprechende Gen ist als eines von wenigen bereits nach einer Bestrahlung von 46 Minuten mit einer über quantitative "Real-Time"-PCR ermittelten *fold change* von 1,65 für 100 μ Ci bzw 1,67 für 200 μ Ci signifikant hochreguliert. Die Expression der RNA bis zu einer *fold change* von 5,66 für 100 μ Ci bzw. 7,29 für 200 μ Ci konnte nach einer Expositionszeit des Strahlers von 24 Stunden gezeigt werden. Da eine differentielle Regulation dieses Gens ebenfalls nur in den K422 Zellen nachzuweisen war, wurde der entsprechende Western Blot nur für die Zell-Linie durchgeführt. In der folgenden Abbildung ist die Proteinexpression von Cyclin E2 im Western Blot dargestellt.



Abbildung 3.9. Western Blot-Analyse der Cyclin E2-Expression in den betrachteten, unterschiedlich behandelten K422-Proben. Der Nachweis des 52 KDa schweren Cyclin E2 erfolgte in dem oberen Bereich des Blots, während im unteren Teil das Protein des *"Housekeeping* Gens" *GAPDH* gezeigt ist.

Die oberen Banden stellen die Expression des Cyclin E2 dar. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist eine signifikante Expressionssteigerung des Proteins bei denjenigen Zellen, die dem Alphastrahler nur 46 Minuten ausgesetzt waren, nicht zu verzeichnen. Ein völlig anderes Bild zeigt sich jedoch bei Zellen, die 24 Stunden lang mit dem Radioimmunkonjugat inkubiert wurden. Unabhängig von der applizierten Aktivität ist hier eine massive Erhöhung der Proteinexpression zu erkennen. Die Genexpressionsdaten der Microarrays sowie der quantitativen "Real-Time"-PCR korrelieren somit mit der gesteigerten Proteinexpression des Cyclin E2 in der Western Blot-Analyse, woraus sich ein hoher intrazellulärer Proteinlevel an Cyclin E2 ableiten lässt. Aufgrund seiner Funktion im Zellzyklus, die Transition von der G1-in die S-Phase zu forcieren, könnte angesichts der hohen Proteinmenge angenommen werden, dass die bestrahlten Zellen nicht in der G1-Phase verbleiben, sondern weiter in die S-Phase gedrückt werden oder ein S-Phase-Arrest vorliegt.

3.3 Zellzyklusanalysen

Da anhand des Phosphorylierungsstatus von RB1 keine Informationen über den Zustand des Zellzyklus gewonnen werden konnten, auf der anderen Seite jedoch eine Überexpression des in die S-Phase treibenden Proteins Cyclin E2 nachgewiesen werden konnte, wurden im Folgenden genauere Untersuchungen hinsichtlich der einzelnen Zellzyklusphasen durchgeführt. Hierfür wurden detaillierte Untersuchungen unter Verwendung des Thymidinanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) und des DNA-bindenden Farbstoffes 7-AAD durchgeführt. Extern zugegebenes BrdU kann von Zellen, die den Eintritt in die S-Phase vollziehen bzw. sich in der S-Phase befinden im Zuge der DNA-Replikation in Konkurrenz die DNA eingebaut werden. Durch zum intrazellulär synthetisierten Thymin in wird fluoreszenzmarkierte Antikörper das Basenanalogon anschließend durchflusszytometrisch detektiert, so dass neusynthetisierte DNA von der kompletten, mit 7-AAD gefärbten Gesamt-DNA unterschieden werden kann. Die Zellzyklusanalysen wurden mit den unbehandelten sowie mit den bestrahlten K422 Zellen durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abbildung 3.10. A: Zusammenstellung der Punktwolkendiagramme (Dotplots) der einzelnen Zellzyklusanalysen. **B:** Prozentualer Anteil der K422 Zellen in den untersuchten Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M. Die Signifikanzberechnung erfolgte in Bezug auf die unbehandelten Kontrollproben.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zeigen die 46 Minuten bestrahlten Zellen keine nennenswerten Unterschiede in der Zellzyklusverteilung. Mit einem Prozentsatz zwischen 56,13% und 57,67% (Bestrahlung mit 200 µCi bzw. 100 µCi für 46 Minuten) befindet sich mehr als die Hälfte der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus. Nach einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden zeigen sich dagegen im Vergleich zu den unbehandelten und den nur 46 Minuten bestrahlten Zellen kleinere Zellpopulationen in der G0/G1- und größere sowie ausgedehnte Populationen in der G2/M-Phase (Abbildung 3.10. A), was sich auch in einem gesteigerten prozentualen Anteil von 28,05% bzw. 21,7% (100 µCi, bzw. 200 µCi, 24 Stunden, Abbildung 3.10. B) bemerkbar macht. Mit einem Prozentsatz von 31,78% bzw. 33,14% ist unter denselben Bestrahlungsbedingungen zugleich eine leichte Zunahme von Zellen zu beobachten, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Im Vergleich zu der Expositionszeit von nur 46 Minuten zeigen die 24 Stunden bestrahlten Zellen eine mittlere Zunahme von 6% in der G2/M-Phase und 8,16% in der S-Phase sowie eine mittlere Abnahme von 14,25% der G0/G1-Phase. Die beobachtete Verschiebung von der G0/G1-Phase hin in die S- und G2/M-Phase könnte damit als ein Anzeichen für einen Zellzyklusarrest in der S- oder G2/M-Phase gedeutet werden. Arrestsituationen im Zellzyklus am G1- Kontrollpunkt vor der Transition in die S-Phase oder am G2-Kontrollpunkt vor dem Übergang in die Mitose stellen letztlich Selbstschutzmechanismen dar und sind das Resultat von zellulären Läsionen oder äußeren Bedingungen, die es einer Zelle nicht erlauben, in die nächste Phase überzutreten.

3.4 Untersuchungen zur Apoptose

In schweren Fällen erfolgt im Rahmen eines Zellzyklusarrests die Einleitung der Apoptose. Um mögliche strahlungsinduzierte apoptotische Reaktionen festzustellen, wurden die bestrahlten K422 Zellen zunächst im Hinblick auf das Apoptose-assoziierte Membranphospholipid Phosphatidylserin untersucht. Dieses Lipid transloziert in apoptotischen Zellen aus der inneren Schicht der Plasmamembran und wird auf der äußeren Seite exponiert, wo es durch das Phospholipid-Bindeprotein Annexin V gebunden wird und somit detektiert werden kann. Eine gleichzeitige Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI) dient zum Nachweis nekrotischer Zellen, während doppelt (Annexin V & PI) positive Zellen als spät-apoptotisch, nekrotisch, oder als bereits tot zu betrachten sind.

Zusätzlich wurde mit der Caspase-3 ein weiterer Apoptosemarker untersucht. Sie stellt eine wichtige Protease dar, die in einem frühen Stadium der Apoptose aktiviert wird. Wie andere Mitglieder dieser Proteasefamilie wird auch diese als inaktives Proenzym synthetisiert und bei Eintritt in die Apoptose durch Selbstproteolyse oder proteolytische Spaltung durch andere
Proteasen prozessiert. Beide Apoptosemarker wurden bei den bestrahlten K422 Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind in nachstehender Abbildung wiedergegeben.



Abbildung 3.11. A: Durchflusszytometrische Bestimmung von nekrotischen (Propidiumiodid; PI) und apoptotischen (Annexin V) K422 Zellen. **B:** Messung der Caspase-3 Expression als Marker für frühe Apoptose. Der Anteil der Zellen in den Quadranten ist in Prozent angegeben.

In allen Versuchsbedingungen finden sich sehr wenige Propidiumiodid positive und damit als rein nekrotisch zu bezeichnende Zellen, aber auch ein sehr geringer Prozentsatz an apoptotischen Zellen (Abbildung 3.11.A, Quadrant 4), die ausschließlich für Annexin V positiv sind. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, zumal Apoptose ein typisches Ereignis nach Strahlungsexposition darstellt. Die größte Anzahl positiver Zellen ist sowohl für Annexin V als auch für Propidiumiodid gefärbt (Abbildung 3.11. A, Quadrant 2), und repräsentiert damit bereits abgestorbene Zellen und/oder lediglich Zellfragmente. Hier ist unklar, durch welchen Mechanismus die bestrahlten Zellen letztendlich zugrunde gegangen sind. Überraschend ist weiterhin die Tatsache, dass sich nur ein sehr geringer Prozentsatz der betrachteten Zellen überhaupt als rein apoptotisch bzw. rein nekrotisch zeigt, wobei sich bei den 46 Minuten bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen keine Änderungen zeigen und der größere Anteil auf die nach 24 Stunden bestrahlten Zellen fällt. Die Tatsache, dass offensichtlich nur ein äußerst marginaler Prozentsatz der bestrahlten Zellen Apoptoseereignisse zeigt, steht auch im Einklang mit den Ergebnissen der Caspase-3-

Untersuchungen (Abbildung 3.11. B). Hier zeigt sich bei den bestrahlten Zellen keine nennenswerte Steigerung der Proteinexpression des Apoptosemarkers im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen.

3.4.1 Untersuchung der Induktion des Apoptose-assoziierten Proteins P53

Ein wichtiges Zellzyklus-regulierendes und Apoptose-auslösendes Protein ist der Tumorsuppressor P53. Es reagiert auf DNA-Schäden, indem es den Zellzyklus stoppt und Reparaturmechanismen einleitet, bis eine Reparatur erfolgt ist. In irreparablen Fällen ist es an der Induktion von Apoptose maßgeblich beteiligt. P53 wird bei der Apoptoseinduktion posttranslational aktiviert, indem es phosphoryliert und damit stabilisiert wird. In dem folgenden Experiment wurde das Protein in den K422 Zellen sowie in den primären CD19+ Zellen im Western Blot untersucht. Die nachstehende Abbildung zeigt die Ergebnisse der P53-Western Blot-Analysen.



Abbildung 3.12. Western Blot-Analyse von P53 in der K422 Zell-Linie und in primären CD19+ Zellen. A: K422 Zellen; Neben der Kontroll- und den bestrahlten Proben wurde weiterhin Protein der Bronchialkarzinomzell-Linien H1299 (P53 defizient) und T47D (konstitutiv exprimiertes P53) aufgetragen, die als Negativ- bzw. als Positivkontrollen dienten. **B:** Primäre CD19+ Zellen; als Positivkontrolle dienten mittels des Zytostatikums *Cisplatin (Cis)* in Apoptose geschickte CD19+ Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in beiden betrachteten Zelltypen keine Induktion des Tumorsuppressorproteins P53 nach Bestrahlung beobachtet werden konnte, in den primären CD19+ Zellen wurde dies aber mit Hilfe des Zytostatikums *Cisplatin* erreicht. In allen Proben war das als interne Kontrolle mitgeführte Protein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) eindeutig nachzuweisen (Abbildung 3.12. A und B). Die Tatsache, dass im Gegensatz zu den primären Zellen bei der K422 Zell-Linie mit Hilfe unterschiedlicher Apoptose-induzierender Agenzien keine P53-Induktion erreicht werden konnte, welche dann als Positivkontrolle hätten dienen können, warf im Laufe der Arbeit die Frage auf, ob diese Zell-Linie überhaupt in der Lage ist, dieses Protein zu exprimieren. Aus diesem Grund wurde die cDNA des *P53*-Gens sequenziert und ihre Sequenz auf mögliche Mutationen hin untersucht. Die Sequenzanalyse zeigte eine Punktmutation am Lysin der Position 319, an der die Transversion AAG \rightarrow UAG gefunden wurde (Abbildung 3.13.). Aus dieser Transversion resultiert ein Stoppcodon, aufgrund dessen ein verkürztes Proteinprodukt entsteht, welches nicht funktionell ist. Die entsprechenden verkürzten Produkte des Proteins sind im Western Blot äußerst schwach, am besten jedoch in der zweiten und dritten Spur (100 µCi, 46 Min. und 100 µCi, 24 Std.; Abbildung 3.12. A) zu erkennen. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigt Abbildung 3.13.



Abbildung 3.13. Sequenzierung der P53 cDNA. Im Sequenzierungsergebnis der K422-Zellen ist an der Position 319 eine Punktmutation aufgetreten, in deren Folge das Codon AAG (Lysin) in ein Stoppcodon (T/UAG) umgewandelt worden ist. Der untere Abschnitt zeigt einen Ausschnitt der Wildtyp- (Wt) Sequenz. Die entsprechenden Codons sind in den Sequenzen rot gekennzeichnet.

Durch die Einführung des Stoppcodons ist somit eine P53-abhängige Apoptose in den untersuchten K422-Zellen nicht möglich. Diese Tatsache könnte auch erklären, warum durchflusszytometrisch keine Apoptose festgestellt werden konnte.

3.5 Qualitativer Nachweis von DNA-Schäden

Sowohl die Affymetrixanalyse als auch die Verifizierung über quantitative "Real-Time"-PCR haben gezeigt, dass Gene, deren Produkte mit der DNA-Reparatur assoziiert sind, nach einer Expositionszeit von 24 Stunden signifikant hochreguliert sind. DNA-Reparatur findet, wie auch die DNA-Replikation, im Kontext mit Chromatinmodifikationen statt, die häufig mit Veränderungen von Histonen einhergehen. Zu deren Veränderungen zählen u.a. Acetylierung von Lysinen, Methylierung von Lysin- und Arginin- und die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten. In höheren Eukaryoten findet man das Histonprotein H2AX, welches eine Variante des Proteins H2A darstellt und das als Antwort auf DNA-Schäden an einem

sogenannten SQ-Motiv am Serin 139 phosphoryliert wird [Rogakou *et al.*, 1998]. Die Phosphorylierung von H2AX, welches im phosphorylierten Zustand als γ H2AX bezeichnet wird, stellt einen relativ frühen Schritt bei der Antwort auf DNA-Schäden, insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen, dar. Zur qualitativen Analyse von Alphastrahlung-induzierten DNA-Schäden wurde γ H2AX immunzytochemisch mit Hilfe von Immunfluoreszenz untersucht. Für die Analyse wurden die bestrahlten bzw. unbestrahlten K422 und CD19+ Zellen auf Objektträgern fixiert und permeabilisiert (vgl. 2.18.1). Anschließend wurden die γ H2AX-Histonproteine im Zellkern mit einem geeigneten fluorochrom-konjugierten phosporspezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33342 gegengefärbt. Die Ergebnisse der Färbungen sind in den nachstehenden Abbildungen dargestellt.



Abbildung 3.14. Nachweis von γ H2AX positiven Zellen (mittlere Spalte) und Gegenfärbung mit Hoechst 33342 (linke Spalte). Die Zellen wurden dem Alphastrahler 46 Minuten exponiert. In der rechten Spalte ist zusätzlich die Überlagerung beider Färbungen dargestellt. Es wurden unter dem Mikroskop jeweils 4 Sichtfelder ausgezählt und der prozentuale Anteil γ H2AX positiver Zellen ermittelt.



Abbildung 3.15. wie Abbildung 3.14., jedoch von γ H2AX positiven Zellen nach einer Expositionszeit von 24 Stunden. Zusätzlich sind exemplarisch Ausschnittsvergrößerungen von mit 100 bzw. 200 µCi bestrahlten, γ H2AX gefärbten Zellen dargestellt.



Abbildung 3.16. wie vorherige Abbildungen, jedoch von γ H2AX positiven CD19+ Zellen nach einer Expositionszeit von 46 Minuten.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigen keine nennenswerte Färbung des phosphorylierten Histonproteins γ H2AX. Der prozentuale Anteil γ H2AX positiver K422 Zellen von 1,92% (vgl. Abbildung 3.14.) ist weitaus geringer als bei den bestrahlten Zellen und ist wahrscheinlich das Resultat einer geringen Basisexpression bzw. Phosphorylierung dieses Proteins aufgrund von DNA-Schäden, die im Rahmen des normalen Wachstums der Zellen auftreten. Die mit ²¹³Bi-CD20 bestrahlten Zellen zeigen unabhängig von der verwendeten Aktivität und Bestrahlungsdauer eine im Gegensatz zu den unbestrahlten Zellen starke γ H2AX-Färbung, was für eine massive Zunahme von DNA-Schäden bzw. DNA-Doppelstrangbrüchen spricht. Der Anteil an durch die Alphastrahlung offensichtlich geschädigten K422 Zellen bzw. deren DNA ist mit 82,8% bzw. 78,5% für 46 Minuten und 75,8% bzw. 83,1% für 24 Stunden sehr ähnlich (Abbildung 3.14. und 3.15.), daher ist die Induktion von Strangbrüchen weder aktivitäts- noch zeitabhängig.

Bei den primären CD19+ Zellen ist der prozentuale Anteil γ H2AX positiver unbestrahlter Zellen mit 16% etwas höher (Abbildung 3.16.) als bei den unbehandelten K422 Zellen, was eventuell durch die während der Selektion auftretenden mechanischen Belastungen und des

damit verbundenen zellulären Stresses erklärt werden könnte. Mit 51% bzw. 66,9% liegt der prozentuale Anteil von γH2AX positiven CD19+ Zellen nach Bestrahlung unter dem der untersuchten K422 Zellen.

Ein signifikanter Rückgang und damit eine mögliche Reparatur der Schäden, erkennbar durch eine verminderte γ H2AX-Färbung, ist nach 24 Stunden im Falle der K422 Zellen nicht zu beobachten. Eine Einleitung der DNA-Reparatur ist aus diesen Daten ebenfalls nicht ersichtlich, allerdings können aus den Arraydaten aufgrund der Hochregulation von entsprechenden Reparaturgenen (vgl. 3.1.4.1) Hinweise gewonnen werden, dass DNA-Schäden erkannt wurden.

3.6 Klonogenes Zellwachstum und Viabilität

In vorangegangenen Experimenten (vgl. 3.3) wurde ein strahlungsinduzierter Arrest in der Soder G2-Phase des Zellzyklus vermutet, aufgrund dessen ein Proliferationsstopp der Zellen resultieren könnte. Die Hypothese des Zellzyklusarrests könnte weiterhin durch die Tatsache bestätigt werden, dass strahlungsinduzierte DNA-Schäden beobachtet wurden, die im Rahmen eines Proliferationsstopps repariert werden könnten. Um einen solchen Stillstand zu untersuchen, wurde die Fähigkeit der bestrahlten Zellen zu einer fortlaufenden Zellproliferation anhand der Bildung von Kolonien mit Hilfe des Colony forming assays untersucht. Die bestrahlten K422 Zellen wurden für die Proliferationsanalyse in einem semisoliden Methylzellulosemedium inkubiert. Durch die Viskosität des Mediums wird während der Zellproliferation eine Wanderung der Zellen stark inhibiert. Die aus der Proliferation hervorgehenden Tochterzellen expandieren daher nicht gleichmäßig über die Fläche, sondern bilden Kolonien, die unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden können. Entsprechende Experimente konnten mit den primären CD19+ Zellen nicht durchgeführt werden, da diese zum einen eine Strahlungsexposition von 24 Stunden nicht überlebten und andererseits aufgrund ihrer ausgeprägten Differenzierung nicht mehr proliferierten. Die Uuntersuchungen wurden daher nur an den K422 Zellen durchgeführt. Repräsentative Beispiele der Ergebnisse sind in Abbildung 3.17. dargestellt.



Abbildung 3.17. Lichtmikroskopische Fotos von Kolonien des *Colony forming assays* nach 14 Tagen mit unbestrahlten K422 Zellen und mit Zellen, die eine Halbwertszeit (46 Min.) mit einer Aktivität von 100 μ Ci bestrahlt wurden. Die Bilder wurden jeweils mit einer 50-fachen Vergrößerung aufgenommen.

unbehandelten Die Ergebnisse zeigen. dass die Kontrollzellen eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen, was an der großen Anzahl an Kolonien, die durch die Tochterzellen entstehen, zu erkennen ist. Repräsentativ für alle Bestrahlungsbedingungen zeigt dagegen das zweite Foto ein Ausbleiben des klonogenen Wachstums bereits nach den "schwächsten" Bestrahlungsbedingungen. Sowohl bei der höheren Aktivität als auch nach der längeren Expositionszeit ist ebenfalls keine Koloniebildung zu verzeichnen, was auf eine massive Inhibition des klonogenen Wachstums sowie auf den Untergang der Zellen, vermutlich durch Nekrose und Zellzyklusarrest nach DNA-Schäden, hindeutet.

3.7 Sekretion von Zytokinen

In den Genexpressionsanalysen wurde eine große Anzahl von signifikant hochregulierten Genen gefunden, die eine essentielle Rolle in der Interferon- und in der zellulären Stressantwort spielen (vgl. 3.1.4.6). Die Kommunikation zwischen Zellen, die sich in derartigen Zuständen befinden, findet über Zytokine statt, welche immunologische und wachstumsregulierende Effekte vermitteln und zum Teil proinflammatorische Mediatoren darstellen, die von den Zellen sezerniert werden. Im Rahmen der Genexpressionsanalysen konnten sowohl in der K422-Zell-Linie als auch in den primären CD19+ Zellen einige differentiell regulierte Gene gefunden werden, deren Produkte solche Signalmoleküle darstellen. Um festzustellen, ob die bestrahlten Zellen diese Zytokine auch in einem verstärkten Maße sezernieren und damit Signale an Nachbarzellen weitergeben könnten, wurden mit TNF α , TNFSF10, CCL3, CCL4 und IL8 insgesamt 5 proinflammatorisch wirkende Zytokine ausgewählt und untersucht. Unter Verwendung von ELISA-Analysen

wurden die Konzentrationen dieser Zytokine im Kulturmedium der bestrahlten und unbestrahlten Zellen bestimmt, so dass ein Eindruck gewonnen werden konnte, ob die Zellen diese Signalmoleküle ins Medium sezernieren. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.18. dargestellt.



Abbildung 3.18. Konzentrationsbestimmung der Zytokine TNFa, TNFSF10, CCL3, CCL4 und IL8 im Medium der bestrahlten und unbestrahlten K422 und CD19+ Zellen. Die Signifikanzberechnung erfolgte in Bezug auf die unbehandelten Kontrollproben.

Die mit dem Radioimmunkonjugat ²¹³Bi-CD20 für 24 Stunden inkubierten K422 Zellen zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen für alle untersuchten Zytokine eine Erhöhung der Konzentration im Medium, wobei dieser Effekt am stärksten bei CCL3 und CCL4 festzustellen ist. Eine Konzentrationserhöhung von TNF α , CCL4 und IL8 im Medium ist auch bei den K422 Zellen zu finden, die dem Alphastrahler nur 46 Minuten lang ausgesetzt waren. Bei TNFSF10 ist dagegen keine signifikante Veränderung nachweisbar.

Bei den primären CD19+ Zellen zeigen die im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen mit der niedrigeren Aktivität bestrahlten Zellen eine verstärkte Sekretion von $TNF\alpha$, TNFSF10 und IL8. Nur bei TNFα ist auch bei den mit 200 µCi bestrahlten CD19+ Zellen eine gesteigerte Konzentration des Zytokins im Medium feststellbar. Obwohl in den Genexpressionsanalysen der K422 Zellen keine differentielle Regulation von IL8 gefunden wurde, zeigt das Protein in den 24 Stunden inkubierten Zellen eine Konzentrationserhöhung im Medium. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Betrachtung von TNFSF10, welches seinerseits in den CD19+ Zellen nicht differentiell reguliert vorliegt, aber dennoch nach einer Bestrahlung der Zellen von 100 µCi eine Konzentrationserhöhung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen aufweist. CCL3 und CCL4 zeigen in den Genexpressionsdaten der primären CD19+ Zellen schwache bis grenzwertige fold changes, die sich in den im Vergleich zu den unbestrahlten CD19+ Kontrollzellen niedrigen Zytokinkonzentrationen im Medium der bestrahlten Zellen widerspiegeln. Ein auffallendes Ergebnis ist weiterhin, dass die gemessenen Zytokinkonzentrationen bei der höheren Aktivität von 200 µCi in einigen Fällen geringer ist als bei 100 µCi. Dies trifft vor allem auf die primären CD19+ Zellen, in einigen Fällen (TNFα, TNFSF10 und CCL4) auch auf die bestrahlten K422 Zellen zu und ist vermutlich das Resultat einer fortgeschrittenen Zellschädigung aufgrund der höheren applizierten Aktivität.

3.8 Genomweite Methylierungsveränderungen

Zur Erfassung von genomweiten Methylierungsveränderungen, die eventuell durch die Bestrahlung hervorgerufen werden konnten, diente der "Cytosin Extension Assay". Mit diesem Assay kann der Methylierungszustand der DNA der unterschiedlich behandelten Proben anhand von CpG-Dinukleotiden, die sich in den Erkennungssequenzen von Hpa II bzw. seinem Isoschizomer Msp I befinden, untersucht werden. Die Methylierungsanalyse wurde nach einem modifizierten Protokoll von Pogribny *et al.* [2004] durchgeführt. Diese Gruppe hat bereits Methylierungsveränderungen in Mauszellen beobachtet, nachdem diese mit Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, so dass sich hier die Frage stellte, ob es nach einer Behandlung mit Alphastrahlen zu einem vergleichbaren Effekt kommt. Der ermittelte Methylierungszustand der unbehandelten Kontrollproben wurde als 100% definiert und fungierte als Referenz, während die Veränderungen aller anderen Proben in Bezug zu dieser Referenz gesetzt wurden. Die Ergebnisse der genomweiten Methylierungsmessungen sind im nachstehenden Balkendiagramm (Abbildung 3.19.) dargestellt.



Abbildung 3.19. Methylierungsveränderungen der untersuchten K422 Zellen und der primären CD19+ Zellen. Die Veränderungen wurden jeweils in Bezug zu den unbehandelten Kontrollproben gesetzt, deren Methylierungsstatus als 100% definiert wurde. Die Signifikanzen wurden in Bezug auf die unbehandelten Proben berechnet.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ist bei allen bestrahlten K422-Proben eine signifikante Verringerung des genomweiten Methylierungsstatus nachzuweisen. Die DNA-Methylierung der bestrahlten Proben schwankt zwischen Werten von 72% (200 μ Ci, 24 Stunden) und 77,2% (200 μ Ci, 46 Minuten), was einer Reduktion der Methylierung von 28% bis 22,8% gegenüber der unbehandelten Kontrolle entspricht. Im Mittel beträgt der Methylierungsstatus aller bestrahlten Proben der K422 Zellen 74,1%, bzw. deren Methylierungsveränderung 25,9%. Eine signifikante Zeit- oder Aktivitätsabhängigkeit der Methylierungsveränderung ist nicht nachzuweisen.

Im Gegensatz zu den untersuchten K422 Zellen zeigen die primären CD19+ B-Zellen nach Bestrahlung mit dem ²¹³Bi-CD20 Immunkonjugat keine signifikanten Abweichungen in der DNA-Methylierung. Der Methylierungsstatus der untersuchten Proben bewegt sich in einem Bereich zwischen 92,2% und 91,7% und zeigt damit im Vergleich zu den K422 Zellen nur sehr marginale Veränderungen.

4 **DISKUSSION**

In den letzten Jahren ist das Interesse an der biologischen Wirkungsweise von Alphastrahlung zunehmend größer geworden. Der Grund dafür ist sicherlich darin zu sehen, dass Alphastrahler aufgrund verbesserter radiochemischer Verfahren in einer hohen Reinheit und mit ausreichender Aktivität herzustellen und für biologische Experimente adäquat einsetzbar sind. Die Wirkung von freier Alphastrahlung auf biologische Systeme wurde weitgehend in verschiedenen Tiermodellen und Zell-Linien hinsichtlich Proliferation, veränderter Wachstumskinetiken, Überlebensfähigkeit und DNA-Schäden untersucht [Kubota et al., 1997; Lorimore et al., 1998; Kadhim et al., 1998; Prise et al., 1998]. Die Tatsache, dass Alphastrahler mittlerweile in Form von Radioimmunkonjugaten im Rahmen präklinischer Studien Einzug in die Krebsforschung erhalten konnten [Couturier et al., 1999; Jurcic et al., 2001, 2002; Huber et al., 2003; Vandenbulcke et al., 2003] und damit verbunden der Anstieg potentieller therapeutischer Anwendungen, macht die detaillierte Untersuchung der zellulären und molekularen Wirkungsmechanismen notwendig. Eine Erkrankung, an der die Wirkung von Radioimmunkonjugaten in präklinischen und klinischen Studien untersucht wird, ist das maligne Non-Hodgkin-Lymphom. Daher wurde in dieser Arbeit die biologische Wirkung von Alphastrahlung eines Bismut-213-CD20 Radioimmunkonjugates an der humanen B-Lymphomzell-Linie K422 sowie an normalen humanen B-Zellen auf molekularer Ebene mit Hilfe von Genexpressionsanalysen und auf funktioneller Ebene untersucht.

4.1 Durch Alphastrahlung induzierte funktionelle Veränderungen

Mit Hilfe der Genexpressionsanalysen konnte ein Einblick in die transkriptionellen Veränderungen der B-Zell-Lymphomzell-Linie K422 und von immunmagnetisch selektierten, primären CD19+ B-Zellen nach Alphabestrahlung mit dem ²¹³Bi-CD20-Konjugat gewonnen werden. In beiden untersuchten Zelltypen wurde nach einer Bestrahlungsdauer von nur 46 Minuten eine geringe Anzahl von differentiell regulierten Genen bei beiden applizierten Aktivitäten nachgewiesen. Im Gegensatz zu der Zell-Linie, bei der eine weitaus größere Anzahl an deregulierten Genen nach 24 Stunden Bestrahlungsdauer beobachtet wurde, zeigten die primären CD19+ Zellen bei einer Expositionszeit von 24 Stunden kein Überleben. Ob es sich bei 46 Minuten im Falle der primären Zellen bzw. bei 24 Stunden im Falle der K422 Zellen bereits um das zeitliche Limit der Bestrahlung handelt, bei dem ein Überleben der Zellen noch möglich ist, ist unklar, da nur diese beiden Expositionszeiten betrachtet und

Überlebenskinetiken mit steigenden Expositionszeiten weder bei den K422 Zellen noch bei den CD19+ Zellen durchgeführt wurden.

Eine funktionelle Gruppierung der gefundenen differentiell regulierten Gene in beiden betrachteten Zelltypen erleichterte den Überblick und diente als Basis für die folgenden Betrachtungen von funktionellen Interaktionen der gefundenen Gene bzw. zellulären Pathways, die als Antwort auf Alphabestrahlung aktiviert sein könnten. Für die K422 Zellen werden nachfolgend nur nach 24 Stunden deregulierte Gene diskutiert, da durch die größere Anzahl umfangreichere Zusammenhänge der betrachteten Gene erkennbar werden.

4.1.1 Transkriptionelle Aktivierung der DNA-Reparatur bei K422 Zellen

Die Erkennung von DNA-Schäden, insbesondere von Doppelstrangbrüchen und einer sofortigen Induktion der DNA-Reparatur, stellt einen der wichtigsten zellulären Prozesse nach Exposition von Zellen mit ionisierender Strahlung dar [Ward, 1981; Jackson, 2002; Willers et al., 2004]. Sie geht einher mit der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX [Rogakou et al., 1998; Friesner et al., 2005; Foster et al., 2005], welche in höheren Eukaryoten eine frühe Antwort auf DNA-Schäden und einen konservierten Mechanismus in der DNA-Reparatur darstellt. Transkriptionell konnte die Induktion der DNA-Reparatur über die Genexpressionsanalysen durch die Microarrays nachgewiesen und über quantitative "Real-Time"-PCR für die vier Gene BRCA1, FANCG, MSH2 und RAD51 bestätigt werden. Konsistent mit der DNA-Reparatur konnten strahlungsinduzierte DNA-Schäden, speziell DNA Doppelstrangbrüche, anhand des Histonproteins yH2AX nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.14.und 3.15.). Interessanterweise zeigt von allen differentiell hochregulierten DNA-Reparaturgenen nur das Gen BRCA1 einen fold change-Wert von über 2. In einer Studie von Wang et al. [2000] konnte gezeigt werden, dass BRCA1 im Rahmen der DNA-Reparatur mit einer Reihe von anderen DNA-assoziierten (Reparatur-) Proteinen in einem großen Komplex vorliegt. Dieser sog. BASC- (BRCA1-associated genome surveillance complex) Komplex spielt für die Erkennung und Reparatur von aberranten DNA-Strukturen eine essentielle Rolle, wobei BRCA1 die Funktionen der für die Reparaturmechanismen spezialisierten Subkomplexe reguliert und damit nicht selbst als aktives Reparaturprotein, sondern als ein Koordinator der DNA-Reparatur agiert. In den Genexpressionsanalysen finden sich eine Reihe dieser BRCA1-assoziierten Gene bzw. deren Proteine des BASC-Komplexes wieder, was auf eine Induktion zumindest eines Teils dieses Komplexes hindeutet. In der folgenden Abbildung ist dieser schematisch mit den assoziierten Proteinen und im Zusammenhang mit yH2AX dargestellt.



Abbildung 4.1. Vereinfachte Darstellung des BASC (<u>BRCA1-associated genome surveillance complex</u>) – Komplexes und die in den bestrahlten K422 Zellen deregulierten Gene. Das zentrale Protein BRCA1 wird von der Checkpoint-Kinase ATM, die zusammen mit ATR auch H2AX phosphoryliert, durch Phosphorylierung aktiviert und agiert als Koordinator anderer Subkomplexe für die DNA-Reparatur. Rot: in unseren Analysen hochregulierte Gene, grün: H2AX bzw. γ H2AX; blau: nicht in den Arraydaten enthalten/nicht dereguliert. HR = Homologe Rekombination; NHEJ = *Non homologous end joining* (nicht homologe DNA-End-Verknüpfung); ds= doppelsträngig; ss = einzelsträngig; P = Phosphorylierung

Nach vorgeschalteter Detektion durch die RecQ-Typ-Helikase BLM erfolgt die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über homologe Rekombination oder *Non homologous end joining*, was von dem Protein RAD51 bzw. durch den M/R/N-Subkomplex (MRE11-RAD50-NBS1) reguliert wird. H2AX wird durch die Kinasen ATM und ATR phosphoryliert und assoziiert in diesem Zustand an das NBS1-Protein des M/R/N-Komplexes, was eine Akkumulation dieses Komplexes zur Folge hat. Die *Mismatch*-Reparaturgene *MSH2*, *MSH6*, *PSM2* und *MLH1* sowie Replikationsfaktoren (*"replication factor; RFC1, 2, 4, 5"*) die mit *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), einem für die DNA-Replikation und DNA-Reparatur essentiellen Protein interagieren, spielen innerhalb des BASC-Komplexes eine bedeutende Rolle und sind bei der replikationsgekoppelten Reparatur bzw. bei der Reparatur von Einzelsträngen involviert [Wang *et al.*, 2000].

Sowohl die Ergebnisse der γ H2AX-Untersuchungen (vgl. 3.5.) als auch die gefundenen differentiell hochregulierten BASC-assoziierten Gene lassen vermuten, dass durch Alphastrahlung induzierte DNA-Schäden erkannt wurden und eine Induktion der DNA-

Reparatur stattgefunden hat. Angesichts sowohl der vorliegenden Ergebnisse als auch der Ergebnisse anderer Studien, die sich mit Alphastrahlung-induzierten Schäden beschäftigt haben [Frankenberg *et al.*, 1994; Prise *et al.*, 1998; Singleton *et al.*, 2002], ist primär eine Reparatur von Doppelstrangbrüchen vorstellbar, jedoch lässt sich hierbei nicht ausschließen, dass weitere Reparaturmechanismen, wie z.B. replikationsgekoppelte Reparatur oder Reparatur von Einzelstrangbrüchen, stattfinden.

4.1.2 DNA-Reparatur bei CD19+ Zellen

Wie bei den K422 Zellen konnten auch in den primären CD19+ Zellen DNA-Schäden indirekt über den Nachweis von γH2AX beobachtet werden. Eine Aussage, ob alle beobachteten Schäden tatsächlich auf die Behandlung mit Alphastrahlung zurückzuführen sind, lässt sich jedoch schwer treffen, da diese Zellen infolge der immunmagnetischen Selektion und der Zentrifugation auf die Objektträger hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, die wahrscheinlich ihrerseits zu Strangbrüchen oder anderen aberranten DNA-Strukturen führen. Die im Vergleich zu den untersuchten K422 Zellen höhere Anzahl an γH2AX positiven unbehandelten CD19+ Zellen würden diese Vermutung zum Teil bestätigen. Um diese Problematik zu umgehen, müssten für solche Experimente Zellkultursysteme etabliert werden, in welchen die frisch selektierten Zellen zunächst ungestört DNA-Reparaturereignisse vollziehen könnten, bevor man mit den eigentlichen Bestrahlungsexperimenten fortfahren kann.

Die Genexpressionsanalysen der primären CD19+ Zellen zeigen mit *TDG (thymine-DNA glycosylase)* nur ein Gen der DNA-Reparatur, welches speziell in der Basen-Exzisions-Reparatur involviert ist. Obwohl sich dieses mit einem *fold change*-Wert von 1,42 an der unteren Grenze der *fold change*-Kriterien bewegt und damit nicht übermäßig hochreguliert ist, korreliert dieses Ergebnis doch mit der gefundenen Expression des Zellzyklusregulators *GADD45A* (vgl. 3.1.4.2, Tabelle 3.5.), von dem bekannt ist, dass es im Rahmen eines Zellzyklusarrest Basen-Exzisions-Reparatur induzieren kann [Smith *et al.*, 1994]. Dennoch lässt sich angesichts dieser Ergebnisse keine generelle Aussage über eine bereits erfolgreich induzierte DNA-Reparatur treffen.

Die Abwesenheit (speziell in den CD19+ Zellen) bzw. die niedrigen *fold change*-Werte zahlreicher DNA-Reparaturgene (in K422 Zellen) könnten allerdings auch ein Anzeichen dafür sein, dass schon kleinere Veränderungen in der Expression dieser Gene genügen, um eine ausreichende Funktion zu gewährleisten. Weiterhin könnten die Proteine von manchen

dieser Gene posttranskriptionell, zum Beispiel durch Autophosphorylierung oder proteolytische Spaltung, reguliert und aktiviert werden, wie es beispielsweise bei der DNA-PK gezeigt wurde [Stiff *et al.*, 2004]. Durch die massive Einwirkung der Alphapartikel könnten speziell die CD19+ Zellen aber auch derart stark geschädigt werden, dass Reparaturprozesse physiologisch nicht mehr möglich sind.

Der Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz nur indirekt geführt werden und stellt generell eine eingeschränkte Methode zur Untersuchung von DNA-Schäden dar. Für eine Bestätigung wäre der direkte Nachweis von DSBs sinnvoll (zum Beispiel über den *Random Oligonucleotide-Primed Synthesis ROPS Assay* [Basnakian & James, 1996]). Um einen genaueren Einblick in durch Alphastrahlung induzierte DNA-Läsionen zu erhalten, wären darüber hinaus auch Experimente nötig, die auf den Nachweis von weiteren DNA-Läsionen wie Einzelstrangbrüche, Einzelstrang-*Gaps, Mismatch*-Einbau oder Chromatinveränderungen fokussiert sind. Dies wäre sicherlich auch vor dem Hintergrund wichtig, dass bis jetzt wenig über die Art von DNA-Schäden bekannt ist, die durch Alphastrahlung hervorgerufen werden.

4.1.3 Zellzyklus und Apoptose bei den K422 Zellen

Anhand der Genexpressionsanalysen konnte eine Vielzahl von differentiell regulierten Genen nachgewiesen werden, die in der Regulation des Zellzyklus involviert sind. Mit CCNE2, CCND3, CDK2, CDK4, CDC7, CDC25A, ATR, und RB1 sind dies Gene, deren Produkte in die Regulation der Transition von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus eingreifen, während die Proteine der dereguliert gefundenen Gene CCNA, CDC27, CDC2 und CDC20 bei der Regulation der G2/M-Phase eine Rolle spielen [Sandal, 2002, Kastan & Bartek, 2004]. Die Tatsache, dass eine größere Anzahl G1-S regulierender Gene gefunden wurde und das Ergebnis, dass sich mit CCNE2 (Cyclin E2) ein Hauptregulator für die Progression durch die G1-Phase auf RNA- und Proteinebene massiv hochreguliert zeigte (vgl. Tabelle 3.5., Abbildung 3.9.), gibt einen Hinweis darauf, dass die bestrahlten Zellen nicht in der G1-Phase stoppen, sondern (möglicherweise unkontrolliert) in die S-Phase eintreten. Ein möglicher Eintritt in den Replikationszyklus ließe sich auch damit erklären, dass bei den K422 Zellen, die aufgrund ihrer tumorigenen Transformation höchstwahrscheinlich bereits Defizite in der Zellzykluskontrolle haben, der Rest der verbliebenen Zellzykluskontrolle infolge der Bestrahlung aufgehoben und dadurch ein G1-Arrest übersprungen wird. Diese Annahme wird durch den in den Zellzyklusanalysen beobachteten Rückgang von Zellen in der G1- sowie die Zunahme an Zellen in der S- und G2-Phase (vgl. Abbildung 3.10.) gestützt. Damit könnte die Existenz einer noch funktionierenden G2/M-Kontrolle und eines S-Phase- oder G2/M-Arrests angenommen werden. Hinweise auf einen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus gibt weiterhin die transkriptionelle Hochregulation der replikativen Helikasen MCM (minichromosome maintainance) 3, 5, 6, die bei der Initiation und Elongation eukaryotischer DNA-Replikation beteiligt sind und mit den Produkten von CDC6 und CDC7, die einen "licensing factor" darstellen. Dieser spielt für die Bewegung der Replikationsmaschinerie eine essentielle Rolle [Tuteja & Tuteja, 2004]. Die ebenfalls hochregulierten und an der DNA-Replikation beteiligten Gene RFC (replication factor) 1, 2, 4, 5, RPA (replication protein A) 1, 2, 3 und ORC (origin recognition complex) 1L, 3L, 6L sowie einige Gene für replikations-essentielle Enzyme, wie Polymerasen (POLA, POLE2, POLQ), Primase (PRIM1),und Ribonukleotidreduktase (RRM1, RRM2) würden die Vermutung festigen, dass ein Eintritt in die S-Phase stattfindet. Eine Zusammenstellung der wichtigsten in den Genexpressionsanalysen gefundenen Zellzyklusgene ist in der folgenden Abbildung 4.2. gezeigt. Die Genprodukte sind entsprechend ihres Auftretens in den jeweiligen Zellzyklusphasen dargestellt.



Abbildung 4.2. Vereinfachte Darstellung der in den bestrahlten K422 Zellen differentiell regulierten Gene und deren Zuordnung zu einer Zellzyklusphase. Durch wachstumsfördernde Signale phosphorylieren Komplexe aus Cyclin E-CDK2 und Cyclin D-CDK4 den Zellzyklusregulator RB1, was zur Transkription von S-Phasegenen und letztendlich zum Übergang in die S-Phase führt. Die DNA-Synthese in der S-Phase wird durch Enzyme wie Polymerasen (POLA, POLE), Primase (PRIM) und Ribonukleotidreduktase (RRM1; RRM2) sowie von einer Reihe von unterschiedlichen Hilfsfaktoren (MCM, ORC, PCNA, RFC, RPA, CDC6, CDC7, CDC45L) ermöglicht.

DNA-Schäden aktivieren unter anderem die Checkpointkinase ATR, welche über die Inhibition von CDC25A die Aktivität des Cyclin E-CDK2-Komplex verhindert. Die Phosphorylierung und Stabilisierung von P53 durch ATR resultiert in der transkriptionellen Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) GADD45A, P21^{KIP1} und P27^{KIP1} (blau dargestellt; differentiell reguliert nur in den CD19+ Zellen; siehe unten), die ihrerseits u.a. durch Inhibition des Cyclin E-CDK2-Komplex die Progression in die S-Phase verhindern. Farbkodierung siehe Abb. 4.1.

Die Vermutung des S- oder G2/M-Phasearrests sowie eine Reihe von in den Genexpressionsdaten gefundenen antiproliferativ wirkenden IFN-stimulierten Genen (vgl. Tabelle 3.10.) steht auch im Einklang mit dem vollständigen Erliegen des klonogenen Wachstums, das in dem *Colony Forming-Assay* (siehe Abbildung 3.17.) beobachtet wurde.

Es ist allerdings unklar, durch welchen Mechanismus die bestrahlten Zellen letztendlich ihre Wachstumsfähigkeit verlieren, wenngleich in der Literatur zahlreiche Studien über strahlungsinduzierten Zellzyklusarrest, Proliferationsinhibition und Apoptose zu finden sind [Mazumder *et al.*, 2000; Bartek & Lukas, 2001; McBride *et al.*, 2003; Pervan *et al.*, 2005; Rodningen *et al.*, 2005].

In diesem Zusammenhang könnte die Hochregulation des zuvor im Rahmen der DNA-Reparatur erwähnten Gens *BRCA1* eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass das Produkt von *BRCA1* auch multiple Funktionen in der Regulation aller Phasen des Zellzyklus übernimmt. So konnten Somasundaram *et al.* [1997] zeigen, dass BRCA1 durch transkriptionelle Aktivierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors (CKI) P21^{KIP1} essentiell zu G1-S Zellzyklusarrest-Situationen beiträgt, während in einer Studie von Williamson *et al.* [2002] eine BRCA1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung des CKIs P27^{KIP1} postuliert wurde, was mit einem S-Phase-Arrest einhergeht. Im Rahmen der G2/M-Kontrolle wird das für die G2-Phase essentielle Cyclin B von BRCA1 transkriptionell reprimiert [MacLachlan *et al.*, 2000b] und der Zellzyklusregulator GADD45 transkriptionell aktiviert, was in einem G2/M-Arrest resultiert. Da eine differentielle Regulation der Gene *P21^{KIP1}*, *P27^{KIP1}* und *GADD45* in den K422 Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, sind die genannten Interaktionen in diesem konkreten Fall fraglich, zumal nicht sicher ist, ob die betrachteten Zellen noch über funktionsfähige Proteine der oben genannten Zellzyklusregulatoren verfügen.

Obwohl BRCA1 auch die transkriptionelle Aktivität und die Stabilisierung des Apoptoseassoziierten Proteins P53 moduliert und stimuliert [MacLachlan et al., 2000a], konnte strahlungsinduzierte Apoptose der K422 Zellen nicht nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.11). Der Umstand, dass im Verlauf dieser Arbeit ein Stoppkodon in der P53 mRNA und damit ein verkürztes und funktionsunfähiges P53 Protein nachgewiesen wurde, stellt sicherlich eine Ursache für diese Beobachtung dar. Unter normalen Umständen ist stabilisiertes und aktiviertes Wildtyp-P53 essentiell für die de-novo Synthese des CKIs P21^{KIP1} [Bartek & Lukas, 2001], welches seinerseits die Inhibition des Cyclin E-CDK2-Komplexes aufrecht erhält und damit in einem G1-Stopp und in der Apoptose involviert ist (siehe Abbildung 4.2.). Das Ausbleiben der transkriptionellen Aktivierung von P21^{KIP1} ist damit höchstwahrscheinlich auf das funktionsunfähige P53 Protein zurückzuführen, wodurch letztendlich der fehlende G1-Arrest resultiert. Als alleinige Erklärung ist dies jedoch nicht ausreichend, insbesondere vor dem Hintergrund, dass P53-abhängige sowie P53-unabhängige Apoptose auch durch die Induktion von Cyclin E aufgrund von genotoxischem Stress in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnte [Mazumder et al., 2000]. Außerdem konnte eine geringe Anzahl von differentiell regulierten Genen gefunden werden, die sowohl in der zellulären als auch in der mitochondrialen Apoptose eine Rolle spielen (vgl. Tabelle 3.7.). Die Tatsache, dass keine Überexpression des proapoptotischen Proteins Caspase-3 nachgewiesen wurde und dass sich die meisten Zellen sowohl für den Nekrosemarker Propidiumiodid als auch für den Apoptosemarker Annexin V (doppelt) positiv zeigten, lässt vermuten, dass die bestrahlten Zellen nicht durch Apoptose absterben, sondern eher nekrotischen Charakter aufweisen. Die Doppelfärbung der Zellen könnte letztendlich das Resultat einer massiven Schädigung der Zellmembranen durch die Einwirkung der Alphapartikel darstellen, was dazu führt, dass zum einen Propidiumiodid ungehindert in die Zellen eindringen und zum anderen auch das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) der inneren Membranschicht durch Annexin V detektiert werden kann.

4.1.4 Transkriptionelle Veränderung in Genen des Zellzyklus bei den primären CD19+ Zellen

Mit den Zellzyklusregulatoren CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor1A / P21^{KIP1}), CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor1B / P27^{KIP1}) und GADD45A (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 45) sind drei essentielle Gene differentiell reguliert, deren Produkte im Rahmen oxidativer Stressantwort bzw. strahlungsinduzierter DNA-Schädigungen durch Bindung von Cyclinen, CDKs und PCNA eine Verzögerung oder einen Arrest in der G1- oder in der G2/M-Phase des Zellzyklus induzieren [Hershenson, 2003; Belletti et al., 2005; Papathanasiou et al., 1991; Sandal, 2002]. Die transkriptionelle Hochregulation von CDKN1A und GADD45A stellt daher angesichts der strahlungsinduzierten zellulären Schäden keine Überraschung dar und lässt einen möglichen Arrest oder zumindest eine Verzögerung der Zellzyklusprogression vermuten, was mit den in der Literatur gefundenen Daten im Einklang steht. Weil der mRNA-Level von P27KIP1 gewöhnlich konstant ist und die Regulation dieses Proteins normalerweise durch posttranslationale Mechanismen erfolgt [Pagano et al., 1995], stellt dessen gefundene transkriptionelle Herabregulation dagegen im Hinblick auf die Induktion eines Zellzyklusstopps ein unerwartetes Ergebnis dar. Dieses wird jedoch insofern relativiert, als dass eine rapide Senkung des mRNA-Levels von P27KIP1 ausschließlich bei der Aktivierung von ruhenden T-Lymphozyten beschrieben wurde [Cordon-Cardo, 1998]. In B-Lymphozyten, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, wurde ein solches Phänomen noch nicht beschrieben. Angesichts ihrer gemeinsamen Vorläuferzellen und damit ihrer Verwandtschaft wäre eine solche Reaktion vorstellbar, zumal Anzeichen einer spezifischen Aktivierung auch anhand der Sezernierung von Zytokinen gezeigt werden konnten (siehe 3.7.).

Wie bei den bestrahlten K422 Zellen konnte auch bei den primären B-Zellen kein Anhaltspunkt auf eine gesteigerte P53-Expression gefunden werden. In Ermangelung weiterer detaillierter Apoptoseuntersuchungen kann hier nur vermutet werden, dass die Bestrahlungsdauer zu kurz war, um eine P53-abhängige Apoptose zu induzieren, zumal ein solches Phänomen mit dem Zytostatikum *Cisplatin* (vgl. Abbildung 3.12.) hervorgerufen werden konnte. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Toxizität des Alphastrahlers nach 46 Minuten wesentlich massiver war als die 4-stündige Inkubation mit *Cisplatin* und die bestrahlten Zellen physiologisch aufgrund der massiven Schäden nicht mehr in der Lage waren, P53-abhängige Apoptose zu induzieren.

4.1.5 Aktivierung des proteolytischen Abbaus durch 26S Proteasomen bei den K422 Zellen

Der grundlegende zelluläre Mechanismus, um die korrekte Konzentration und die Qualität von intrazellulären Proteinen zu gewährleisten, stellt die Ubiquitin-abhängige bzw. die Ubiquitin-unabhängige Degradation von fehlgefalteten oder beschädigten Polypeptiden durch 26S bzw. 20S Proteasomen dar [2002; Goldberg, 2003; Asher et al., 2006]. Von den insgesamt 25 hochregulierten Genen kodieren 16 für verschiedene Untereinheiten der 26S Proteasomen. Mit den Genen PSMA2, -3, -4, 5, PSMB2, -5, -8, -9 sind dies α- und β-Untereinheiten, mit PSMC2, -3, -4, -6 weiterhin die kataytischen ATPase-Untereinheiten der Ubiquitin-abhängigen 26S Proteasomenkomplexe. Dies lässt vermuten, dass durch Bestrahlung mit Alphapartikeln die Expression der 26S Proteasomen induziert und damit die Ubiquitin-abhängige Proteindegradation aktiviert wird. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass proteolytischer Abbau durch Proteasomen infolge von Einwirkung ionisierender Strahlung bzw. durch die Bildung von Radikalen und oxidativen Schäden, die aus der Strahlungseinwirkung resultieren, bereits beschrieben wurde [Pervan et al., 2005]. Da jedoch Rahmen funktionellen Experimente bezüglich im dieser Arbeit keine einer strahlungsinduzierten Proteindegradation durchgeführt wurden, müssten diese Vermutungen mit entsprechenden Experimenten verifiziert werden.

Mit der transkriptionellen Aktivierung der Gene für die Untereinheiten *PSMB8*, *PSMB9*, *PSME1* und *PSME2* stellt sich eine interessante Verbindung zur Interferonantwort dar. Diese Gene werden normalerweise transkriptionell durch Interferon γ induziert, wobei die beiden letztgenannten für alternative regulatorische Komponenten von Proteasomen kodieren, die einen aktivierenden Proteinkomplex (PA28) des 20S Proteasoms darstellen [Wang & Maldonado, 2006] und als 11S Komplex oder *Immunoproteasom* bezeichnet werden. In einer Studie von Cascio *et al.* [2002] konnte die Beteiligung dieses PA28-Protasomenkomplexes in der Immunantwort gezeigt werden. Es spielt bei der Vermittlung der MHC Klasse 1

Antigenprozessierung im Rahmen der Antigenpräsentation eine zentrale Rolle [Cascio *et al.*, 2002]. Ob *PSME1* und *PSME2* aufgrund der Strahlungseinwirkung und der damit verbundenen mutmaßlichen Immunantwort, die aus den Genexpressionsdaten abgeleitet wurde (vgl. 3.1.4.6), in diesem Fall tatsächlich immunmodulatorisch aktiv sind, kann aus den vorliegenden Daten nicht entnommen werden, da entsprechende Experimente nicht durchgeführt wurden. Die Hinweise, die aus den Arraydaten gewonnen werden konnten und die Tatsache, dass die untersuchten K422 Zellen ihren Ursprung in antigenpräsentierenden B-Zellen haben, würden eine solche Hypothese zwar zulassen, jedoch stellt sich hier die Frage nach dem Sinn einer solchen Reaktion als mögliche Antwort auf die Behandlung mit Alphastrahlung. Die Tatsache, dass in den CD19+ B-Zellen kein einziges differentiell reguliertes Gen nachgewiesen werden konnte, dessen Produkt mit einer Proteindegradation assoziiert ist, lässt vermuten, dass der beobachtete Effekt entweder das Ergebnis eines für die K422 Zellen im Rahmen der Tumorgenese erworbenen speziellen Verteidigungsmechanismus ist, und/oder dass die CD19+ Zellen aufgrund von zu schweren Läsionen nicht mehr in der Lage waren, eine entsprechende Antwort zu induzieren.

4.1.6 Induktion der oxidativen Stressantwort

ist gewöhnlich die Oxidative Stressantwort auf Wirkung reaktiven von Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species; ROS), wie Superoxiden, Hydroxylradikalen Hydrogenperoxiden zurückzuführen. Aufgrund von Oxidationen biologischer und Makromoleküle, Thiol-Oxidationen speziell bei Proteinen und Peroxidation von Membranlipiden, kommt es zu chemischen und strukturellen Modifikationen von DNA und Proteinen sowie zu Membranschäden und Veränderungen in der Membranpermeabilität [Zimmerman, 1995, Nathan & Singer, 1999], die letztendlich die zellulären Schäden charakterisieren. In den Genexpressionsanalysen konnten in dieser Arbeit einige im Rahmen der zellulären oxidativen Stressantwort beteiligte differentiell regulierte Gene gefunden werden. Die transkriptionelle Aktivierung der Gene Clorf24, DNAJB1 und HSPA1B, deren Produkte Hitzeschockproteine darstellen, lässt sich demnach gut mit den Literaturdaten vereinbaren, da Hitzeschockproteine zumeist unter Extrembedingungen wie hohe Temperaturen, Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung und Osmolarität des umgebenden Mediums, oder bei Exposition mit Strahlung, Schwermetallen oder organischen Substanzen aktiviert werden [Macdonald et al., 2003; Soti et al., 2005]. Sie schützen andere Proteine gegen Aggregation, sind bei der Proteinfaltung und Aufrechterhaltung ihrer Sekundärstruktur beteiligt und beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine durch Proteasomen. Die Produkte dieser Gene gewährleisten damit die Integrität und Intaktheit zellulärer Proteine und die Genexpressionsdaten geben damit einen Hinweis darauf, dass sie, vermutlich zusammen mit den bereits erwähnten Proteasomenuntereinheiten, die Akkumulation von potentiellen oxidativ geschädigten Polypeptiden verhindern. Weitere Reaktionen auf strahlungsinduzierten oxidativen Stress sind anhand der transkriptionellen Aktivierung von HIF1A (hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit) sowie von drei Metallothioneinen (MT1H, MT1X und MT2A) zu beobachten. Die Synthese dieser Metallbindenden Proteine wird durch verstärkte intrazelluläre Präsenz von Metallen wie Kadmium, Quecksilber oder Zink induziert. Desweiteren wird Metallothioneinen eine bedeutende Rolle Metallionen-Homöostase bei der Aufrechterhaltung der und bei der Schwermetalldetoxifikation zugeschrieben [Hall, 2002; Henkel & Krebs, 2004]. Die Tatsache, dass Metallothioneine neben Glukokortikoiden und sog. "anti-cancer agents" auch durch oxidativen Stress induziert werden und wichtige Funktionen als Sauerstoffradikalfänger haben [Sato & Kondoh, 2002], würde einerseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Alphastrahlung untermauern, andererseits gibt sie einen weiteren Hinweis auf die Existenz von oxidativen Schäden. Ungeachtet einer oxidativen Stressantwort könnte die transkriptionelle Aktivierung von Metallothioneinen angesichts der Verwendung des Metalls Bismut auch ein Anzeichen einer reinen "Bismut-213-Metall-Detoxifikation" sein, jedoch wird diese Annahme dadurch relativiert, dass das Bismut-213 nicht in freier Form, sondern in Form des Antikörperkonjugats appliziert wurde. Es liegt dabei nur in unmittelbarer Nähe und außerhalb der Zellen, aber nicht intrazellulär vor. Eine plausible Erklärung für eine aktivierte Metalldetoxifikation wäre, dass während der Herstellung und Aufreinigung des Radioimmunkonjugats freies radioaktives Bismut-213 nicht vollständig von den ²¹³Bi-CD20-Konjugaten getrennt wurde. Freies Bismut könnte daher von den Zellen, möglicherweise infolge von oxidativ generierten Membranschäden aufgenommen werden und derartige Entgiftungsreaktionen auslösen. Eine solche zelluläre Reaktion wäre auch durch Bystander-Effekte zu erklären [Hall, 2003; Suzuki & Tsuruoka, 2004; Nagasawa et al., 2005], infolge derer biologische Effekte auf solche Zellen übertragen werden können, die nicht unmittelbar

Neben zellulären Makromolekülen können strahlungsinduzierte oxidative Schäden in den Mitochondrien auftreten, was in einer Membrandepolarisation und in der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Zellatmung resultiert und mit der Freisetzung von Cytochrom c, der Aktivierung von Caspasen und mit dem Untergang der Zellen durch

mit dem Bismut-213 in Berührung gekommen sind.

Apoptose einhergeht [Nathan *et al.*, 1999]. Ein Indiz für eine mitochondriale oxidative Stressantwort gibt die transkriptionelle Aktivierung von *SOD2*. Es ist bekannt, dass dieses mitochondriale Metalloenzym sehr schnell die Umwandlung von Superoxiden in Hydrogenperoxide katalysieren kann [Macdonald *et al.*, 2003], die anschließend durch weitere Enzyme in Wasser umgewandelt werden.

Die Präsenz von zumeist transkriptionell aktivierten Genen, deren Proteine an der Hitzeschockantwort beteiligt sowie in der Vermeidung und Beseitigung oxidativer Schäden involviert sind, gibt einen Hinweis darauf, dass sich die untersuchten K422 Zellen in Stresszuständen befinden, die durch die Alphastrahlung aufgrund der Bildung von reaktiven radiolytischen Verbindungen induziert werden. Dies stellt ein zu erwartendes Ergebnis dar und steht in Einklang mit einer Reihe von Literaturdaten, in denen Metall- und strahlungsinduzierter oxidativer Stress beschrieben wurde [Valko *et al.*, 2005; McBride *et al.*, 2003; Sato und Kondoh, 2002; Marnet, 2000].

Neben dem Hitzeschock-Gen DNAJB1 konnte in den bestrahlten CD19+ Zellen in nahezu beiden Bestrahlungsbedingungen ausschließlich DUSP-Gene (dual specifity phosphatase) nachgewiesen werden, deren transkriptionelle Aktivierung Rahmen im von Hitzschockantworten bereits gezeigt werden konnte [Lang et al., 2006]. Die Proteine dieser Gene stellen duale Threonin/Tyrosin-Phosphatasen dar, die spezifisch MAP-Kinasen dephosphorylieren und damit inaktivieren. Anhand der Arraydaten könnte in den CD19+ Zellen folglich eine durch oxidativen Stress oder Hitzeschockantwort ausgelöste Inhibition der MAP-Kinasen, welche regulatorische Funktionen in der Karzinogenese, Proliferation, Differenzierung, und Apoptose wahrnehmen [Wang & Dohlman, 2006; Nishimoto & Nishida, 2006], angenommen werden. Konsistent mit den eigenen Daten konnten Jeffrey et al. [2006] in einer umfangreichen Microarrayanalyse mit aktivierten B- T- und Mastzellen, sowie in Makrophagen und dendritischen Zellen eine transkriptionelle Aktivierung von DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5 nachweisen. Diese Feststellung, sowie die eigenen Ergebnisse der Genexpressionsanalysen aus den CD19-B-Zellen lassen den Schluss zu, dass sich hinter den Daten nicht nur eine oxidative Stressantwort verbirgt, sondern auch eine Aktivierung und damit eine gewisse Art von immunologischer Reaktion der B-Zellen.

4.1.7 Transkriptionelle Induktion der Immun- und Interferonantwort in K422 Zellen

Im Gegensatz zu den primären CD19+ B-Zellen konnte in den K422 Zellen eine Reihe von immunmodulatorischen Genen und Interferon- (IFN) stimulierten bzw. regulierten Genen nachgewiesen werden, die nach Bestrahlung mit dem Radioimmunkonjugat Bi-213-CD20 eine signifikante transkriptionelle Deregulation zeigten. Diese Beobachtung, wie auch die Tatsache, dass einige Vertreter dieser Gene die höchsten *fold change*-Werte zeigten, stellt ein unerwartetes Ergebnis dar, zumal erstens strahlungsinduzierte Immun- bzw. Interferonantwort noch nicht beschrieben wurde und zweitens in den Genexpressionsdaten kein Hinweis auf eine transkriptionelle Aktivierung von Interferonen selbst zu finden ist. Interferone repräsentieren Proteine mit antiviraler und antiproliferativer Aktivität, die üblicherweise als Antwort auf Viren und doppelsträngige RNA sowie als zelluläre Schutzmechanismen sezerniert werden [Pestka, 1981, 1981-1982, 2000], wobei zwischen einer Typ I (IFN alpha, beta, tau und omega) und Typ II-Antwort (IFN gamma) unterschieden wird.

Mit der RNA-Doppelstrang-abhängigen, Interferon-induzierten Proteinkinase R (*PRKR/PKR*), dem OAS (2'5'Oligoadenylat Synthetase 1, 2, 3, LIKE) / RNaseL-System und den Genen der MX (Myxovirus) -Proteine scheinen interessanterweise die drei tragenden Säulen der zellulären Interferonantwort und damit drei unterschiedliche IFN-regulierte Pathways aktiviert zu sein. Sie erzeugen über die Inhibition der Translations-Initiation [Meurs *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1994; Thomis *et al.*, 1992] sowie über die Fragmentierung viraler und zellulärer 18S und 28S RNA [Clemens *et al.*, 1978; Eskildsen *et al.*, 2003] einen Translationsblock und Proliferationsinhibition. Angesichts der Beobachtung, dass die bestrahlten K422 Zellen kein klonogenes Wachstum aufwiesen (vgl. Abbildung 3.17.), wäre eine Wachstumsinhibition infolge der Hochregulation dieser Gene denkbar. Gestützt wird diese Vermutung durch die transkriptionelle Aktivierung weiterer Gene wie der Doppelstrang-RNA-abhängigen 3' \rightarrow 5' Exonuklease *ISG20* und anderen antiproliferativ wirkenden Genen, wie *IFIT1, IFITM1* und *IFIT4*.

Die Regulation Interferon-stimulierter Gene (ISGs) wird zum einen durch spezifische Transkriptionsfaktoren (interferon regulatory factors; IRFs) vermittelt, die im Rahmen der Typ I- oder Typ II-IFN-Antwort die Transkription der oben genannten IFN-induzierbaren Gene an bestimmten Promotoren mit ISRE-Sequenzen (interferon stimulating response element) oder GAS-Sequenzen (gamma activating sequence) vermitteln können. Auf der Seite anderen können ISGs auch über STAT-Faktoren der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade im Rahmen von Zellwachstum, Differenzierung sowie bei inflammatorischen und interferonvermittelten Reaktionen transkriptionell aktiviert werden [Schindler & Darnell, 1995; Ihle, 1996; Takeda & Akira, 2000]. Die Hochregulation der Transkriptionsfaktoren IRF1, IRF2, IRF3, IRF7 und ISGF3y sowie STAT1, STAT2 und STAT3 in den Arraydaten und die oben erwähnte transkriptionelle Aktivierung der ISGs legen damit den Schluss nahe, dass bei Bestrahlung mit Alphapartikeln in diesen Zellen immunologische Prozesse in Gang gesetzt werden, welche in ihrer Wirkung offensichtlich einen antiviralen und wachstumshemmenden Charakter aufweisen. Abbildung 4.3. fasst die möglichen molekularen Interaktionen, die in den bestrahlten K422 Zellen zwischen den diskutierten differentiell regulierten Genen stattfinden könnten, zusammen.



Abbildung 4.3. Mögliche molekulare Zusammenhänge zwischen den differentiell regulierten Genen in den bestrahlten K422 Zellen. A: Die normalerweise extrazellulär über die IFN α - bzw. IFN γ -Rezeptoren empfangenen Interferonsignale vermitteln physiologisch die Autophosphorylierung der JAK1/2 und TYK2 Thyrosinkinasen, wodurch die Aktivierung der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade stattfindet. Diese Kaskade könnte auch durch Alphastrahlung aktiviert sein, durch die mit Hilfe von korrespondierenden IRF-Transkriptionsfaktoren die Transkription einer Reihe von Interferon-stimulierten Genen erfolgt. B: Die Expression dieser Gene resultiert möglicherweise in einer Blockierung der zellulären Proteintranslation und/oder in einer Wachstumsinhibition. Rot: hochreguliert; blau: nicht in den Arraydaten enthalten/nicht dereguliert. IFNAR1/2: Interferon α Rezeptor1/2; IFNGR1/2: Interferon γ Rezeptor1/2. ??=detailliertere Zwischenschritte sind nicht bekannt.

Strahlungsinduzierte Immunantwort konnte in den K422 Zellen auf Proteinebene sowohl über den Nachweis vermehrter Zytokinsekretion ins Medium, als auch anhand der erhöhten Proteinexpression der Oberflächenmarker CD1c und CD164 bestätigt werden:

Bis auf TNFSF10 konnte bei allen Zytokinen eine Teil signifikante zum Konzentrationserhöhung Medium beobachtet werden. Die im massivste Konzentrationssteigerung wurde für die 24 Std. bestrahlten K422 Zellen bei CCL3 und CCL4 nachgewiesen. Von diesen Molekülen ist bekannt, dass sie eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von polymorphonukleären Leukozyten und von B- und T-Zellen spielen [Wolpe et al., 1988; Lipes et al., 1988].

Der Nachweis einer gesteigerten Proteinexpression der bereits erwähnten Oberflächenmarker lässt eine Aktivierung der K422 Zellen im Hinblick auf immunologische Effekte vermuten. Die Funktion von CD1c ist nicht vollständig geklärt, jedoch wird eine Rolle in der Antigenpräsentation in B-Zellen vermutet [Blumberg *et al.*, 1995]. CD47 ist wahrscheinlich an der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration infolge von Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix beteiligt. Ferner hat es, ähnlich den MHC-Molekülen, eine "Körpereigen" ("*marker of self*") –definierende Funktion [Oldenborg *et al.*, 2000; van Beek *et al.*, 2005]. Von dem ausschließlich in B-Zellen und B-Lymphomen exprimierten Oberflächenmarker CD79B wurde beschrieben, dass seine Expression der CD20-Expression während der B-Zell-Ontogenese vorausgeht. CD79B stellt einen Marker für die Differentialdiagnose von B-Zell-Neoplasien gegenüber T-Zell-Neoplasien dar [Chu & Arber, 2001].

Angesichts seiner Funktion in der Zelladhäsion und der Zelldifferenzierung [Lee *et al.*, 2001; Zannettino *et al.*, 1998] ist der Grund für eine gesteigerte Proteinexpression des Sialomucins CD164 unklar. Sie könnte dadurch erklärt werden, dass Sialomucine allgemein zytoprotektive Wirkungen haben [Watt *et al.*, 1998] und die hier bestrahlten Zellen mit der Überexpression dieses Moleküls einen weiteren Abwehrmechanismus gegen Strahlung aufbauen. Die massive durch die Arraydaten erfasste und beobachtete Interferon- und Immunantwort ist in diesem Fall eher als ein Zeichen einer generellen Stressantwort und weniger als spezifischer Abwehrmechanismus zu deuten. Sie würde zum einen darauf hinweisen, dass nach Bestrahlung sämtliche zur Verfügung stehende Verteidigungsmechanismen aktiviert werden und zum anderen, dass für derartige Abwehrstrategien auch hochspezialisierte, aber für diese Art von Stress nicht adäquate Mechanismen zum Einsatz kommen.

4.1.8 Immunantwort bei den primären CD19+ Zellen

Im Gegensatz zu der untersuchten Zell-Linie sind bei den primären CD19+ Zellen keine transkriptionellen Veränderungen in IFN-regulierten Genen zu beobachten. Eine detaillierte Analyse etwaiger Zusammenhänge der entsprechenden korrespondierenden Gene konnte daher nicht durchgeführt werden. Hinweise auf immunologische Prozesse dieser Zellen zeigen sich dennoch anhand der oben genannten Zytokinuntersuchungen. Bei den mit 100 μ Ci bestrahlten Zellen sind zwar kleine, aber zum Teil signifikante Konzentrationserhöhungen im Medium zu beobachten, was dafür spricht, dass offensichtlich auch in diesen Zellen gewisse (strahlungsinduzierte) immunologische Reaktionen stattfinden.

Die Daten zeigen eine nach Alphabestrahlung induzierte Immunantwort im Allgemeinen bzw. eine Interferonantwort im Speziellen und stellen damit ein interessantes Ergebnis dar, zumal sich keine vergleichbaren Beispiele in der Literatur finden lassen. Wie oben angedeutet scheint eine zelluläre Interferonantwort, die speziell mit Virusinfektionen assoziiert ist, Ausdruck einer in diesem Falle generellen Stressreaktion zu sein, bei der die bestrahlten Zellen sämtliche ihr zur Verfügung stehenden Stressantwortmechanismen aktivieren, um dadurch ein möglichst breites Spektrum an Abwehrmöglichkeiten zur Verfügung zu haben. Die Induktion der Immun- und Interferonantwort auf die Bestrahlung könnte in diesem Zusammenhang dadurch erklärt werden, dass es sich um Zellen handelt, die ursprünglich von normalen B-Zellen, also von Immunzellen, abstammen. Warum sich dieses Phänomen bei den primären Zellen nicht zeigt, ist unklar. Ein plausibler Grund wäre, dass es sich hierbei nicht um Tumorzellen, also um Zellen handelt, die wahrscheinlich über anders geartete molekulare Schutzmechanismen verfügen. Tumorzellen sind in vielerlei Hinsicht resistenter gegenüber ungünstigen äußeren (physiologischen) Einflüssen. Die betrachteten Tumorzellen verfügen wahrscheinlich über vergleichsweise effektivere Selbstschutzmechanismen als die primären B-Zellen. Angesichts der mechanischen Beanspruchungen während der immunmagnetischen Selektion und der physiologischen Belastungen infolge der Kulturbedingungen ist es auch möglich, dass diese Zellen gar nicht mehr in der Lage sind, diese Art Antwort zu induzieren.

4.1.9 Strahlungsinduzierte genomweite DNA-Demethylierung

Einer der Haupt- und am meisten untersuchten epigenetischen Effekte ist die Methylierung von Cytosinresten in der DNA, welche innerhalb von CpG-Dinukleotiden lokalisiert sind [Jones & Gonzalgo, 1997; Rizwana & Hahn, 1999; Ehrlich, 2002]. Es ist bekannt, dass der

Gehalt an methylierten Desoxycytidinen spezifisch für unterschiedliche Gewebe und Spezies ist [Turker & Bestor, 1997; Kovalchuk et al., 2004] und dass methylierte Desoxycytidine solche Gene stilllegen können, deren Promotoren mit CpG-Inseln assoziiert und die in der Regulation der Proliferation involviert sind [Robertson & Jones, 2000]. Darüber hinaus ist eine aberrante Cytosinmethylierung häufig mit einer Tumorentstehung assoziiert [Gaudet et al., 2003]. Ferner gibt es Hinweise auf den Einfluss von ionisierender Strahlung, speziell von Röntgenstrahlung, auf globale Methylierungsmuster der DNA, wobei insbesondere eine Demethylierung der DNA in bestrahlten Zell-Linien [Kalinich et al., 1998] sowie in der DNA von Milz, Lunge und Leber in Mausmodellen [Kovalchuk et al., 2004; Pogribny et al., 2004] nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf der Basis von früheren Studien ebenfalls genomweite strahlungsinduzierte Methylierungsveränderungen untersucht, wobei in den K422 Zellen nach allen betrachteten Bestrahlungsbedingungen ein signifikanter Rückgang der DNA-Methylierung von im Mittel 25,9% beobachtet werden konnte. Die Beobachtung, dass offensichtlich nicht nur nach Behandlung mit Röntgenstrahlung, sondern auch mit Alphastrahlung, eine signifikante Demethylierung der DNA im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nachzuweisen war, zeigt einerseits die Konsistenz zu anderen in der Literatur beschrieben Untersuchungen, andererseits weist sie darauf hin, dass sich strahlungsinduzierte DNA-Hypomethylierung nicht nur auf ionisierende Wellenstrahlung beschränkt, sondern auch bei Verwendung von dicht-ionisierender Teilchenstrahlung stattfinden kann.

Genomweite DNA-Hypomethylierung wird als ein Zeichen einer Destabilisierung der DNA angesehen, die mit chromosomaler und genomischer Instabilität sowie mit DNA-Schäden und zunehmenden Mutationsraten einher geht [Chen *et al.*, 1998]. Hinweise darauf, dass DNA-Strangbrüche, Uracil-Misseinbau und sogar DNA-Reparatur mit DNA-Hypomethylierung einhergehen, konnten in verschiedenen Studien erbracht werden [Duthie *et al.*; 2000; Pogribny *et al.*; 2004]. Da im Rahmen dieser Arbeit Doppelstrangbrüche anhand des Fluoreszenznachweises von γ H2AX nachgewiesen werden konnten (vgl. 3.5.), ist ein Zusammenhang dieser strahlungsinduzierten DNA-Läsionen mit der beobachteten DNA-Demethylierung denkbar, zumal diese Vermutung dadurch gestützt wird, dass in den Genexpressionsdaten eine transkriptionelle Aktivierung von DNA-Reparaturgenen in den K422 Zellen nachgewiesen werden konnte. Da DNA-Demethylierung in manchen Fällen in einer Aktivierung von Genpromotoren resultiert und damit zur transkriptionellen Aktivierung spezifischer Gene führt, ist zu vermuten, dass ein Teil der in den Genexpressionsanalysen gefundenen hochregulierten Gene nicht primär durch die Alphastrahlung, sondern sekundär

durch die Aktivierung von Promotoren infolge von DNA-Hypomethylierung stattfindet. Im Zusammenhang mit strahlungsinduzierten DNA-Schäden könnten dies auch Gene für die DNA-Reparatur sein. Dies würde jedoch nur auf die 24 Stunden bestrahlten Zellen zutreffen, da DNA-Reparaturgene nach 46 Minuten keine transkriptionelle Aktivierung zeigten.

Ionisierende Strahlung ist ein starkes DNA-schädigendes Agens, das eine Vielzahl von DNA-Läsionen, einschließlich Strangbrüchen, Basenmodifikationen und Kreuzvernetzungen, induziert. Jede dieser Läsion könnte daher direkt oder indirekt durch eine Unterbrechung der Methylierungsmaschinerie zu einer Demethylierung der DNA beitragen. Strangbrüche stellen den Haupttyp von DNA-Schäden dar, die durch ionisierende Strahlung induziert werden [Huang *et al.*, 2003]. Diese hochgradig zytotoxischen Läsionen werden durch homologe Rekombination (entsprechende Gene sind in den Arraydaten hochreguliert, vgl. Tabelle 3.4., Abbildung 4.1.), aber auch durch Basen-Exzisionsreparatur beseitigt. Für beide Reparaturmechanismen ist die Synthese von DNA durch Polymerasen, welche Cytosin, aber kein Methylcytosin einbauen, unabdingbar.

Im Rahmen der DNA-Synthese findet DNA-Demethylierung normalerweise in einer passiven Art und Weise statt, in der Methylgruppen in einer Folge von DNA-Replikationszyklen verloren gehen. Sie geht auch einher mit einer Reduktion von DNA-Methyltransferasen [Turker & Bestor, 1997;]. DNA-Replikations- und DNA-Reparaturgene in den K422 Zellen waren erst nach 24 Stunden hochreguliert, ebenso konnten Zellzyklusveränderungen erst nach dieser Zeit beobachtet werden. Da die gemessene Demethylierung der DNA jedoch auch schon nach 46 Minuten Expositionszeit beobachtet werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass die Methylierungsveränderungen direkt mit Replikation und/oder Reparatur zusammenhängen.

In den primären CD19+ Zellen wurden weder Methylierungsveränderungen der DNA, noch eine transkriptionelle Aktivierung der DNA-Reparatur oder der DNA-Replikation nachgewiesen. Zwar konnten auch in diesen Zellen nach Bestrahlung DNA-Doppelstrangbrüche beobachtet werden, ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen DNA-Demethylierung und strahlungsinduzierten DNA-Läsionen ist hier aber nicht zu verzeichnen. Dies zeigt entweder, dass eine Demethylierung der DNA nicht unbedingt mit DNA-Schäden gekoppelt sein muss, oder dass aufgrund von massiven fortgeschrittenen zellulären Schäden bei den CD19+ Zellen Demethylierung nicht mehr stattfinden kann.

Die Grundlage des "Cytosin-Extension-Assays" stellt die Restriktion der DNA durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym Hpa II an der Sequenz 5'-C \downarrow CGG-3' dar. Wenngleich diese Sequenz statistisch alle 256 Basen zu finden ist und damit relativ oft im Genom vorkommt, können mit dieser Methode nicht alle Methylierungsveränderungen erfasst werden, da sich der "Cytosin-Extension-Assay" ausschließlich auf diese Targetsequenz beschränkt. Der Methylierungsstatus von CpG-Dinukleotiden, die sich in anderen Sequenzen befinden, müsste daher mit anderen Methoden untersucht werden. Da die DNA im Rahmen der DNA-Isolierung in kleinere Fragmente zerlegt wird, ist es demnach wahrscheinlich, dass ebenso in den 5'-C \downarrow CGG-3' Schnittstellen Fragmentierungen auftreten, die so geartet sind, dass ein Nachweis hier nicht mehr stattfinden kann. Insofern kann mit dieser Methodik, obwohl sie reproduzierbare Ergebnisse liefert, nicht der komplette Methylierungstatus der DNA erfasst werden.

4.2 Schlussfolgerung

Anhand der erstellten Genexpressionsprofile in den K422 Zellen konnten differentiell regulierte Gene gefunden werden, die eine zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung widerspiegeln. Die beteiligten, meist hochregulierten Gene sind unter anderem in der DNA-Reparatur, in der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort und im proteolytischen Abbau von Proteinen involviert, was zeigt, dass derartige Reaktionen nicht nur aufgrund von ionisierender Gamma- und Röntgenstrahlung auftreten, wie dies in zahlreichen Studien beschrieben wurde [Dugle et al., 1975; Mazumder et al., 2000; Bartek & Lukas, 2001; McBride et al., 2003; Pervan et al., 2005; Rodningen et al., 2005; Friesner et al., 2005], sondern auch aufgrund von dicht-ionisierender Alphastrahlung. Die meisten transkriptionellen Veränderungen finden erst nach einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden statt. Von den differentiell regulierten Genen findet sich eine signifikante Anzahl an Zellzyklusgenen, von denen der Großteil in der G1-S-Transition beteiligt ist. Die transkriptionelle Aktivierung von G1-S regulierenden Zellzyklusgenen sowie die Zellzyklusanalysen lassen eine Progression durch den Zellzyklus bis in die G2/M-Phase vermuten und geben einen Hinweis auf eine durch die Bestrahlung induzierte Störung der G1-Kontrolle. Möglicherweise lag aufgrund der tumorigenen Transformation der K422 Zellen bereits von vorne herein eine unzureichende Regulation der Zellzykluskontrolle im G1-S-Abschnitt vor. Im Kontext mit dem nicht mehr funktionellen P53-Protein lässt sich somit ableiten, dass durch die Bestrahlung der letzte Rest einer G1-S-Kontrolle eliminiert wurde.

Eine Interferonantwort stellt üblicherweise eine hochspezifische Reaktion auf virale Infektionen dar. Im Zusammenhang mit strahlungsinduzierter Stressantwort und aufgrund der Tatsache, dass eine virale Infektion ausgeschlossen werden kann, ist hier anzunehmen, dass die anhand der Genexpressionsanalysen gefundene Interferonantwort in dem vorliegenden Fall eher als ein Bestandteil sämtlicher verfügbarer Abwehrmechanismen anzusehen ist und weniger als eine spezifische zelluläre Reaktion, wie dies sonst der Fall wäre. Da mit der K422 Zell-Linie tumorigen transformierte Immun- (B-) Zellen betrachtet werden, ist eine Interferonantwort daher nicht überraschend, da sie spezifisch für Immunzellen ist. Eine Interferonantwort würde sicherlich ausbleiben, wenn unter denselben Bestrahlungsbedingungen andere Zellen betrachtet würden, welche keine immunologische Funktion haben.

Der interessanteste Aspekt ist sicherlich, dass die bestrahlten Zellen in der Lage zu sein scheinen, sämtliche ihnen zur Verfügung stehende Abwehr- und Überlebensmechanismen in einer geordneten Art und Weise zu mobilisieren und damit sämtliche lebenserhaltende Maßnahmen zu aktivieren, gleichzeitig aber ohne Beteiligung reiner Apoptose zugrunde gehen.

Die transkriptionellen Antworten der normalen CD19+ Zellen weisen weitgehend generelle Reaktionen auf ionisierende Strahlung auf und folgen den Mustern, die bereits in verschiedenen anderen Zelltypen und Geweben beobachtet wurden. Beispiele hierfür sind die transkriptionelle Aktivierung von Zellzyklus-Inhibitoren, Stress-induzierten Genen und der Nachweis von DNA-Schäden. Dies zeigt, dass nicht nur in Zell-Linien, sondern auch in primären Zellen eine generelle strahlungsinduzierte Antwort sowohl durch ionisierende Wellenstrahlung als auch durch Verwendung von dicht-ionisierender Partikelstrahlung, wie sie hier verwendet wurde, induziert werden kann. Wenngleich sich in den Genexpressionsanalysen kein Anzeichen einer Interferonantwort zeigte, kann jedoch aufgrund der Zytokinexperimente ebenso auf immunologische Aktivitäten geschlossen werden. Dies hängt sicherlich, ähnlich wie bei den K422 Zellen, damit zusammen, dass in diesem Fall normale und gesunde, immunologisch aktive B-Zellen untersucht wurden. Die nachstehende Abbildung 4.4. zeigt eine schematische Übersicht über die im Vorfeld diskutierten transkriptionellen Veränderungen und zellulären Reaktionen beider betrachteten Zelltypen, die nach Behandlung mit Alphastrahlung identifiziert wurden.



In beiden untersuchten Zelltypen konnte unter allen betrachteten Bestrahlungsbedingungen eine signifikante differentielle Genexpression nachgewiesen werden. während transkriptionelle Veränderungen bei der Inkubation der Zellen mit dem unkonjugierten CD20-Antikörper nicht beobachtet werden konnten. Im Falle der Zell-Linie lässt dieser Befund den Schluss zu, dass die K422 Zellen aufgrund ihrer malignen Transformation über Resistenzmechanismen verfügen, welche die mutmaßlichen intrazellulären Signalkaskaden, ausgelöst durch die Bindung des Rituximab-Antikörpers an das CD20-Antigen, effektiv blockieren. Bei den CD19+ Zellen können massive zelluläre Beanspruchungen und Schäden nach der Selektion eine Ursache dafür sein, dass die Wirkung des Antikörpers ausbleibt. Weiterhin ist anzunehmen, dass die mutmaßliche Hauptwirkung des Antikörpers hauptsächlich in der natürlichen Umgebung der Zellen, nämlich in vivo über Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität sowie über Komplement-abhängige Zytotoxizität [Winkler et al., 1999; Weng & Levy, 2001] stattfindet, die in den verwendeten Kultursystemen der K422 Zellen und der primären CD19+ B-Zellen nicht existiert.

Die Beobachtung, dass im Vergleich mit den K422 Zellen die primären CD19+ Zellen nur sehr wenige differentiell regulierte Gene nach der Bestrahlung mit Alphapartikeln nachgewiesen werden konnten, lässt weiterhin den Schluss zu, dass die Zell-Linie aufgrund ihrer tumorigenen Transformation und ihres immortalen Charakters über erheblich effektivere Verteidigungsstrategien verfügt als die primären CD19+ Zellen, was bei einer potentiellen Radioimmuntherapie mit Alphastrahlung von erheblicher klinischer Relevanz sein könnte.

4.3 Ausblick

An der Zell-Linie K422 als Modell eines malignen B-Zell-Lymphoms und an normalen primären B-Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit Einblicke in molekulare Veränderungen gewonnen werden, die durch die Behandlung von Alphastrahlung induziert wurden. Die Studie durch Alphastrahlung in unserer gefundenen induzierten transkriptionellen Veränderungen sind konsistent mit einer Vielzahl von Studien, in denen die Auswirkungen von Gamma- oder Röntgenstrahlung untersucht wurden. Dieser Befund würde die Verwendung von Alphastrahlung als therapeutische Maßnahme rechtfertigen, jedoch stellen die vorliegenden Untersuchungen der Wirkungsweise von Alphastrahlung in vitro nur den ersten Schritt dar. Weitere Studien bezüglich des sensiblen Gleichgewichts zwischen therapeutisch wirksamen Strahlungsdosen bei Tumorzellen und bereits massiv schädigenden Strahlungsdosen bei normalen Zellen müssten ebenso durchgeführt werden wie Untersuchungen zur Verträglichkeit des Radioimmunkonjugats. Außerdem müssten funktionelle Experimente durchgeführt werden, die Aufschluss über den genauen Mechanismus des strahlungsinduzierten Zelltods geben. Das betrifft sowohl maligne Lymphomzellen als auch normale gesunde B-Zellen. Mit dem CD20-Antikörper Rituximab und dem Betastrahlung-emittierenden Radioimmunkonjugat Zevalin[®] (Yttrium-90-CD20) sind zwei Produkte auf dem Markt, die eine zielgerichtete Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen ermöglichen. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der großen Bemühungen bei der fortwährenden Entwicklung von neuen und schonenden zielgerichteten Therapiemöglichkeiten bleibt abzuwarten, ob ein alphastrahlendes Radioimmunkonjugat in Konkurrenz mit dem erfolgreich eingesetzten Zevalin[®] tritt.
5 ZUSAMMENFASSUNG

Der gezielte Transport von Radioisotopen mit einem hohen linearen Energietransfer und einer niedrigen Reichweite, wie z.B. Alphastrahler, direkt an Tumorzellen unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern ist eine viel versprechende Strategie zur Behandlung von Krebserkrankungen.

Da wenig über die biologischen Effekte von Alphastrahlung bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die molekulare Wirkung des Alphastrahlers Bismut-213 in normalen und malignen B-Zellen untersucht. Hierfür kamen die maligne Non-Hodgkin-Lymphom-Zell-Linie Karpas 422 sowie nicht maligne primäre, immunmagnetisch angereicherte CD19+ Zellen aus dem peripheren Blut zum Einsatz. Für den Transport und die Bindung des Strahlers diente der monoklonale Antikörper Rituximab, dessen Ziel das CD20 Antigen auf malignen und normalen B-Zellen darstellt. Mit den bestrahlten Zellen wurden sowohl Genexpressionsprofile mit Hilfe von Affymetrix Oligonukleotid-Arrays erstellt, die insgesamt 8.793 Gene abdecken, als auch funktionelle Untersuchungen zu DNA-Schäden und -Methylierung, Zellzyklus und Apoptose durchgeführt.

Im Vergleich zu unbestrahlten Zellen zeigten die bestrahlten K422 Zellen bei einer applizierten Aktivität von 200 μ Ci 50 deregulierte Gene nach einer Expositionszeit von 46 Minuten (eine Halbwertszeit des Strahlers) und 485 differentiell regulierte Gene nach einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden (für 100 μ Ci: 42 Gene nach 46 min; 451 Gene nach 24 h). Eine starke strahlungsinduzierte Antwort konnte damit erst nach 24 Stunden beobachtet werden. Bei den CD19+ Zellen zeigten sich nach 46 Minuten 67 Gene bei einer Aktivität von 200 μ Ci dereguliert (100 μ Ci: 42 differentiell regulierte Gene).

Mit Hilfe von Clusteranalysen war eine einheitliche Veränderung der Genexpressionsmuster der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Proben nachweisbar. Alphabestrahlte Zellen zeigten eine transkriptionelle Aktivierung von DNA-Reparaturgenen. Konsistent mit diesem Befund konnten DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen über γ H2AX in beiden Zelltypen nachgewiesen werden. In der Zell-Linie fiel weiterhin eine genomweite Demethylierung der DNA auf, die im Zusammenhang mit DNA-Läsionen einen Hinweis auf genomische Instabilität gibt. Ferner wurden in den K422 Zellen und den CD19+ Zellen zumeist hochregulierte Gene der allgemeinen und oxidativen Stressantwort gefunden. Überraschenderweise konnte in der Zell-Linie mit der transkriptionellen Aktivierung von Interferon-stimulierten Genen immunologische Aktivitäten beobachtet werden, die auf Proteinebene über die verstärkte Expression der Oberflächenantigene CD1c und CD164 sowie über die gesteigerte Sekretion der Zytokine TNFα, CCL3, CCL4 und IL8 bestätigt werden konnten. Eine immunologische Reaktion wurde auch in den normalen CD19+ Zellen über vermehrte Zytokinsekretion beobachtet. Die in den K422 Zellen beobachtete transkriptionelle Aktivierung von G1-S regulierenden Zellzyklusgenen sowie die verstärkte Proteinexpression des G1-S regulierenden Cyclins E2 lassen eine Progression in die S-Phase und einen Arrest in der S- oder G2/M-Phase vermuten. Diese Vermutung wird verstärkt durch die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen und durch die komplette Hemmung des klonogenen Wachstums nach Bestrahlung. Im Gegensatz dazu zeigten die CD19+ Zellen mit der Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren typische, bereits bekannte Reaktionen auf ionisierende Strahlung. Obwohl deregulierte Apoptose-assoziierte Gene in den Genexpressionsanalysen gefunden wurden, konnte keine Apoptose in den K422 Zellen nachgewiesen werden, was möglicherweise an einem verkürzten und damit funktionsunfähigen P53 Protein in den K422 Zellen lag.

Die bestrahlten K422 Zellen sterben vermutlich durch Nekrose ab, scheinen jedoch trotz der schwerwiegenden zytotoxischen Schäden, die auf der Basis der Genexpressionsanalysen vermutet werden können, in der Lage zu sein, sämtliche verfügbare Abwehr- und Überlebensmechanismen aktivieren zu können. Damit zeigen die malignen Zellen etwas andere, auf Basis der Genexpressionsanalysen aber auch vielfältigere Reaktionen als die primären CD19+ Zellen. Dies liegt sicherlich nicht zuletzt an der tumorigenen Transformation der malignen Zellen, die damit über erheblich wirkungsvollere Verteidigungsmechanismen verfügen, als die primären CD19+ Zellen. Die Balance zwischen therapeutisch wirksamen Strahlungsdosen bei malignen Zellen und schädigenden Strahlungsdosen bei normalen Zellen ist daher ein wesentlicher Aspekt bei einer Radioimmuntherapie mit Alphastrahlung und klinisch von erheblicher Relevanz.

5.1 Summary

The targeted delivery of radioisotopes with a high linear energy transfer and a short path length like alpha emitters directly to tumour cells by using monoclonal antibodies has become a promising concept for the treatment of cancer diseases. Because little is known about the biological effects of alpha radiation we examined the molecular effects of the alpha emitter Bismut-213 in malignant and normal B-cells. In this study, we used the cell line Karpas 422 which had been derived from a malignant B-cell Non-Hodgkin's lymphoma as well as normal primary CD19+ B-cells which had been selected immunomagnetically from peripheral blood. For the delivery and binding of the alpha emitter we used the monoclonal antibody rituximab

which targets the CD20 receptor of malignant and normal B-cells. We performed genomewide expression analyses with untreated and irradiated K422 and normal CD19+ cells using Affymetrix oligonucleotide arrays covering 8.793 genes. In addition, we accomplished functional analyses to assess DNA repair and methylation, cell cycle alterations and apoptosis.

Compared to the untreated cells K422 cells irradiated with 200 μ Ci showed 50 differential expressed genes after 46 minutes (one half life time) and 485 deregulated genes after exposure of 24 hours (for 100 μ Ci: 42 genes after 46 min; 451 genes after 24 h). Hence, a severe radiation induced response could not be detected before 24 hours. Irradiated CD19+ cells showed 67 differentially expressed genes after 46 minutes compared to the untreated CD19+ cells (for 100 μ Ci: 42 differentially expressed genes).

By performing cluster analyses the irradiated cells exhibited a distinct homogenous molecular phenotype in comparison to not irradiated cells. Alpha irradiated cells showed transcriptional activation of DNA repair genes which is consistent with the finding of DNA damage proven by the phosphorylation of the histone protein yH2AX which indicates DNA double strand breaks. In addition, genome wide DNA demethylation was found in K422 cells which gives in this context a hint to genomic instability. Furthermore, both examined cell types showed upregulated genes which are known to play a role in general and oxidative stress response. Surprisingly, we found up-regulation of interferon-stimulated genes in K422 cells as well as increased protein expression of the surface antigens CD1c and CD164. Together with rising secretion of the cytokines $TNF\alpha$, CCL3, CCL4 and IL8 these findings led to the assumption that the irradiated K422 cells exhibit some kind of immunological response. Secretion of these cytokines in the CD19+ cells confirmed weak radiation-induced immunological activities in primary cells as well. Because of the transcriptional activation of genes regulating the G1-S- cell cycle transition and the increased protein expression of cyclin E2 the supposition came up that the irradiated K422 do progress into the S-phase of the cell cycle and arrest in the S- or G2/M-phase. This assumption was corroborated by cell cycle analyses as well as by the inhibition of clonogenic growth following irradiation. In contrast to the K422 cells CD19+ cells revealed transcriptional activation of cell cycle inhibitors, which is an already known reaction following ionizing radiation. Although apoptosis associated genes were found to be differentially expressed no apoptosis-mediated cell death could be observed. In the course of this study we found a truncated P53 protein which probably contributed to the non-apoptotic behaviour in K422 cells.

Alpha irradiated K422 cells presumably die by necrosis. In spite of the massive cytotoxic damages which are assumed referring to the gene expression data the K422 cells appear to be able to activate several defense mechanisms in a precise manner. Hence, the malignant K422 cells exhibit a larger amount as well as more various responses than the CD19+ cells. This might be due to the tumorigenic transformation of the malignant cells that exhibit probably more effective defense strategies than the CD19+ cells. The balance between the therapeutic effect of alpha radiation on malignant cells and the damaging effect on normal cells is an essential issue and it is of important clinical relevance concerning radioimmunotherapy with alpha radiation.

6 **LITERATUR**

<u>Adra CN</u>, Lelias JM, Kobayashi H, Kaghad M, Morrison P, Rowley JD, Lim B. (1994) Cloning of the cDNA for a hematopoietic cell-specific protein related to CD20 and the beta subunit of the highaffinity IgE receptor: evidence for a family of proteins with four membrane-spanning regions. *Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 11;91(21):10178-82*

<u>Alas S</u>, Bonavida B, Emmanouilides C. (2000) Potentiation of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifylline and rituximab. *Anticancer Res. Sep-Oct;20(5A):2961-6*

<u>Armitage JO</u>. (1993) Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med. Apr 8;328(14):1023-30*

<u>Asher G</u>, Reuven N, Shaul Y. (2006) 20S proteasomes and protein degradation "by default". *Bioessays. Aug;28(8):844-9*

<u>Aurlien E</u>, Larsen RH, Kvalheim G, Bruland OS. (2000) Demonstration of highly specific toxicity of the alpha-emitting radioimmunoconjugate (211)At-rituximab against non-Hodgkin's lymphoma cells. *Br J Cancer. Nov*;83(10):1375-9

<u>Aviles A</u>, Delgado S, Nambo MJ, Alatriste S, Diaz-Maqueo JC. (1994) Adjuvant radiotherapy to sites of previous bulky disease in patients stage IV diffuse large cell lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys. Nov* 15;30(4):799-803

<u>Azzam EI</u>, de Toledo SM, Waker AJ, Little JB. (2000) High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res. May* 15;60(10):2623-31

Baggio L, Cavinato M, Cherubini R, Conzato M, Cucinotta F, Favaretto S, Gerardi S, Lora S, Stoppa P, Williams JR. (2002) Relative biological effectiveness of light ions in human tumoural cell lines: role of protein p53. *Radiat Prot Dosimetry.;99(1-4):211-4*

Baris D, Zahm SH. (2000) Epidemiology of lymphomas. *Curr Opin Oncol. Sep;12(5):383-94*

Bartek J, Lukas J. (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett. Feb 16;490(3):117-22*

Basnakian AG, James SJ. (1996) Quantification of 3'OH DNA breaks by random oligonucleotide-primed synthesis (ROPS) assay. DNA Cell Biol. Mar;15(3):255-62

Bates S, Vousden KH. (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci. Jan;55(1):28-37*

<u>Bauchinger M</u>, Schmid E, Braselmann H. (1986) Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat Environ Biophys.*;25(4):253-60 <u>Belletti B</u>, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Chimienti E, Berton S, Lovat F, Colombatti A, Baldassarre G. (2005) p27(kip1) functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs. *Curr Med Chem.*;12(14):1589-605

<u>Bergmann L, Schäfer C</u> (1992) Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 4 Teilchen Walter de Gruyter Berlin New York

<u>Beyer GJ</u>, Miederer M, Vranjes-Duric S, Comor JJ, Kunzi G, Hartley O, Senekowitsch-Schmidtke R, Soloviev D, Buchegger F. (2004) Targeted alpha therapy in vivo: direct evidence for single cancer cell kill using 149Tb-rituximab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging. Apr;31(4):547-54. Epub 2004 Jan 14*

<u>Blumberg RS</u>, Gerdes D, Chott A, Porcelli SA, Balk SP. (1995) Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol Rev. Oct;*147:5-29

<u>Bolus NE</u>. (2001) Basic review of radiation biology and terminology. *J Nucl Med Technol. Jun;29(2):67-73; test 76-7*

Breen AP, Murphy JA. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med. Jun;18(6):1033-77*

Brown JM, Wouters BG. (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res. Apr 1;59(7):1391-9*

<u>Bubien JK</u>, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. (1993) Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca2+ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol. Jun;121(5):1121-32*

<u>Burke JM</u>, Jurcic JG, Scheinberg DA. (2002) Radioimmunotherapy for acute leukemia. *Cancer Control. Mar-Apr;9(2):106-13*

Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC. (2002) The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. Blood. Feb 1;99(3):1038-43

<u>Cadet J</u>, Vigny P, Midden WR. (1990) Photoreactions of furocoumarins with biomolecules. *J Photochem Photobiol B. Jun;6(1-2):197-206*

<u>Cascio P</u>, Call M, Petre BM, Walz T, Goldberg AL. (2002) Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J. Jun 3;21(11):2636-45*

<u>Chen RZ</u>, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature. Sep 3;395(6697):89-93*

<u>Cheson BD.</u> (2003) Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood. Jan 15;101(2):391-8. Epub 2002 Sep 19* <u>Chu PG, Arber DA</u>. (2001) CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol. Jun;9*(2):97-106

<u>Clemens MJ, Vaquero CM.</u> (1978) Inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease. Biochem Biophys Res Commun. Jul 14;83(1):59-68

<u>Clynes RA</u>, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets. *Nat Med. Apr;6(4):443-6*

<u>Cordon-Cardo C</u>. (1998) Molecular alterations in bladder cancer *Cancer Surv.*;32:115-31

<u>Couturier O</u>, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, Thedrez P, Sai-Maurel C, Bardies M, Mishra AK, Gauvrit M, Blain G, Apostolidis C, Molinet R, Abbe JC, Bataille R, Wijdenes J, Chatal JF, Cherel M. (1999) Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin Cancer Res. Oct;5(10 Suppl):3165s-3170s*

<u>Dahm-Daphi J</u>, 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. Jun;65(6):657-63*

Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene. Dec* 20;18(55):7883-99

<u>Demidem A</u>, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. (1997) Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm. Jun;12(3):177-86*

<u>Dikomey E</u>, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J. (2000) Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys. Jan 15*;46(2):481-90

<u>Dikomey E</u>, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B. (1998) Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines.

Int J Radiat Biol. Mar;73(3):269-78

<u>Di Leonardo A</u>, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev. Nov 1;8(21):2540-51*

Douki T, Laporte G, Cadet J. (2003) Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Res. Jun 15;31(12):3134-42*

<u>Dugle DL</u>, Gillespie CJ, Chapman JD. (1976) DNA strand breaks, repair, and survival in x-irradiated mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. Mar;73(3):809-12* <u>Duthie SJ</u>, Narayanan S, Blum S, Pirie L, Brand GM. (2000) Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr Cancer.*;37(2):245-51

<u>Ehrlich M</u>. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene. Aug 12;21(35):5400-13*

<u>Eisen MB</u>, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 8;95(25):14863-8*

<u>El-Awady RA</u>, Dikomey E, Dahm-Daphi J. (2001) Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of nonrepaired double-strand breaks and structural rearrangements. *Nucleic Acids Res. May* 1;29(9):1960-6

<u>El-Awady RA</u>, 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 breaks. *Br J Cancer. Aug 4;89(3):593-601*

Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH, Hartmann R. (2003) Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic Acids Res. Jun 15;31(12):3166-73*

Espert L, Degols G, Gongora C, Blondel D, Williams BR, Silverman RH, Mechti N. (2003) ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J Biol Chem. May* 2;278(18):16151-8. *Epub* 2003 Feb 19

<u>Foster ER, Downs JA.</u> (2005) Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J. Jul*;272(13):3231-40

<u>Frankenberg D</u>. (1994) Repair of DNA double-strand breaks and its effect on RBE. *Adv Space Res. Oct;14(10):235-48*

<u>Friedberg EC</u>. (2003) DNA damage and repair. *Nature. Jan 23;421(6921):436-40*

<u>Friesner JD</u>, Liu B, Culligan K, Britt AB. (2005) Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Mol Biol Cell. May*; 16(5):2566-76. *Epub 2005 Mar 16*

<u>Gaudet F</u>, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science. Apr 18;300(5618):489-92*

<u>Ghetie MA</u>, Bright H, Vitetta ES. (2001)

Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood. Mar* 1;97(5):1392-8

<u>Giller CA</u>, Berger BD. (2005) New frontiers in radiosurgery for the brain and body. *Proc (Bayl Univ Med Cent). Oct;18(4):311-9; discussion 319-20* <u>Goldberg AL</u>. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature. Dec* 18;426(6968):895-9

<u>Greinert R</u>, Detzler E, Volkmer B, Harder D. (1995) Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes: analysis by premature chromosome condensation with delayed fusion. *Radiat Res. Nov*;144(2):190-7

<u>Haas R, Kronenwett R.</u> (2005) Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle. Grundlagen, Indikationen, therapeutischer Nutzen. Deutscher Ärzte-Verlag; Auflage 1

<u>Hall EJ</u>. (2003) The bystander effect. *Health Phys. Jul;85(1):31-5*

<u>Hall JL</u>. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot. Jan;53(366):1-11*

<u>Heeger S</u>, Moldenhauer G, Egerer G, Wesch H, Martin S, Wilmes A, Eisenmenger A, Gottschling S, Nikula T, Apostolidis C, Molinet R, Janssens W, Brechbiel M, Ho AD, and Haas R. (2001) Alpha-radioimmunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma using 213Bi-labelled anti-CD19 and anti-CD20-CHX-A"-DTPA conjugates. *Onkologie 24 S6*

<u>Henkel G, Krebs B.</u> (2004) Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features--structural aspects and biological implications. *Chem Rev. Feb*;104(2):801-24

<u>Henriksen G</u>, Bruland OS, Larsen RH. (2004) Thorium and actinium polyphosphonate compounds as bone-seeking alpha particle-emitting agents. *Anticancer Res. Jan-Feb*;24(1):101-5

<u>Hershenson MB</u>. (2004) p21Waf1/Cip1 and the prevention of oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Mar;286(3):L502-5*

<u>Hnatowich DJ</u>, Virzi F, Doherty PW. (1985) DTPA-coupled antibodies labeled with yttrium-90. *J Nucl Med. May*;26(5):503-9

<u>Hoeijmakers JH</u>. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature. May* 17;411(6835):366-74

<u>Huang L</u>, Snyder AR, Morgan WF. (2003) Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene. Sep 1;22(37):5848-54*

<u>Huber R</u>, Seidl C, Schmid E, Seidenschwang S, Becker KF, Schuhmacher C, Apostolidis C, Nikula T, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. (2003) Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res. Sep 1;9(10 Pt 2):3922S-8S*

<u>Huttermann J</u>, Voit K, Oloff H, Kohnlein W, Graslund A, Rupprecht A. (1984) Specific formation of electron gain and loss centres in X-irradiated oriented fibres of DNA at low temperatures. *Faraday Discuss Chem Soc.;*(78):135-49 <u>Ihle JN</u>. (1996) Janus kinases in cytokine signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Feb 29;351(1336):159-66*

Jackson SP. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis. May*;23(5):687-96

<u>Jeffrey KL</u>, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M, Rommel C, Gerondakis SD, Mackay CR. (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol. Mar;*7(3):274-83. *Epub 2006 Feb 12*

Jones PA, Gonzalgo ML. (1997) Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 18;94(6):2103-5*

<u>Jurcic JG</u>, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA. (2002) Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood. Aug 15;100(4):1233-9*

Kadhim MA, Wright EG. (1998) Radiation-induced transmissable chromosomal instability in haemopoietic stem cells. *Adv Space Res.*;22(4):587-96

<u>Kalinich JF</u>, Catravas GN, Snyder SL. (1989) The effect of gamma radiation on DNA methylation. *Radiat Res. Feb;117(2):185-97*

<u>Kaneko M</u>, Matsuyama A, Nagata C. (1979) Photosensitized formation of thymine dimers in DNA by tyramine, tyrosine and tyrosine-containing peptides. *Nucleic Acids Res. Mar;6(3):1177-87*

<u>Kaspersen FM</u>, Bos E, Doornmalen AV, Geerlings MW, Apostolidis C, Molinet R. (1995) Cytotoxicity of 213Bi- and 225Ac-immunoconjugates. *Nucl Med Commun. Jun;16(6):468-76*

Kastan MB, Bartek J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature. Nov* 18;432(7015):316-23

<u>Kennel SJ</u>, Chappell LL, Dadachova K, Brechbiel MW, Lankford TK, Davis IA, Stabin M, Mirzadeh S. (2000) Evaluation of 225Ac for vascular targeted radioimmunotherapy of lung tumors. *Cancer Biother Radiopharm. Jun;15(3):235-44*

<u>Kneifel S</u>, Cordier D, Good S, Ionescu MC, Ghaffari A, Hofer S, Kretzschmar M, Tolnay M, Apostolidis C, Waser B, Arnold M, Mueller-Brand J, Maecke HR, Reubi JC, Merlo A. (2006) Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance P. *Clin Cancer Res. Jun 15;12(12):3843-50*

Korsmeyer SJ. (1992) Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol.*;10:785-807

Korsmeyer SJ. (1999) Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect.*;95:21-41 <u>Kovalchuk O</u>, Burke P, Besplug J, Slovack M, Filkowski J, Pogribny I. (2004) Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat Res. Apr 14;548(1-2):75-84*

<u>Kozak RW</u>, Atcher RW, Gansow OA, Friedman AM, Hines JJ, Waldmann TA. (1986) Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: alpha-particle-emitting radionuclides as modalities for radioimmunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A. Jan;83*(2):474-8

<u>Kubota Y</u>, Takahashi S, Sato H. (1997) Effect of a maternal injection of 239Pu on the number of CFU-S in the foetal liver of the C3H and BDF1 mouse. *Int J Radiat Biol. Jul;72(1):71-8*

Lang R, Hammer M, Mages J. (2006) DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol. Dec 1;177(11):7497-504*

Larsen RH, Bruland OS. (1998) Intratumour injection of immunoglobulins labelled with the alpha-particle emitter 211At: analyses of tumour retention, microdistribution and growth delay. *Br J Cancer. Apr*;77(7):1115-22

Larsen RH, Akabani G, Welsh P, Zalutsky MR. (1998) The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat Res. Feb;149(2):155-62*

Lattimer JC, Corwin LA Jr, Stapleton J, Volkert WA, Ehrhardt GJ, Ketring AR, Anderson SK, Simon J, Goeckeler WF. (1990) Clinical and clinicopathologic response of canine bone tumor patients to treatment with samarium-153-EDTMP. *J Nucl Med. Aug;31(8):1316-25*

Lee YN, Kang JS, Krauss RS. (2001) Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation by signal sequence trapping in yeast. *Mol Cell Biol. Nov;21(22):7696-706*

Lehnert S. (1998) From DNA damage to cell death: the role of nuclear structure in the response to cancer therapy. Overview of the proceedings: from loose loops to sticky ends. *Radiat Res. Apr;149(4):317-8*

<u>Lipes MA</u>, Napolitano M, Jeang KT, Chang NT, Leonard WJ. (1988) Identification, cloning, and characterization of an immune activation gene. *Proc Natl Acad Sci U S A. Dec*;85(24):9704-8

Lobrich M, Kuhne M, Wetzel J, Rothkamm K. (2000) Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes Cancer. Jan;27(1):59-68*

Lobrich M, Rydberg B, Cooper PK. (1995) Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 19;92(26):12050-4*

Lorimore SA, Kadhim MA, Pocock DA, Papworth D, Stevens DL, Goodhead DT, Wright EG. (1998) Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A. May* 12;95(10):5730-3 <u>Macdonald J</u>, Galley HF, Webster NR. (2003) Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth. Feb;90(2):221-32*

<u>Macklis RM</u>, Kinsey BM, Kassis AI, Ferrara JL, Atcher RW, Hines JJ, Coleman CN, Adelstein SJ, Burakoff SJ. (1988) Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates.

Science. May 20;240(4855):1024-6

Macklis RM. (1990) Radithor and the era of mild radium therapy. *JAMA*. *Aug* 1;264(5):614-8

<u>MacLachlan TK</u>, Dash BC, Dicker DT, El-Deiry WS. (2000a) Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53. *J Biol Chem. Oct* 13;275(41):31869-75

<u>MacLachlan TK</u>, Somasundaram K, Sgagias M, Shifman Y, Muschel RJ, Cowan KH, El-Deiry WS. (2000b) BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *J Biol Chem. Jan* 28;275(4):2777-85

<u>Maloney DG</u>, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R. (1994) Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood. Oct* 15;84(8):2457-66

<u>Marnett LJ</u>. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. *Mar;21(3):361-70*

<u>Mazumder S</u>, Gong B, Almasan A. (2000) Cyclin E induction by genotoxic stress leads to apoptosis of hematopoietic cells. *Oncogene. Jun 1;19*(24):2828-35

<u>McBride WH</u>, Iwamoto KS, Syljuasen R, Pervan M, Pajonk F. (2003) The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene. Sep 1;22(37):5755-73*

<u>McKelvey EM</u>, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R, Lane M, Gamble JF, Jones SE, Grozea PN, Gutterman J, Coltman C, Moon TE. (1976) Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer. Oct;38(4):1484-93*

<u>Meurs E</u>, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG. (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell. Jul* 27;62(2):379-90

<u>Nagasawa H, Little JB.</u> (1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res. Nov* 15;52(22):6394-6

<u>Nagasawa H</u>, Peng Y, Wilson PF, Lio YC, Chen DJ, Bedford JS, Little JB. (2005) Role of homologous recombination in the alpha-particle-induced bystander effect for sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Radiat Res. Aug;164(2):141-7*

Nathan AT, Singer M. (1999) The oxygen trail: tissue oxygenation. *Br Med Bull.;55(1):96-108* <u>Nelson RA</u>, Levine AM, Bernstein L. (1998) Blood transfusions and the risk of intermediate- or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst. Nov* 18;90(22):1742-3

Nishimoto S, Nishida E. (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. EMBO Rep. Aug;7(8):782-6

<u>Oldenborg PA</u>, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. (2000) Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science. Jun 16*;288(5473):2051-4

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. (1995)

Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science. Aug* 4;269(5224):682-5

Papathanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH, McBride OW, Alamo I Jr, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ Jr. (1991) Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. Mol Cell Biol. Feb;11(2):1009-16

<u>Pervan M</u>, Iwamoto KS, McBride WH. (2005) Proteasome structures affected by ionizing radiation. *Mol Cancer Res. Jul;3(7):381-90*

<u>Pestka S</u>. (1981) Cloning of the human interferons. *Methods Enzymol.;79(Pt B):599-601*

<u>Pestka S</u>, Evinger M, Maeda S, Rehberg E, Familletti PC, Kelder B. (1981-1982) Biological properties of natural and recombinant interferons. *Tex Rep Biol Med.*;41:31-6

<u>Pestka S</u>. (2000) The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers.*;55(4):254-87

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

<u>Pfutzner W</u>. (2003) [Carcinogenesis: defect control systems and options for molecular therapy] [Article in German] J Dtsch Dermatol Ges. Jun; 1(6):444-9

<u>Pinto M</u>, Prise KM, Michael BD. (2002) Double strand break rejoining after irradiation of human fibroblasts with X rays or alpha particles: PFGE studies and numerical models. *Radiat Prot Dosimetry.*;99(1-4):133-6

<u>Pogribny I</u>, Raiche J, Slovack M, Kovalchuk O. (2004) Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem Biophys Res Commun. Aug 6;320(4):1253-61*

<u>Pohlman B</u>, Sweetenham J, Macklis RM. (2006) Review of clinical radioimmunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther. Mar;6(3):445-61* <u>Prise KM</u>, Newman HC, Folkard M, Michael BD. (1998) A study of DNA fragmentation patterns in cells irradiated with charged particles: evidence for non-random distributions. *Phys Med. Jul;14 Suppl 1:20-3*

<u>Qu CF</u>, Song EY, Li Y, Rizvi SM, Raja C, Smith R, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. (2005a) Pre-clinical study of 213Bi labeled PAI2 for the control of micrometastatic pancreatic cancer. *Clin Exp Metastasis.*;22(7):575-86. *Epub 2006 Feb 11*

<u>Qu CF</u>, Songl YJ, Rizvi SM, Li Y, Smith R, Perkins AC, Morgenstern A, Brechbiel M, Allen BJ. (2005b) In vivo and in vitro inhibition of pancreatic cancer growth by targeted alpha therapy using 213Bi-CHX.A"-C595. *Cancer Biol Ther. Aug;4(8):848-53*

<u>Rabkin CS, Blattner WA.</u> (1991) HIV infection and cancers other than non-Hodgkin lymphoma and Kaposi's sarcoma. *Cancer Surv.*;10:151-60

<u>Ranson M</u>, Tian Z, Andronicos NM, Rizvi S, Allen BJ. (2002) In vitro cytotoxicity of bismuth-213 (213Bi)-labeled-plasminogen activator inhibitor type 2 (alpha-PAI-2) on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat. Jan;71(2):149-59*

<u>Rizwana R, Hahn PJ.</u> (1999) CpG methylation reduces genomic instability. *J Cell Sci. Dec;112 (Pt 24):4513-9*

<u>Rogakou EP</u>, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem. Mar* 6;273(10):5858-68

<u>Robertson DM</u>. (2003) Changing concepts in the management of choroidal melanoma. *Am J Ophthalmol. Jul*;136(1):161-70

<u>Robertson KD, Jones PA.</u> (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis. Mar;21(3):461-7*

<u>Rodningen OK</u>, Overgaard J, Alsner J, Hastie T, Borresen-Dale AL. (2005) Microarray analysis of the transcriptional response to single or multiple doses of ionizing radiation in human subcutaneous fibroblasts. *Radiother Oncol. Dec*;77(3):231-40. *Epub 2005 Nov 17*

<u>Rosenthal P</u>, Rimm IJ, Umiel T, Griffin JD, Osathanondh R, Schlossman SF, Nadler LM. (1983) Ontogeny of human hematopoietic cells: analysis utilizing monoclonal antibodies. *J Immunol. Jul;131(1):232-7*

<u>Ruble G</u>, Wu C, Squire RA, Ganswo OA, Strand M. (1996) The use of 212Pb-labeled monoclonal antibody in the treatment of murine erythroleukemia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys. Feb 1;34(3):609-16*

<u>Rydberg B</u>. (2001) Radiation-induced DNA damage and chromatin structure. *Acta Oncol.*;40(6):682-5

Salame MY, Verheye S, Crocker IR, Chronos NA, Robinson KA, King SB 3rd. (2001) Intracoronary radiation therapy. *Eur Heart J. Apr;22(8):629-47*

Sandal T. (2002) Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist.;7(1):73-81* Sato M, Kondoh M. (2002) Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med. Jan;196(1):9-22*

Schindler C, Darnell JE Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem.*;64:621-51

Singleton BK, Griffin CS, Thacker J. (2002) Clustered DNA damage leads to complex genetic changes in irradiated human cells. *Cancer Res. Nov* 1;62(21):6263-9

<u>Smith ML</u>, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science. Nov* 25;266(5189):1376-80

Smith MR. (2003) Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene. Oct 20;22(47):7359-68*

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem. Oct;150(1):76-85*

<u>Somasundaram K</u>, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS. (1997) Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature. Sep 11;389(6647):187-90*

Soti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P. (2005) Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol. Nov;146(6):769-80*

Steenken S. (1989) Purine bases, nucleosides and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their cations and e⁻ and OH adducts *Chem. Rev. Nov* (89): 503-520

<u>Stiff T</u>, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res. Apr 1;64(7):2390-6*

<u>Strickland DK</u>, Vaidyanathan G, Zalutsky MR. (1994) Cytotoxicity of alpha-particle-emitting m-[211At]astatobenzylguanidine on human neuroblastoma cells. *Cancer Res. Oct* 15;54(20):5414-9

<u>Suzuki M, Tsuruoka C.</u> (2004) Heavy charged particles produce a bystander effect via cell-cell junctions. *Biol Sci Space. Dec;18(4):241-6*

<u>Syljuasen RG</u>, Krolewski B, Little JB. (1999) Loss of normal G1 checkpoint control is an early step in carcinogenesis, independent of p53 status. *Cancer Res. Mar 1;59(5):1008-14*

<u>Takeda K, Akira S.</u> (2000) STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev. Sep;11(3):199-207* Tanaka H, Samuel CE. (1994) Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNAdependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 16;91(17):7995-9*

<u>Tedder TF, Schlossman SF.</u> (1988) Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem. Jul* 15;263(20):10009-15

<u>Tedder TF</u>, Disteche CM, Louie E, Adler DA, Croce CM, Schlossman SF, Saito H. (1989a) The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site. *J Immunol. Apr 1;142(7):2555-9*

<u>Tedder TF</u>, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. (1989b) Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol. Apr 1;142(7):2560-8*

<u>Tipler</u> (1994) Physik Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford

<u>Thomis DC, Samuel CE.</u> (1992) Mechanism of interferon action: autoregulation of RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase (PKR) expression in transfected mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 15;89(22):10837-41*

<u>Turker MS, Bestor TH.</u> (1997) Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutat Res. Apr;386(2):119-30*

<u>Valko M</u>, Morris H, Cronin MT. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.*;12(10):1161-208

Vana N.

Strahlenschutz ionisierender Strahlung Teil 2 Grundlagen der Strahlenbiologie und Strahlenschäden, Strahlenunfälle, Risikoabschätzung <u>http://www.strahlenschutzverband.at/biologische_strahlenwirkung/Skriptum%20Vana%20Biologische%20Strah</u> <u>leneffekte.pdf</u>

<u>van Beek EM</u>, Cochrane F, Barclay AN, van den Berg TK. (2005) Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol. Dec 15;175(12):7781-7*

<u>Vandenbulcke K</u>, De Vos F, Offner F, Philippe J, Apostolidis C, Molinet R, Nikula TK, Bacher K, de Gelder V, Vral A, Lahorte C, Thierens H, Dierckx RA, Slegers G. (2003) In vitro evaluation of 213Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging. Oct;30(10):1357-64. Epub 2003 Jul 3*

<u>Van Gelder RN</u>, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A. Mar;*87(5):1663-7

<u>Wang J</u>, Abbas Rizvi SM, Madigan MC, Cozzi PJ, Power CA, Qu CF, Morgenstern A, Apostolidis C, Russell PJ, Allen BJ, Li Y. (2006) Control of prostate cancer spheroid growth using 213Bi-labeled multiple targeted alpha radioimmunoconjugates. *Prostate. Dec* 1;66(16):1753-67 Wang J, Maldonado MA. (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol. Aug;3(4):255-61*

<u>Wang Y</u>, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev. Apr 15;14(8):927-39*

<u>Wang Y, Dohlman HG.</u> (2006) Regulation of G protein and mitogen-activated protein kinase signaling by ubiquitination: insights from model organisms. *Circ Res. Dec* 8;99(12):1305-14

<u>Ward JF</u>. (1981) Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiat Res. May*;86(2):185-95

<u>Watt SM</u>, Buhring HJ, Rappold I, Chan JY, Lee-Prudhoe J, Jones T, Zannettino AC, Simmons PJ, Doyonnas R, Sheer D, Butler LH. (1998) CD164, a novel sialomucin on CD34(+) and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21. *Blood. Aug 1;92(3):849-66*

Weng WK, Levy R. (2001) Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood. Sep 1;98(5):1352-7*

<u>Wiechelman KJ</u>, Braun RD, Fitzpatrick JD. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem. Nov* 15;175(1):231-7

<u>Wilbur DS</u>, Vessella RL, Stray JE, Goffe DK, Blouke KA, Atcher RW. (1993) Preparation and evaluation of para-[211At]astatobenzoyl labeled anti-renal cell carcinoma antibody A6H F(ab')2. In vivo distribution comparison with para-[125I]iodobenzoyl labeled A6H F(ab')2. *Nucl Med Biol. Nov;20(8):917-27*

<u>Willers H</u>, Dahm-Daphi J, Powell SN. (2004) Repair of radiation damage to DNA. *Br J Cancer. Apr 5;90(7):1297-301*

<u>Williamson EA</u>, Dadmanesh F, Koeffler HP. (2002) BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene. May 9;21(20):3199-206*

<u>Winkler U</u>, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. (1999) Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood. Oct 1;94(7):2217-24*

<u>Wolpe SD</u>, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. (1988) Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med. Feb* 1;167(2):570-81

<u>Yordanov AT</u>, Garmestani K, Zhang M, Zhang Z, Yao Z, Phillips KE, Herring B, Horak E, Beitzel MP, Schwarz UP, Gansow OA, Plascjak PS, Eckelman WC, Waldmann TA, Brechbiel MW. (2001) Preparation and in vivo evaluation of linkers for 211At labeling of humanized anti-Tac. *Nucl Med Biol. Oct;28*(7):845-56 Zannettino AC, Buhring HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA, Simmons PJ. (1998) The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood. Oct* 15;92(8):2613-28

Zimmerman JJ. (1995) Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. Comment on: *Crit Care Med. 1995 Apr;23(4):646-51 Crit Care Med. Apr;23(4):616-7*

Zong WX, Thompson CB. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev. Jan 1;20(1):1-15*

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7AAD	7-Amino-Actinomycin D
APS	Ammoniumpersulfat
aRNA	antisense RNA
²¹³ Bi	Bismut-213
BSA	Rinder-Serum-Albumin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSBs	DNA-Doppelstrangbrüche
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
³ H	Tritium
HG	human genome (Humangenom)
Hs	Homo saniens
HSP	Hitzeschock-Protein
kB	Kilohasen
kDa	Kilodalton
LET	linearer Energietransfer
MACS	magnetic cell sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MES	2-[N-Morpholino] Ethansulfonsäure
MEI	<i>mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MNCs	mononuclear cells (mononukleäre Zellen)
OD	Ontische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektronhorese
PBS	Phoshpate Ruffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rnm	rotations per minute (Undrehungen pro Minute)
SCN-CHY-A''-DTPA	2-(A-Isothiocyanatohenyl)Diethylentriaminnenta-Essigsäure
SDS	Sodium dodacyl sulfata (Natriumdodecylsulfat)
TRF	Tris Borat Duffer
TE	Tris EDTA Duffer
TEMED	N N N' N'-Tetramethyl_ethylendiamin
Tris	Tris(hydrocymethau))aminomethan
1115 I I	Unit
	Ultroviolett
UV	Ultraviolett

8 DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich Herrn PD Dr. med. R. Kronenwett für das Angebot des interessanten Dissertationsthemas sowie für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit herzlich danken. Seine stetige fachliche Unterstützung sowie Diskussions- und Hilfsbereitschaft war ein wesentlicher Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Wagner danke ich herzlich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Koreferats dieser Arbeit und der Bereitschaft, diese im Fachbereich Biologie zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. med. R. Haas sei für die Unterstützung des hämatologischen Forschungslabors sowie für das Interesse an der Arbeit gedankt.

Weiterhin danke ich Frau Dr. med. S. Martin und Frau M. Weis für die Bestrahlungsexperimente sowie für die Zeit, in der ich das Institut für Transurane des Forschungszentrums in Karlsruhe kennen lernen und dort selbst Experimente durchführen konnte.

Herrn Dipl.-Inform. Michael Rosskopf danke ich für die Unterstützung der bioinformatischen Auswertungen und der statistischen Analysen der Genexpressionsdaten.

Den Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors sei für eine gute Zusammenarbeit gedankt. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biol. S. Brookmann, Frau E. Diaz-Blanco und Herrn Dipl.-Biol. M. Korthals für die uneingeschränkte Hilfe und Unterstützung zu jeder Zeit sowie für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ferner gilt mein Dank Frau Dipl.-Chem. S. Krause, Frau Dr. A. Lindecke, Frau Dr. M. Hoffmann, Herrn Dr. HB. Prisack, Herrn Dr. G. Röder und Herrn Prof. Dr. WA Schulz für fachliche Ratschläge und experimentelle Hilfestellungen.

Mein spezieller Dank gilt meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung, die einen erheblichen Beitrag zum Erfolg des Studiums sowie zum Gelingen dieser Dissertation geleistet hat. Fortwährende Motivation und familiärer Rückhalt in allen Lebenslagen sowie der stete Glaube an mich sorgten dafür, dass ich immer ein Ziel vor Augen hatte. Meinem Bruder, Herrn M. Raschke danke ich für diverse Bewältigungsstrategien bei Hard- und Softwareproblemen.

Schließlich möchte ich allen Freunden und Bekannten danken, die aufgrund dieser Arbeit etwas zu kurz gekommen sind, aber Verständnis für meine Situation aufbrachten.