

Schwerionenbestrahlung zwei- und dreidimensionaler Zellsysteme

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jana Topsch

Mainz, 2005

D 77

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2005

1	Einleitung	9
1.1	Physikalische und biologische Grundlagen der Strahlenwirkung	10
1.1.1	Ionisierende Strahlung.....	10
1.1.2	Linearer Energie-Transfer (LET)	12
1.1.3	Zellschäden nach Bestrahlung	13
1.1.4	Zellzyklus	14
1.1.5	DNA-Reparatur	15
1.1.6	Zelltod	17
1.1.7	Relative biologische Wirksamkeit.....	18
1.2	Besonderheiten der Tumorphysiologie.....	18
1.2.1	Multizelluläre Systeme.....	19
1.2.2	Kontakteffekt.....	20
1.2.3	Multi Drug Resistance.....	21
1.3	Tumorthherapie mit Schwerionen.....	22
1.3.1	Beschleunigeranlage GSI	23
1.3.2	Ausgedehnter Bragg-Peak und Raster-Scan-Verfahren	23
1.3.3	Erhöhte relative biologische Wirksamkeit	24
1.3.4	Weitere Vorteile der Schwerionenbestrahlung.....	25
1.3.5	Aufgabenstellung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Zellkultur	29
2.1.1	Verwendete Zelllinien	29
2.1.2	Monolayer-Kultivierung.....	29
2.1.3	Multilayer-Kultivierung	32
2.1.4	Kultivierung von Sphäroiden	37
2.2	Behandlungsformen	38
2.2.1	Bestrahlung von Zellen	38
2.2.2	Etoposid-Behandlung	42
2.3	Analysen.....	43
2.3.1	Charakterisierung des Zellwachstums	43
2.3.2	Erstellen von Überlebenskurven.....	43
2.3.3	Bestimmung der relative biologische Wirksamkeit (RBW)	45
2.3.4	Histologische Untersuchungen am Multilayer	45
2.3.5	Analysen am Durchflußzytometer (Fluorescence activated cell sorter, FACS)	46

2.3.6	Molekularbiologische Analysen.....	48
2.3.7	Zellmigration in der Boydenkammer	55
2.3.8	Verwendete Statistik.....	57
2.3.9	Kodierung in den Diagrammen	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Charakterisierung der Zellsysteme	59
3.1.1	Charakterisierung der Zelllinien.....	59
3.1.2	Mycoplasmen-Test	60
3.1.3	Koloniebildungstest/Plating Efficiency (PE).....	60
3.1.4	Wachstumskurven	61
3.2	Röntgenbestrahlung.....	72
3.2.1	Methodische Untersuchungen zur Dosimetrie.....	72
3.2.2	Überleben nach Röntgenbestrahlung.....	76
3.3	Überleben nach Schwerionenbestrahlung.....	82
3.3.1	SiHa-Zellen	82
3.3.2	WiDr-Zellen	83
3.4	Vergleich von Röntgen- und Plateaubestrahlung.....	85
3.5	Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW)	85
3.6	Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Etoposid.....	86
3.6.1	Wachstum der Monolayer auf Collagen.....	87
3.6.2	Überleben der Suspensionskulturen	87
3.6.3	Wiederaussaat resuspendierter Multilayer.....	89
3.7	Untersuchungen des Zellzyklus.....	90
3.7.1	Zellzyklusverteilung während des Wachstums	90
3.7.2	Zellzyklus-Analyse nach Bestrahlung.....	92
3.7.3	Einfluss des Zellzyklus auf das Überleben.....	101
3.8	Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung	103
3.9	Aktivität des P-Glycoproteins (P-Gp).....	105
3.10	Molekularbiologische Untersuchungen zu Rad51.....	106
3.10.1	Nachweis der rad51-mRNA	106
3.10.2	Nachweis des Rad51-Proteins	108
3.11	Migration	108

4	Diskussion.....	112
4.1	Charakterisierung der Zellsysteme	112
4.1.1	Wachstumskurven	112
4.1.2	Zellzyklusverteilung während des Wachstums	115
4.2	Bestrahlung.....	117
4.2.1	Röntgen	118
4.2.2	Schwerionenbestrahlung	123
4.3	Etoposid-Behandlung.....	125
4.3.1	Etoposid-Behandlung von Suspensionskulturen	125
4.3.2	Multi Drug Resistance.....	126
4.3.3	Etoposid-Behandlung nach Wiederaussaat resuspendierter Multilayer.....	127
4.4	Synchronisation.....	128
4.5	Zellzyklus-Analyse nach Bestrahlung	132
4.6	Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung	135
4.7	Einfluss der Collagen-Beschichtung	136
4.8	Untersuchungen zu Rad51	137
4.9	Migration	138
4.10	Ausblick	140
5	Zusammenfassung	141
6	Literaturverzeichnis	143
7	Anhang.....	154
7.1	Anhang A – Abkürzungsverzeichnis	154
7.2	Anhang B – Tabellen.....	155
7.3	Anhang C – Puffer und Lösungen	160
7.4	Anhang D - rad51-mRNA-Sequenz	166
7.5	Anhang E – Materialien.....	166

1 Einleitung

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Deutsche Krebshilfe 2004). Zur Behandlung stehen die klassischen Methoden Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie, in neuerer Zeit auch Hormon- und Immuntherapie zur Verfügung. Meist finden Kombinationsbehandlungen statt. Mit Hilfe der Chirurgie soll möglichst die vollständige Entfernung des Tumors erfolgen. Bei fortgeschrittenen Erkrankungen kann die Entfernung eines Teils der Tumormasse zur Minderung der Druckbeschwerden führen. Die Strahlentherapie kommt zum Einsatz, um die verbliebenen Tumorrandbereiche nach einer Operation bzw. nicht operable Regionen (Nähe zu großen Blutgefäßen) abzutöten. In einigen Fällen erfolgt die Strahlentherapie auch vor einer Operation, um den Tumor zu verkleinern und somit eine Operation erst zu ermöglichen. Die Chemotherapie findet Verwendung, wenn sich bereits Metastasen im Körper verteilt gebildet haben. Sie kann aber auch ergänzend nach einer Operation angewandt werden, um die verbliebenen Tumorzellen an der Rezidivbildung oder der Metastasierung zu hindern. Der Behandlung des gesamten Körpers mit der Chemotherapie steht die räumlich begrenzte Behandlung mit Strahlen gegenüber (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg 2004).

In der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt erfolgte in Kooperation mit der Radiobiologischen Universitätsklinik und dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg sowie dem Forschungszentrum Rossendorf (FZR) bei Dresden die Entwicklung einer Strahlentherapie mit Kohlenstoffionen. Diese erlauben aufgrund ihrer besonderen physikalischen und strahlenbiologischen Eigenschaften eine besonders tumorkonforme Bestrahlung sowie eine effiziente Inaktivierung der Tumorzellen. Damit können insbesondere tief liegende Tumoren unter gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes viel effektiver bekämpft werden als mit konventioneller Bestrahlung (Kraft 2000).

Zum Verständnis der biologischen Mechanismen nach Bestrahlung kommen Zellkultur- oder Tierexperimente zum Einsatz. Zur Minimierung der Tierversuche werden zunehmend Zellkulturen verwendet, die den Vorteil einer geringeren Komplexität aufweisen. Da Tumorzellen nach zweidimensionaler Kultivierung als Monolayer teilweise bestimmte Tumoreigenschaften verlieren, rückten multizelluläre Systeme wie z.B. Sphäroide in den Vordergrund. Aufgrund ihres dreidimensionalen Wachstums und den daraus resultierenden Eigenschaften stellen sie ein Zwischenglied zwischen der Monolayerkultur und den soliden Tumoren dar.

1.1 Physikalische und biologische Grundlagen der Strahlenwirkung

1.1.1 Ionisierende Strahlung

Wird Materie ionisierender Strahlung ausgesetzt, kommt es durch die Energieaufnahme zu Anregungs- und Ionisationsereignissen. Bei der Anregung geht ein Atom auf ein höheres Energieniveau über, während es bei der Ionisation zur Herauslösung von Elektronen aus dem Atom- oder Molekülverband kommt. Ionisierende Strahlung lässt sich in elektromagnetische Strahlung, auch Photonen- oder Quantenstrahlung bezeichnet, und Teilchenstrahlung unterscheiden. Zur ionisierenden Photonenstrahlung gehören die Röntgen- und Gamma-Strahlung. Bei der Teilchenstrahlung differenziert man zwischen ungeladenen Teilchen (Neutronen) und geladenen Teilchen wie Elektronen, Protonen und Schwerionen. Der Begriff „Schwerionen“ bezieht sich auf die große Masse der Ionen in Bezug auf die leichten Elektronen oder Protonen. In der Strahlentherapie bezeichnet man alle Ionen, die schwerer als Wasserstoff sind, als Schwerionen.

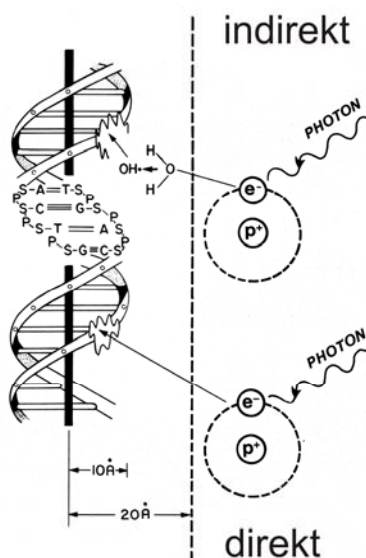


Abb. 1: Schematische Darstellung direkter und indirekter Wirkung von Bestrahlung (Hall 1978)

Bei der Wirkung ionisierender Strahlung kann man zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung unterscheiden. Von einer direkten Strahlenwirkung spricht man, wenn die Energieabsorption und die Wirkung der Strahlung im gleichen Molekül erfolgt, wie z.B. der DNA in biologischen Systemen. Findet die Energieabsorption in einem anderen Molekül statt als die Wirkung der Strahlung, dann spricht man von einer indirekten Wirkung der Strahlung. In biologischen Systemen, die zu etwa 80 % aus Wasser bestehen, wird häufig das Wasser ionisiert. Das führt zu verschiedenen kurzlebigen Radikalen wie z.B. den OH-Radikalen oder der Entstehung von Peroxiden, die nach Diffusion mit der DNA weiterreagieren. Zur graphischen Verdeutlichung dient Abbildung 1.

Die Photonenstrahlung gibt ihre Energie über Photo-Effekt, Compton-Effekt und Paarbildung an das absorbierende Material ab. Beim Photo-Effekt erfolgt die vollständige Energieabgabe eines Photons an ein Elektron eines Atoms einer inneren Schale und bewirkt die Herauslösung aus der Hülle. Bei der Streuung eines Photons an einem Elektron spricht man vom Compton-Effekt. Das bedeutet, dass ein Teil der Photonenenergie an ein locker gebundenes Elektron (äußere Schale) als kinetische Energie abgegeben wird und das Photon mit der verbleibenden Energie seine Richtung ändert. Das Photon kann weiter mit Elektronen wechselwirken, während

das beschleunigte Elektron selber Ionisationen hervorrufen kann. Wenn die Energie des Photons zweimal größer als die Ruheenergie des Elektrons ist, erzeugt das Photon ein Paar aus Elektron und Positron. Diesen Effekt nennt man Paarbildung, bei dem es zur „Materialisierung“ eines Photons kommt. Bei geringer Energie spielen Compton- und Photo-Effekt und bei höheren Energien die Paarbildung eine wesentliche Rolle. Bei allen drei Effekten bewirken sekundäre Elektronen und Radikale weitere Ionisationsereignisse.

Die verschiedenen Strahlenarten unterscheiden sich sowohl in Bezug auf die makroskopische als auch mikroskopische Verteilung der Energiedeposition. Eine vergleichende Betrachtung von Photonen- und Teilchenstrahlung ist in Abbildung 2 zu finden.

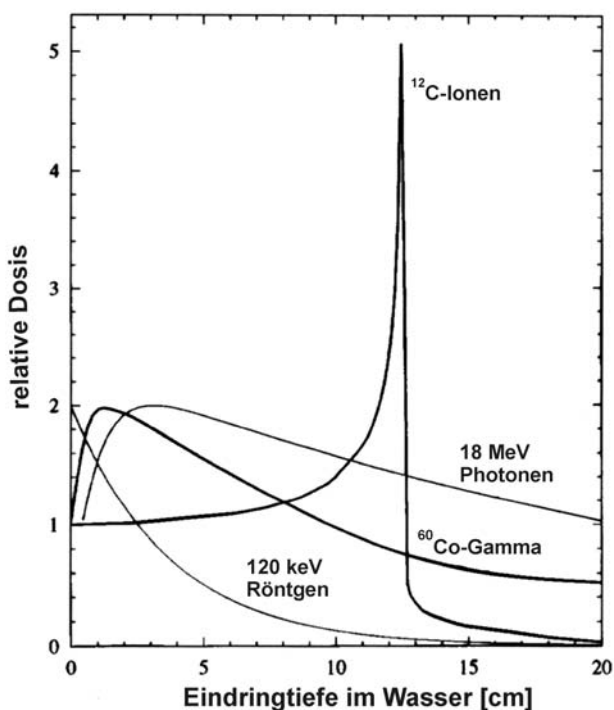


Abb. 2: Tiefendosisprofil von Photonen- und Teilchenstrahlung (Kraft 1998)

Hochenergetische Photonenstrahlung zeichnet sich nach einem anfänglichen Anstieg durch eine exponentielle Abnahme der Energiedosis mit der Eindringtiefe aus. Es liegt eine hohe Seitenstreuung durch Sekundärelektronen vor. Geladene Teilchen (z.B. ¹²C-Ionen) hingegen verlieren ihre Energie über Coulomb-Wechselwirkungen durch Stöße mit den Elektronen der Atomhülle. Dieser Energieverlust erfolgt in kleinen Schritten und ist abhängig von der effektiven Ladung des Teilchens, also von der Ordnungszahl, der Geschwindigkeit sowie der Elektronendichte des Targets. Je langsamer ein Teilchen

wird, desto mehr Wechselwirkungen kann es mit den Elektronen des Targets eingehen. Die Energiedeposition ist umgekehrt proportional zum Quadrat der Geschwindigkeit. Kurz vor dem Ende der Reichweite kommt es zu einer starken Energieabgabe des Teilchens. Dieses scharfe Maximum nennt man Bragg-Peak. Bei weiterer Abnahme der Geschwindigkeit können die Ionen Elektronen aus der Umgebung einfangen, so dass ihre effektive Ladung weiter sinkt. Im Gegensatz zur Photonenstrahlung zeigt die Teilchenstrahlung eine geringe Seitenstreuung, da die Ablenkung der Ionen durch die wesentlich leichteren Elektronen gering ist. Seltener finden Wechselwirkungen der geladenen Teilchen mit den Atomkernen des Targets statt, die zur

Bildung von leichteren Fragmenten und Neutronen führen. Diese sorgen für eine geringfügige Dosisbelastung hinter dem Bragg-Peak (Kraft 1998).

1.1.2 Linearer Energie-Transfer (LET)

Die Häufigkeit von Ionisationsereignissen kann mit Hilfe des linearen Energietransfers (LET) beschrieben werden. Er ist definiert als die abgegebene Energie (mittlerer Energieverlust ΔE) in Abhängigkeit der zurückgelegten Wegstrecke (Δs):

$$(1) \quad \text{LET} = \frac{\Delta E}{\Delta s} \quad \left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right]$$

Wenn Partikel Energie verlieren und sich somit verlangsamen, können sie mehr Wechselwirkungen mit der Materie eingehen und der LET steigt. Ebenso nimmt die Dichte der Ereignisse der Energieabgabe entlang einer Partikelspur zu. Das bedeutet also, dass bei großem LET die Abstände zwischen den Ionisationsereignissen klein sind. Als dünn ionisierende Strahlung mit einem niedrigen LET gilt die Photonenstrahlung (200 keV Röntgen: $\text{LET} = 2,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$; ^{60}Co - γ -Strahlen mit einer Energie von 1,25 MeV: $\text{LET} = 0,3 \text{ keV}/\mu\text{m}$), als dicht ionisierende Strahlung ist die Teilchenstrahlung anzusehen (Protonen mit einer Energie von 2 MeV: $\text{LET} = 17 \text{ keV}/\mu\text{m}$; α -Strahlen mit einer Energie von 5 MeV: $\text{LET} = 90 \text{ keV}/\mu\text{m}$) (Hermann und Baumann 1997). In Abbildung 3, die von PD Dr. M. Scholz zur Verfügung gestellt wurde, sind die Ionisationsereignisse von dünn und dicht ionisierender Strahlung schematisch dargestellt. Bei der Hoch-LET-Strahlung (Kohlenstoffionen) erkennt man gut die hohe Konzentration der Ionisationsereignisse entlang der Strahlbahn. Befindet sich die Strahlbahn im Bereich der DNA, erfolgen dort massive Schädigungen. Im Vergleich dazu sind die Ionisationen der Niedrig-LET-Strahlung (Röntgenstrahlung) in einem großen Bereich relativ gleichmäßig verteilt. So liegen nur vereinzelte DNA-Schäden vor. Strahlung mit höherem LET weist in der Regel eine größere biologische Wirkung auf.

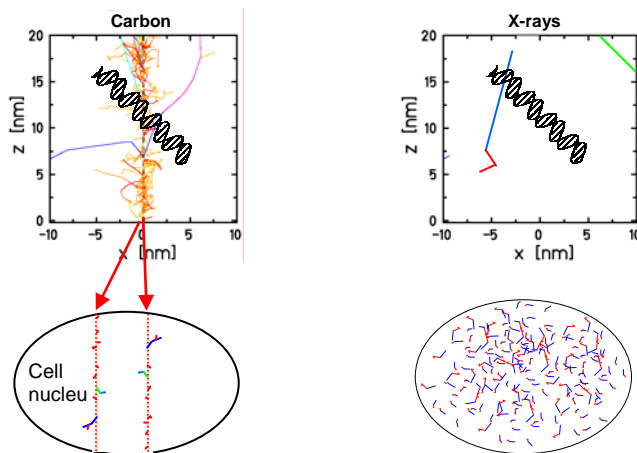


Abb. 3: Ionisationsereignisse nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Hoch-LET) und Röntgenstrahlung (Niedrig-LET);
Abbildung von PD Dr. M. Scholz zur Verfügung gestellt

Die Einführung des Begriffs Dosis diente zur Quantifizierung der Ionisationen. Die Dosis ist definiert als die absorbierte Energie pro Masseinheit:

$$(2) \quad \text{Dosis} = \frac{\text{absorbierte Energie}}{\text{Masse}} \quad \left[\frac{\text{J}}{\text{kg}} = \text{Gy} \right]$$

Die Einheit der Dosis ist Gy, wobei die ältere Einheit rad = 0,01 Gy entspricht.

1.1.3 Zellschäden nach Bestrahlung

Ionisierende Strahlung oxidiert die meisten anorganischen Verbindungen. Aber es finden auch Veränderungen organischer Verbindungen statt. So bewirkt die Oxidation von Aminosäuren mit SH-Gruppen die Bildung von Disulfidbrücken. Die Folge davon sind denaturierte Proteine, die auch durch Bruch der Peptidbindungen entstehen können. Veränderungen an Proteinen sind weniger schwerwiegend, da sie mehrfach in der Zelle vorkommen und neu synthetisiert werden können. Strahleneinwirkungen auf Membranen führen zu Permeabilitätsstörungen und dadurch zur Anschwellung der Organellen, aber auch zur Vakuolenbildung. Schäden an den Kernmembranen bewirken ein Anschwellen der Kerne und Chromatinverklumpungen. Bei höheren Dosen kommt es zur Pyknose (Verdichtung des Chromatins bei Schrumpfung des Kernvolumens) und Karyolyse und somit zum Absterben der Zellen. In den Mitochondrien verursacht die Bestrahlung eine Fragmentierung und Veränderungen der Cristae mitochondrialis. Damit einher geht die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Das endoplasmatische Retikulum trägt weniger Ribosomen, was erneut die Proteinsynthese verlangsamt (Erbar 2000).

Die kritischste Struktur biologischer Systeme stellt jedoch die DNA dar, da die genetische Information nur einmal in der Zelle vorkommt und deren Zerstörung letale Folgen haben kann.

Schädigungen der DNA können Veränderungen oder Eliminierung der Basen, Einzel- und Doppelstrangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat, gehäufte Läsionen und kovalente Bindung von Proteinen an die DNA sein. Liegen Schäden in der DNA vor, kommt es sekundär natürlich auch zu Einschränkungen der RNA- und Proteinsynthese (Erbar 2000). Nach Bestrahlung beobachtet man Verzögerungen des Zellzyklus, aber auch Mutationen, Genaktivierungen, Zelldifferenzierung (z.B. von Fibroblasten) und Zelltod.

1.1.4 Zellzyklus

Man unterscheidet nicht proliferierende von sich aktiv teilenden Zellen. Erstere befinden sich in der so genannten G₀-Phase oder „Ruhephase“. Die „ruhenden“ Zellen sind noch teilungsfähig und können in den Zellzyklus zurückkehren. Die sich teilenden Zellen durchlaufen einen geordneten Zyklus (siehe Abb. 4). Er beginnt mit der G₁-Phase, mit einfachem Chromosomensatz, über die DNA-Synthesephase (S-Phase), in der die DNA-Verdoppelung stattfindet. Es schließt sich die G₂-Phase an, in der nun der doppelte Chromosomensatz vorliegt und die Vorbereitung der Mitose (M-Phase) abläuft. Die Aufteilung der Zelle in zwei Tochterzellen bildet in der M-Phase den Abschluss, bevor ein neuer Teilungszyklus beginnt.

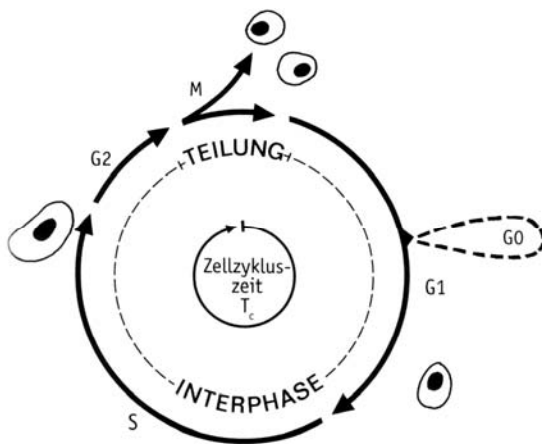


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Zellzyklus (Hermann und Baumann 1997)

Der Zellzyklus ist streng reguliert durch ein Zusammenspiel von drei Proteinklassen, die ein oszillierendes System bilden. Dazu gehören die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs), die aktivierenden Cycline und die Inhibitoren der CDKs. An Kontrollpunkten finden Rückkopplungen statt, ob alle Prozesse korrekt abgelaufen sind und welche externen Wachstumsbedingungen vorliegen. Bei Nichterfüllung aller Kriterien zum Fortsetzen des Zellzyklus arretieren die Zellen bis zur Aufhebung dieser Limitierungen. Das Auftreten von DNA-Schäden nach der Bestrahlung wird an der Verzögerung der Zellteilung sichtbar. Nach ionisierender Strahlung gehen die Zellen in einen Arrest in der G₁-Phase und G₂-Phase. Der G₁-Arrest ist abhängig vom Tumorsuppressorgen p53, wogegen die G₂-Arrest auch in Abwesenheit des p53-Wildtyps

erfolgen kann (Kuerbitz et al. 1992). Eine Vielzahl der epithelialen Tumoren weisen Mutationen im p53-Gen auf. Daraus resultiert häufig der Verlust der Blockierung der Zellen in der G1-Phase, weshalb dem G2-Arrest eine größere Bedeutung zukommt. Durch die Verzögerungen des Zellzyklus gewinnt die Zelle Zeit, ihre DNA-Schäden zu reparieren.

1.1.5 DNA-Reparatur

Wie bereits erwähnt können die verschiedensten DNA-Schäden auftreten. Je nach Schadensart treten unterschiedliche Reparaturmechanismen in Erscheinung. So erfolgt bei Basen- und Nukleotidschäden sowie bei Einzelstrangbrüchen die Exzisionsreparatur, da immer ein intakter DNA-Strang als Vorlage zur Verfügung steht. Die kritischen Strahlenschäden der DNA stellen jedoch die DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) dar. Nach einer Dosis von 1 Gy treten in einer Zelle an der DNA etwa 1000 Einzelstrangbrüche (SSB), 30-40 Doppelstrangbrüche, 50 DNA-Protein-Interaktionen sowie 60 komplexe Brüche (SSB und Basenläsionen) auf (Jenner et al. 1998, Newman et al. 2000, Jenner et al. 2001).

Neben den exogen verursachten DNA-Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika, wie z.B. Bleomycin und Etoposid, entstehen auch Strangbrüche während des normalen Metabolismus der Zelle. So beträgt die spontane Rate von endogenen Doppelstrangbrüchen etwa 50 Brüche je Zelle und Zellzyklus, verursacht durch das Stehenbleiben oder den Zusammenbruch der Replikationsgabel. Die Hauptreparatur dieser Replikations-assoziierten Doppelstrangbrüche ist die Homologe Rekombination (HR) (Willers et al. 2004). Sie ist eine langsame, aber fehlerfreie Reparatur. Dabei wird mit Hilfe der homologen DNA des Schwesterchromatids und unter Beteiligung des Rad51-Proteinkomplexes die Originalsequenz wieder hergestellt. Zunächst findet am Doppelstrangbruch durch Nukleasen und Helikasen ein Prozessieren der DNA zu Einzelstrangregionen mit 3'OH-Überhängen statt. Nach Bindung des Rad51 an diese einzelsträngige DNA bildet sich ein Nukleoproteinfilament, das nach dem homologen DNA-Abschnitt sucht. Es schließen sich Strangaustauschereignisse an, bei denen es zur Hybridisierung des intakten homologen Stranges mit dem jeweiligen 3'-Überhang der geschädigten DNA kommt. Nach dem Auffüllen der Lücken durch die DNA-Polymerase schließt sich die Ligation sowie die Auflösung der DNA-Überkreuzungen (Holliday junctions) an (Kanaar et al. 1998, Khanna und Jackson 2001).

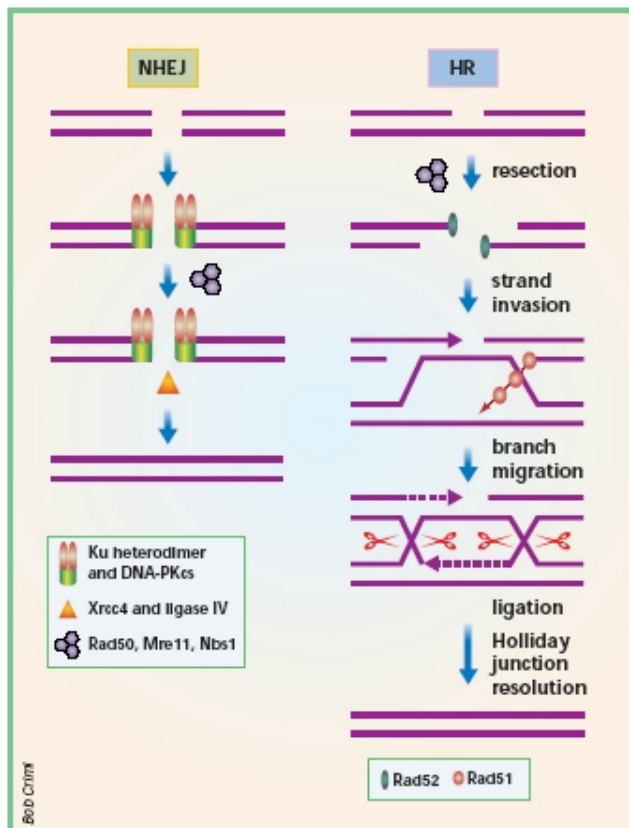


Abb. 5: DSB-Reparaturwege aus (Khanna und Jackson 2001)

bringen der DNA-Enden erfolgt eine Strukturänderung des Komplexes. Später im Reparaturprozess enthält der Komplex weitere Proteine (Rad50, MRE11, NBS1), welche wahrscheinlich die DNA-Enden prozessieren. Die Ligation der Enden bewirkt der Komplex aus DNA-Ligase IV und XRCC4 (Kanaar et al. 1998). Bei der NHEJ kommt es in der Regel zu einem Verlust kleiner DNA-Sequenzen. Die Zellen benötigen diesen ungenauen Reparaturweg, um die Vielfaltigkeit des Immunsystems durch Verknüpfungen von DNA-Segmenten während der V(D)J-Rekombination zu gewährleisten (Kanaar et al. 1998). Auch kodiert nur ein kleiner Teil des Genoms für Gene und regulatorische Bereiche, so dass die eventuell entstehenden Änderungen der DNA-Sequenz weniger ins Gewicht fallen als unreparierte Doppelstrangbrüche. Diese verursachen Chromosomenaberrationen (z.B. Translokationen, Deletionen) und letztendlich den Zelltod. Eine graphische Übersicht der beiden beschriebenen Reparaturwege ist in Abbildung 5 zu finden.

Mutationen im NHEJ-Reparaturweg führen zu einer höheren Hypersensitivität gegenüber Bestrahlung als bei Mutationen im HR-Weg. Daraus schlussfolgert man, dass die NHEJ der Hauptreparaturweg von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen bei Säugern ist. Die NHEJ findet in allen Zellzyklusphasen statt, wohingegen die Homologe Rekombination in der S- und G2-Phase abläuft (Willers et al. 2004).

Einen anderen Mechanismus der DSB-Reparatur stellt die nicht-homologe Endverknüpfung (non homologous end joining, NHEJ) dar. Bei diesem schnell ablaufenden Prozess sind kaum Homologien notwendig, da die Bruchenden direkt miteinander ligiert werden. Daran sind die DNA-abhängige Protein-kinase (DNA-PK) und das Ku-Heterodimer aus den Proteinen Ku70 und Ku80 beteiligt. Letztere binden an die Enden der DNA, welche damit die DNA vor der nukleolytischen Degradation schützen. Gleichzeitig rekrutieren sie die katalytische Untereinheit von DNA-PK (DNA-PKcs) und erhöhen ihre katalytische Aktivität. Durch das Zusammen-

Kann eine Zelle ihre Schäden in der DNA nicht reparieren, bleibt der Zellzyklusarrest aufrechterhalten oder es setzt die Induktion der Apoptose ein. Durch Fehlreparaturen kommt es zu Mutationen oder Chromosomenaberrationen.

1.1.6 Zelltod

Man unterscheidet zwei Mechanismen des Zelltods: die Nekrose und die Apoptose. Die Nekrose, zum Teil auch „Unfalltod“ genannt, ist ein pathologischer Prozess nach physikalischer oder chemischer Einwirkung. Es kommt dabei zum Anschwellen der Zellen, zu Veränderungen der Mitochondrien und zur Zerstörung der Membranintegrität. Die Folge davon ist die Freisetzung der Zellbestandteile in den Extrazellularraum, was wiederum eine Entzündungsreaktion hervorruft. Im Gegensatz dazu spricht man bei der Apoptose vom programmierten Zelltod. Hier liegt ein physiologischer Prozess vor, bei dem nicht mehr benötigte oder geschädigte Zellen durch normale biologische Prozesse entfernt werden. Es kommt zur Kondensation des Chromatins und zur Abschnürung kleiner Zellfragmente, den apoptotischen Körperchen. Die Membran bleibt dabei aber intakt. Umliegende Zellen phagozytieren die apoptotischen Körperchen und degradieren sie intrazellulär (Abend und van Beuningen 1998).

Nach Bestrahlung ist neben dem eigentlichen Zelltod durch Nekrose oder Apoptose der klonogene oder auch reproduktive Zelltod von Bedeutung. Dabei verliert die Zelle die Fähigkeit, sich zu teilen, was besonders bei Tumorzellen mit prinzipiell unbegrenzter Teilungsfähigkeit an Bedeutung gewinnt. Mit Hilfe des Koloniebildungstests, auch als Plating Efficiency (PE) bezeichnet, bestimmt man die Fähigkeit der Zellen, als „Stammzelle“ von Zellklonen zu wirken. Zellen gelten als klonogen, wenn sie mehr als 6-mal den Zellzyklus durchlaufen und somit Kolonien von mehr als 50 Zellen bilden können. Die PE ist charakterisiert durch das Verhältnis der ausgezählten Kolonien und der eingesäten Zellzahl. Das relative Zellüberleben S (S von survival) ergibt sich dann aus dem Quotienten der PE nach Bestrahlung und der PE unbestrahlter Zellen („Kontrolle“). Trägt man das relative Überleben halblogarithmisch gegen die Dosis auf, erhält man die so genannten Überlebenskurven. Diese Dosis-Effekt-Kurven sind durch folgende linear-quadratische Beziehung charakterisiert:

$$(3) \quad \ln S = -\alpha D - \beta D^2$$

mit den Parametern α [Gy^{-1}] und β [Gy^{-2}] und der Dosis D . Der Term $-\alpha D$ symbolisiert die lineare Komponente und damit die Anfangssteigung der Überlebenskurve. Der quadratische Term $-\beta D^2$ beschreibt die Krümmung (Schulter) der Kurve. Für die Beschreibung der Ausprägung der Schulter ist das α/β -Verhältnis [Gy] wichtig. Ist das Verhältnis groß, überwiegt die

lineare Komponente der Zellabtötung und die Schulter ist klein. Im Extremfall liegt eine rein exponentielle Form der Überlebenskurve ohne Schulter vor. Ist das α/β -Verhältnis klein, tritt die Krümmung in den Vordergrund und die Schulter ist groß. Der Quotient aus α und β ist also ein Maß für die biologische Wirksamkeit der Strahlung. Er steigt, wenn die biologische Wirksamkeit der Strahlung zunimmt.

1.1.7 Relative biologische Wirksamkeit

Verschiedene Strahlungsarten können bei der gleichen Dosis eine andere biologische Wirkung haben. Dem Vergleich der unterschiedlichen Strahlungen diene die Einführung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW). Sie ist definiert durch das Verhältnis der Dosis von Referenzstrahlung, üblicherweise 250 kV-Röntgen oder ^{60}Co - γ -Strahlen, und Teststrahlung, bei Erzielung des gleichen biologischen Effekts, z. B. das 10%ige Überleben.

1.2 Besonderheiten der Tumorphysiologie

In Hinblick auf die Strahlentherapie richtet sich das wissenschaftliche Interesse zunehmend auf die Tumorphysiologie. Das Tumorwachstum verläuft in mehreren Phasen. Nach dem exponentiellen Wachstum entarteter Zellen zwischen oder in der Nähe von Blutgefäßen des Tumors folgt eine Phase, bei der es zum Abfall der Wachstumsrate kommt. Dabei reduziert sich die Zahl der sich teilenden Zellen und der Anteil der ruhenden Zellen (G_0 -Phase) steigt. Die proliferierenden Zellen sind in wenigen Zellschichten um die Blutgefäße lokalisiert. Mit zunehmender Entfernung vom Blutgefäß herrschen ruhende und nekrotische Zellen vor (Sutherland 1988). Da bis zu diesem Zeitpunkt die Versorgung ausschließlich über die Diffusion aus den Wirtsgefäßen erfolgt, existiert somit ein Gradient abnehmender Nährstoff- und Sauerstoff-Konzentrationen. Mit zunehmender Entfernung von der Blutversorgung und in entgegengesetzter Richtung bildet sich ein Anstieg von CO_2 und anderen Stoffwechselprodukten heraus. Erst mit Beginn der Tumorneovaskularisation und damit der Verbesserung der Ver- und Entsorgung der Tumorzellen kann ein erneutes exponentielles Wachstum eintreten (Mueller-Klieser 1987).

Die im Tumor gebildeten Blutgefäße unterscheiden sich stark von der normalen Vaskularisation. Normale Blutgefäße sind meist gleichmäßig über das Gewebsvolumen verteilt und weisen eine geordnete, hierarchische Struktur auf. Sie gewährleisten in allen Bereichen des Körpers eine ausreichende Versorgung des Gewebes. Im Gegensatz dazu sind die vom Tumor gebildeten Gefäße räumlich ungleichmäßig verteilt. Sie sind oft mäandrisch gewunden, mit variablen Durchmesser oder blinden Endigungen. Zusätzlich kann sich die Strömungsrichtung ändern, oder die Gefäße werden überhaupt nicht durchströmt. Die Gefäßwände sind aufgrund des

Fehlens eines intakten Endothels zum Teil durchlässig. Dadurch kommt es zum Austritt von Blutbestandteilen in das Tumorgewebe. Das bewirkt eine Verdickung des Blutes sowie einen Anstieg des interstitiellen Drucks. Als Folge der ungleichmäßigen Blutversorgung existieren Tumorbereiche mit temporärer oder chronischer Unter- bzw. Überversorgung (Jain 1994, Konerding et al. 2001).

1.2.1 Multizelluläre Systeme

Zahlreiche Zelllinien bilden nach Kultivierung ohne Adhäsionsmöglichkeit (z.B. auf mikrobiologischen Petrischalen oder als gerührte Suspensionskulturen) multizelluläre Strukturen. Es entstehen kleine Zellaggregate, die zu kugeligen Gebilden heranwachsen. Diese nennt man „multizelluläre Sphäroide“ (aus dem Englischen: „multicellular spheroids“). Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 6 dargestellt.

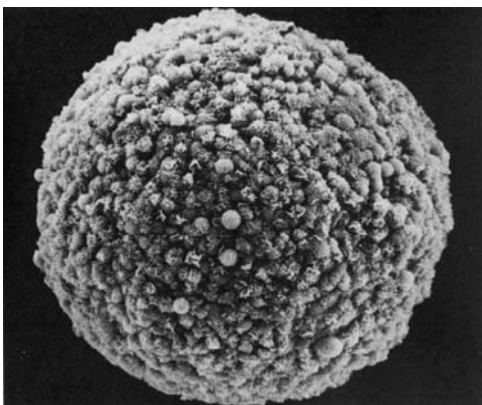


Abb. 6: elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sphäroids aus mehreren Millionen V79-Zellen [Aufnahme von R.E. Sutherland in (Hall 1978) Abb. 12-7]

Diese Aggregate entwickeln sich ausgehend von einer sich teilenden Zelle oder durch Haftung mehrerer Zellen aneinander. Der äußere Teil des Sphäroids entspricht den proliferierenden Zellen im Tumor, die sich in der Nähe zu den Blutgefäßen befinden. Wie im Tumor entstehen mit größerer Entfernung von den versorgenden Gefäßen bzw. vom Nährmedium in der Umgebung des Sphäroids Gradienten von Sauerstoff, Nährstoffen, Kohlendioxid und anderen Stoffwechselprodukten. Mit Abnahme der Versorgung hören die Zellen auf zu proliferieren und gehen in den Ruhezustand (G0-Phase) über. Bei zu schlechter Versorgung, als Zusammenspiel verschiedener Faktoren, entwickeln sich Nekrosen durch absterbende Zellen (Sutherland 1988). Es kommt zur Herausbildung von drei Regionen: die proliferierende Population an der Peripherie, die mittlere Zone der ruhenden Zellen und der innere nekrotische Bereich (siehe Abb. 7).

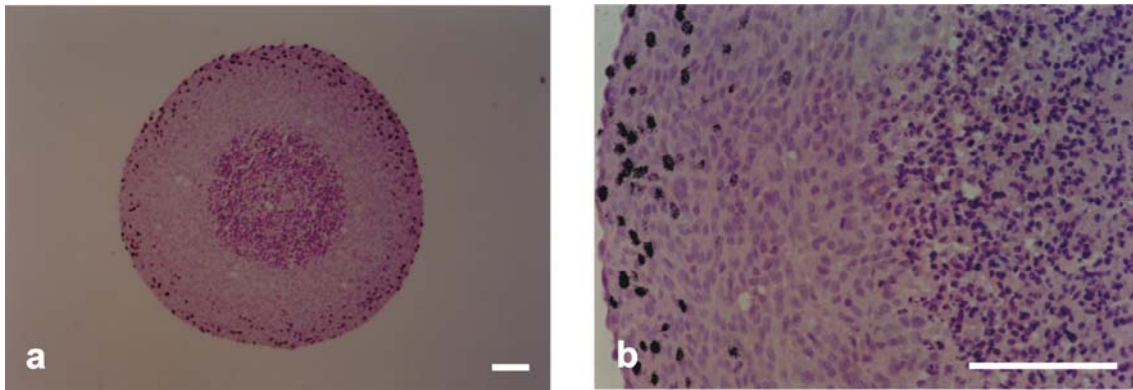


Abb. 7: Paraffinschnitte von ^3H -Thymidin-pulsmarkierten Rat1-T1-Sphäroiden und anschließender HE-Färbung (Balken entspricht 100 μm)

a: Sphäroid-Durchmesser von 751-950 μm (Kunz 1992) Abb. 3-45c

b: Sphäroid-Durchmesser von 951-1150 μm (Kunz 1992) Abb. 3-43d

Sphäroide zeigen im Gegensatz zu der entsprechenden Monolayerkultur viele Ähnlichkeiten von soliden Tumoren. Neben den eben genannten Gemeinsamkeiten der diffusionsbedingten Heterogenität kann es je nach Zelltyp beispielsweise zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix oder zur Sekretion von Hormonen kommen. Die Sphäroide sind daher als in vivo-näheres Modell anzusehen im Vergleich zu Monolayerkulturen. Mit Hilfe der Sphäroide wurden Untersuchungen zur Angiogenese, Invasion und Metastasierung, Embryogenese, aber auch zur Chemo- und Radiotherapie durchgeführt [ausgiebige Übersichten in (Mueller-Klieser 1987, Sutherland 1988, Mueller-Klieser 2000)].

1.2.2 Kontakteffekt

Etwa 40 % der Zelllinien entwickeln nach der Kultivierung als Sphäroide eine höhere Resistenz hinsichtlich ionisierender Bestrahlung und Chemotherapeutika als die entsprechenden Monolayer (Freyer 1992). Dieser Effekt wurde als „Kontakteffekt“ bezeichnet und erstmalig 1972 von Durand und Sutherland an 24 h alten V79-Sphäroiden beschrieben. Zur Ausbildung des Kontakteffektes benötigten die Zellen mindestens zwei Zellteilungen im dreidimensionalen Verband (Durand und Sutherland 1972). Durand und Olive fassten Beobachtungen vieler Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet zusammen (Olive und Durand 1994, Durand und Olive 2001). Als mögliche Erklärungen für die multizelluläre Resistenz dienten Unterschiede in der interzellulären Kommunikation, Veränderungen der Kernform und DNA-Verpackung sowie effizientere DNA-Reparatur. Bei direktem Zell-Zell-Kontakt kommt als möglicher Weg für die interzelluläre Kommunikation vor allem die Verbindung über gap junctions in Frage. Doch Untersuchungen zeigten, dass viele transformierte Zellen weniger gap junctions besitzen als das entsprechende Normalgewebe (Holder et al. 1993). Auch gingen Malignität und Metastasie-

lungspotential oft einher mit verminderter interzellulärer Kommunikation. Weiterhin beschrieben Durand und Sutherland nur einen allmählichen Verlust der Strahlenresistenz von vereinzelten Sphäroidzellen (Durand und Sutherland 1972). Zwei Gap-junction-defiziente Zelllinien wurden mit Connexin43, einem Hauptprotein der gap junctions, transfiziert. Die EMT-6-Zellen, die keinen Kontakteffekt zeigten, bildeten nach der Transfektion auch keine Kontaktresistenz in den Sphäroiden aus. Während sich bei den C6-Zellen der vorhandene Kontakteffekt nach der Transfektion nicht veränderte (Luo et al. 1997). Somit waren gap junctions scheinbar nicht direkt am Kontakteffekt beteiligt.

Veränderungen der DNA-Verpackung beeinflussen die Reparaturfähigkeit von Zellen. So werden Schäden in transkribierten DNA-Bereichen schneller repariert (Bohr et al. 1987). Weiterhin unterscheidet sich das Überleben von Zellen in Abhängigkeit ihrer Position im Zellzyklus, da es dort zu großen Veränderungen der DNA-Verpackung kommt (Terasimat und Tolmach 1963). Auch konnten Unterschiede bezüglich der Chromatinstruktur zwischen Monolayern und Sphäroiden gefunden werden (Olive und Durand 1994).

Ein weiterer Unterschied besteht in der nahezu runden Form der Sphäroidzellen im Vergleich zu den Monolayerzellen. Dies kann ebenfalls Auswirkungen auf die Zelleigenschaften und Genexpression haben.

1.2.3 Multi Drug Resistance

Bei der Behandlung von Tumoren stellte man fest, dass eine zelluläre Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Reagenzien wie Alkaloiden (Vinblastin, Colchicin, Taxol, Podophyllotoxine) und Antibiotika (Adriamycin, Doxorubicin, Etoposid) die sogenannte „Multi Drug Resistance“ (MDR) auftreten kann. Beteiligt an dieser Resistenz sind Proteine wie das P-Glycoprotein (MDR-1), das Multi Drug Resistance associated-Protein (MRP) und das lung resistance related-Protein (LRP). Diese Proteine erreichen eine reduzierte zelluläre Konzentration der Chemotherapeutika durch aktiven Transport der Chemotherapeutika aus der Zelle (Efflux) heraus. Dies kann durch einen direkten Transport (durch das MDR-1), einen Transport als Chemotherapeutikum-Glutathion-Konjugat (durch das MRP) oder Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma (durch das LRP) erfolgen (Kartner und Ling 1989, Durand und Olive 2001).

Für die höhere Resistenz der Tumoren hinsichtlich Chemotherapeutika sind neben der Entstehung der Multi Drug Resistance auch die limitierte Aufnahme und Diffusion der Substanzen in tiefere Zellschichten verantwortlich. So müssen eine Vielzahl von Barrieren überwunden werden, damit die Chemotherapeutika in ausreichender Konzentration an den Tumorzellen ankommen. Da sich die Substanzen über die Blutbahn verbreiten, gelangen sie aufgrund der gestörten Vaskularisation des Tumors nicht in gefäßlose Tumorbereiche. Weiterhin verhindert der hohe interstitielle Druck im Tumor die Aufnahme der Stoffe aus dem Blut. Auch sind einige

Enzyme im Interstitium in der Lage, chemotherapeutische Substanzen abzubauen, bevor diese in die Tumorzellen gelangen (Jain 1994).

Bei Sphäroiden wurde diese limitierte Aufnahme der Chemotherapeutika sowie die Expression des P-Glycoproteins in tieferen Schichten der Sphäroide gefunden (Mueller-Klieser 1987, Olive und Durand 1994, Hamilton 1998, Mueller-Klieser 2000). Auch gibt es Unterschiede im Ansprechen der Tumorzellen auf die Agentien in Abhängigkeit der Zellzyklusphase, dem pH-Wert oder dem Sauerstoffgehalt.

1.3 Tumorthherapie mit Schwerionen

Ziel der Strahlentherapie ist die effektive Zerstörung des Tumorgewebes. Dabei stellt das Normalgewebe den limitierenden Faktor dar, was vor allem für besonders strahlenempfindliche Bereiche wie Gehirn und Rückenmark oder andere lebenswichtige Organe gilt. Wie in Abbildung 2 verdeutlicht, besitzen Photonenstrahlen in geringer Tiefe eine hohe Dosisdeposition. Diese nimmt exponentiell ab, je weiter die Strahlung in die Tiefe gelangt. Außerdem zeigen die Photonenstrahlen eine relativ starke Seitenstreuung. Das bedeutet bei Tumoren in der Tiefe, dass Normalgewebe, welches sich vor dem Tumor befindet, mehr Strahlung ausgesetzt ist als der Tumor selbst. Weiterhin wird Gewebe hinter dem Tumor, aber auch seitlich liegendes Gewebe mitbestrahlt. Geladene Teilchen hingegen weisen ein inverses Tiefendosisprofil auf. Im Eingangskanal wird wenig, doch kurz vor Ende der Reichweite in einem scharfen Peak der Hauptteil der Energie, hinter diesem Bragg-Peak dann kaum noch Energie freigesetzt. Geladene Teilchen besitzen also eine definierte Reichweite mit wenig Seitenstreuung. Für Kohlenstoffionen bei einer Eindringtiefe von 20 cm beträgt die Streuung 1 mm im Vergleich zu 6 mm von Protonen (Scholz 2000).

Zur Optimierung der Tumorbehandlung mit Teilchen sollte wenig Energieverlust im Normalgewebe im Eingangskanal, auch Plateau bezeichnet, und starke Energiefreigabe im Tumor im Bragg-Peak erfolgen. Dieses Verhältnis ist abhängig von den verwendeten Partikeln. Neben dem Vorteil der besseren Dosis-Konformation bieten schwere Ionen, wie z.B. Kohlenstoffionen, den zusätzlichen Vorteil einer erhöhten relativen biologischen Wirksamkeit (RBW), die vor allem im Bereich des Bragg-Peaks beobachtet wird. So wird für mittelschwere Ionen wie Kohlenstoff ein Optimum der RBW erwartet. Protonen zeigen trotz ähnlichem Verlauf des Bragg-Peaks nur eine minimale Erhöhung der RBW. Schwerere Ionen als Kohlenstoff zeigen einen etwas höheren RBW-Wert im Bragg-Peak, aber dafür auch eine viel höhere RBW im Eingangskanal, was starke Nebenwirkungen nach sich zieht. Weiterhin steigt der Anteil an leichteren Fragmenten, die eine längere Reichweite als die Primärpartikel besitzen. Dadurch sorgen sie für die Strahlaufweitung und Verschmierung des Bragg-Peaks. Die Bestrahlung mit

Kohlenstoffionen stellt die beste Kombination von hoher Effizienz im Zielvolumen und Schonung des Normalgewebes dar (Kraft et al. 1999).

1.3.1 Beschleunigeranlage GSI

Eine Pilotanlage für die Tumorthherapie wurde bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt aufgebaut. Eine Patientenbehandlung findet dort seit 1997 statt. Die Teilchenbeschleunigeranlage in der GSI (Abb. 8) besteht aus einem Linearbeschleuniger (UNILAC), einem Schwerionen-Synchrotron (SIS), einem Experimentier-Speichering (ESR), Strahlverbindungsstrecken sowie den Experimentierplätzen mit dem Patientenstrahlplatz. Der UNILAC ermöglicht Experimente mit niederen Energien und dient als Injektor für den Kreisbeschleuniger.

Die in den Ionenquellen stattfindende Ionisierung der Atome ermöglicht erst die Beschleunigung der entstandenen Ionen. Die Beschleunigung erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst dient ein Zusammenstoß der Ionen mit einem Gasstrahl (Stripper) zur Entziehung weiterer Elektronen. Die damit erzeugte höhere Ladung der Ionen macht eine weitere Beschleunigung möglich. Am Ende des UNILACs können Ionenenergien im Bereich von 2-18 MeV/Nukleon eingestellt werden. Nach einer weiteren Ionisation an einer Kohlenstofffolie gelangen die Ionen in

den Synchrotron-Kreisbeschleuniger (Umfang 216 m). Dort im Vakuumring halten die magnetischen Felder die Ionen auf der Kreisbahn. Die dabei erreichten Energien von bis zu 2 GeV/Nukleon entsprechen Geschwindigkeiten nahe der Lichtgeschwindigkeit (GSI 2003).

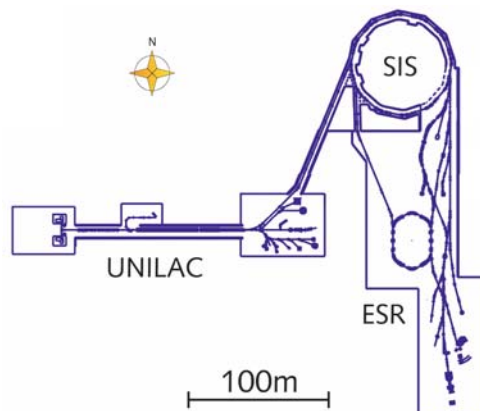


Abb. 8: Grundriss der Beschleunigeranlage (GSI 2004)

1.3.2 Ausgedehnter Bragg-Peak und Raster-Scan-Verfahren

Ein Tumor zeigt eine größere räumliche Ausdehnung als die Breite eines einzelnen Bragg-Peaks. Aus diesem Grund erfolgt die Kombination vieler Bragg-Peaks zu einem „extended“ (ausgedehnten) Bragg-Peak (Abb. 9).

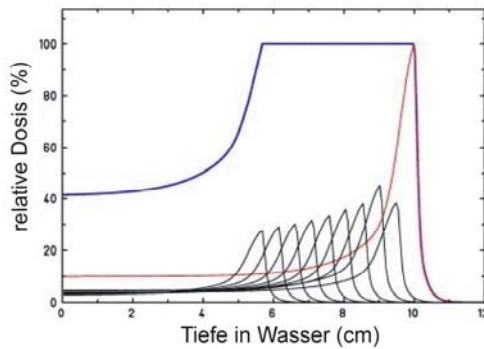


Abb. 9: Schematische Darstellung eines ausgedehnten Bragg-Peaks (Kraft et al. 1997)

Beginnend mit der höchsten Energie wird der Tumor von hinten nach vorn unter Einrechnung der Effekte durch die Dosisüberlagerung der Plateau-Regionen bestrahlt.

Die Entwicklung des Raster-Scan-Verfahrens zur tumorkonformen Bestrahlung (siehe Abb. 10) fand in der GSI statt (Haberer et al. 1993). Dabei wird der Tumor in Schichten gleicher Reichweite aufgeteilt und jede Schicht Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgefahren. Zwei Dipolmagneten ermöglichen die horizontalen und vertikalen Bewegungen des Strahls. Die Bewegung in die Tiefe, also der Sprung zur nächsten Schicht, erfolgt über die Variation der Energie des Beschleunigers.

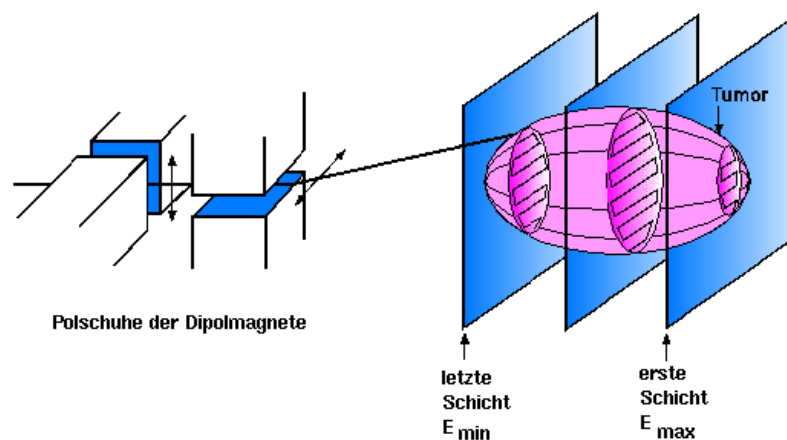


Abb. 10: Schematische Darstellung des Raster-Scan-Verfahrens (Haberer et al. 1993)

1.3.3 Erhöhte relative biologische Wirksamkeit

Es existiert ein Unterschied zwischen der physikalischen und biologischen Wirksamkeit einer Strahlung. Physikalisch gesehen ist die applizierte Dosis entscheidend. Da jedoch die Zellen über Reparaturmechanismen verfügen, bewirkt nicht jeder Schaden ein Abtöten der Zellen. Bei dünn ionisierender Strahlung ist der LET klein und die Energiedeposition sehr gleichmäßig verteilt. Mit höherem LET entstehen aufgrund der großen räumlichen Nähe der Ionisationsereignisse vorwiegend schwer oder nicht reparierbare Cluster-Brüche. Die Reparaturkapazität ist an

der Form der Überlebenskurven erkennbar. Die schwarze Kurve in der Abbildung 11 symbolisiert das Überleben nach einer Bestrahlung mit niedrigem LET. Man erkennt eine ausgeprägte Schulter und ein allgemein hohes Überleben der Zellen. Mit zunehmendem LET (rote Kurve) ändert sich dieses Aussehen. Der Verlust der Reparaturkapazität geht einher mit dem Verschwinden der Schulter und dem allgemein geringeren Überleben. Diese optimale Umsetzung der Dosis in Zellschädigungen bewirkt das Erreichen der maximalen RBW. Eine weitere Erhöhung des LET wirkt sich biologisch nicht mehr aus. Man spricht von einem Sättigungseffekt.

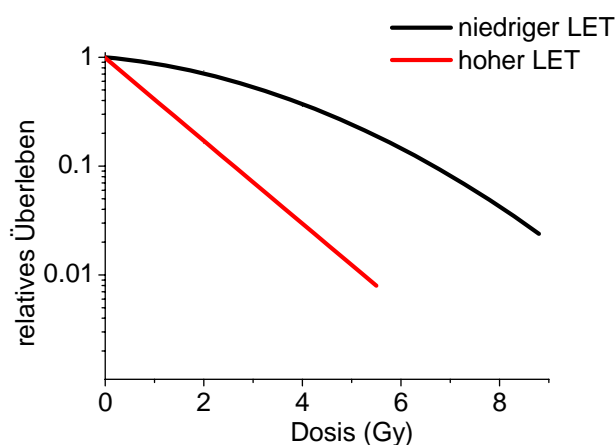


Abb. 11: Dosis-Effekt-Kurven nach Bestrahlung mit niedrigem bzw. hohem LET

1.3.4 Weitere Vorteile der Schwerionenbestrahlung

Die Bestrahlung mit Schwerionen weist zwei unterschiedliche Regionen auf. Einmal den Niedrig-LET-Bereich des Plateaus im Eingangsbereich und den Hoch-LET-Bereich des Bragg-Peaks (Kraft 2000). Im Plateau liegen also ähnliche Bedingungen wie bei Photonenbestrahlung vor. Ersichtlich wird dies anhand der Form der Überlebenskurven. Bei Niedrig-LET-Bestrahlung ist eine ausgeprägte Schulterform charakteristisch, die bei Hoch-LET-Bestrahlung in eine näherungsweise exponentielle Form übergeht. Mit Verschwinden der Schulter geht eine verminderte Reparaturkapazität der Zellen einher. Dies belegte Weyrather et al. (1999) mit drei Hamsterzelllinien. Neben V79- und CHO-K1-Zellen untersuchten sie auch die strahlensensitive Zelllinie xrs5. Diese ist eine Mutante der CHO-K1-Zellen mit einer Defizienz in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, da sie die Ku80-Komponente des DNA-PK-Komplexes der NHEJ nicht besitzt (Weyrather et al. 1999). Ausgehend von den publizierten α - und β -Werten konnten die Überlebenskurven erstellt und in Abbildung 12 dargestellt werden. Nach 250 kV-Röntgenbestrahlung wiesen die reparaturdefizienten xrs5-Zellen aufgrund der nicht vorhandenen Schulter eine rein exponentielle Überlebenskurve auf. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden strahlenresistenten Wildtyp-Zelllinien eine ausgeprägte Schulterform.

Nach Hoch-LET-Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (11 MeV/u: LET=153 keV/μm) war bei allen Zellen das Nichtvorhandensein der Schulter der Überlebenskurven charakteristisch. Die induzierten DNA-Schäden nach Hoch-LET-Strahlung können auch von Reparatur-befähigten Zellen nicht mehr repariert werden. Das Reparaturvermögen hat somit Auswirkungen auf die RBW. Während Zellen mit einer hohen Reparaturfähigkeit nach Hoch-LET-Bestrahlung eine erhöhte RBW aufweisen, ist dies bei radiosensitiven Zellen nicht der Fall (Kraft 2000). Als Beispiel dafür dienen erneut die Daten von Weyrather et al. (1999). Ausgehend von den erstellten Überlebenskurven der Abbildung 12 ergaben sich für das 10%ige Überleben hohe RBW-Werte für V79- und CHO-K1-Zellen von 3,4 und 4,2 und ein niedriger RBW-Wert von 1,5 für die reparaturdefiziente Zellen xrs5.

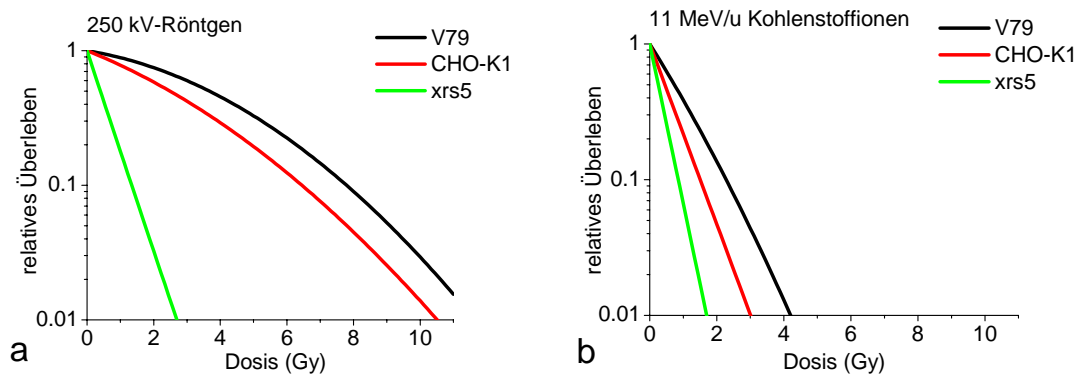


Abb. 12: Dosis-Effekt-Kurven von drei Hamsterzelllinien

V79: Lungenzellen; CHO-K1: Eierstockzellen; xrs5: Mutante von CHO-K1, defizient in DSB-Reparatur (Weyrather et al. 1999)

a: 250 kV-Röntgenstrahlung; b: 11 MeV/u Kohlenstoffionen

Der Sauerstoff-Effekt spielt bei Niedrig-LET-Bestrahlung eine wichtige Rolle. Je mehr Sauerstoff zum Zeitpunkt der Bestrahlung vorhanden ist, desto mehr Sauerstoff-Radikale können gebildet und schädigend wirksam werden. Hypoxische Zellen überleben demnach besser als oxische Zellen. Das Verhältnis der Strahlenempfindlichkeiten von hypoxischen zu oxischen Zellen wird mit dem Oxygen Enhancement Ratio (OER) ausgedrückt und liegt für Niedrig-LET-Strahlung zwischen 2,5 und 3. Nach Hoch-LET-Bestrahlung ist die OER deutlich kleiner. Er nimmt mit zunehmender Kernladungszahl weiter ab (Tobias et al. 1982, Kraft 1990). Staab et al. ermittelten mit V79-Sphäroiden einen OER von 1,4 im ausgedehnten Bragg-Peak von Kohlenstoffionen (Staab et al. 2004). Das bedeutet, dass sich Differenzen zwischen hypoxischen und oxischen Zellen innerhalb eines Tumors bei Hoch-LET-Bestrahlung weniger stark auswirken.

Ähnlich verhält es sich mit der Zellzyklus-Empfindlichkeit. Bei Niedrig-LET-Bestrahlung sind die Zellen nach vorheriger Synchronisation in der späten S-Phase am resistentesten und Zellen in der G2/M-Phase am empfindlichsten (Hall 1978). Diese Differenzen verringern sich bei der Hoch-LET-Strahlung ebenfalls und machen sie effektiver (Tobias et al. 1982, Kraft 1990).

Die Bestrahlung des Tumors erfolgt nicht in einer Gabe als Einzeldosis, sondern durch Aufteilung in mehrere Faktionen. Diese Fraktionierung dient der Erholung des Normalgewebes. Aber auch das Tumorgewebe hat Zeit für Reparaturmechanismen. Deshalb ist die zur Abtötung nötige Gesamtdosis bei fraktionierter Bestrahlung höher als nach Einzeldosisapplikation. Dieser Fraktionierungseffekt ist aufgrund der geringen Belastung des Normalgewebes bei Hoch-LET-Bestrahlung geringer ausgeprägt. Das Fraktionierungsschema kann im Vergleich zur Niedrig-LET-Bestrahlung deutlich verkürzt werden (Kraft 1990).

Aufgrund dieser Ergebnisse eignet sich die Schwerionenbestrahlung besonders gut für die Radiotherapie tiefliegender mangelversorgter Tumoren, da sie bei hypoxischen und langsam wachsenden Tumoren ähnlich gut wie bei oxischen und schnell wachsenden Tumoren unter gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes wirkt.

1.3.5 Aufgabenstellung

In zurückliegenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurden V79-Sphäroide mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen in der GSI Darmstadt bestrahlt (Zukowski 1999). Zur optimalen Versorgung der Sphäroide mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Entfernung von Stoffwechselendprodukten und Kohlendioxid war ein permanentes Rühren der Sphäroide notwendig. Dies galt auch für die Zeit der Bestrahlung, da gerade zu diesem Zeitpunkt ein kurzfristiger Sauerstoffmangel Auswirkungen auf das biologische Überleben haben kann.

Das in der GSI entwickelte Raster-Scan-Verfahren rastert das zu bestrahlende Areal Punkt für Punkt und Zeile für Zeile ab. Bei sich bewegenden Objekten, wie z.B. gerührten Sphäroiden, gibt es ein Problem mit der genauen Applizierung einer bestimmten Dosis. Dies soll anhand der vereinfachten Darstellung in Abbildung 13 genauer erklärt werden. Zu Beginn der Bestrahlung liegen die verschieden farbig kodierten Sphäroide wie im linken Bild verteilt vor. Durch die Bewegung des gerührten Mediums bewegen sich auch die Sphäroide, symbolisiert durch die Pfeile. Die graue Unterlegung in den Bildern b und c stellt das bereits bestrahlte Volumen im Raster-Scan-Verfahren dar. Ein früher Zeitpunkt der Bestrahlung ist im mittleren Bild aufgezeigt. Bis jetzt befand sich nur das rote Sphäroid im Strahl. Es bewegt sich weiter in ein noch zu bestrahlendes Gebiet. Das gelbe, noch unbestrahlte Sphäroid findet sich im bereits bestrahlten Areal ein. Durch die ständige Bewegung der Sphäroide kann es also Sphäroide geben, die einer Bestrahlung vollständig entgehen, indem sie sich in noch nicht oder bereits bestrahlten Areale bewegen. Sie können sich aber auch im Gegensatz dazu so bewegen, dass sie öfter in das zu

bestrahlende Areal gelangen, was anhand der Zahlen in den Sphäroiden im Bild c verdeutlicht werden sollte.

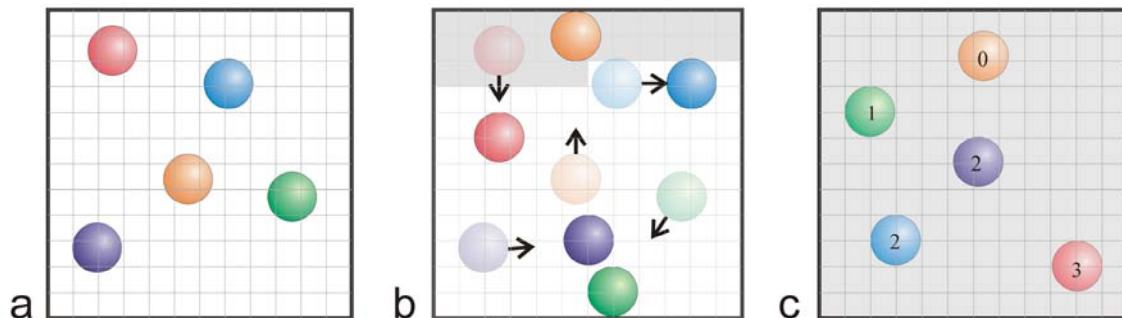


Abb. 13: Schematische Darstellung der Schwerionenbestrahlung der Sphäroide im Raster-Scan-Verfahren, bereits bestrahlte Bereiche grau unterlegt, Bewegung der Sphäroide mit Pfeilen verdeutlicht, Anzahl der „Treffer“ als Ziffern dargestellt

a: Beginn, b: während und c: Ende der Bestrahlung

In der Praxis wurde dieses Problem mit der Applikation der gewünschten Dosis durch mehrfaches Abscannen der Bestrahlungsfläche reduziert. Aber auch in diesem Fall war in der Regel die Homogenität der Dosisapplikation in Bezug auf individuelle Sphäroide nicht so genau wie im Fall ruhender Targets. Daraus resultierte die Notwendigkeit, für die Schwerionenbestrahlung ein dreidimensionales Zellsystem zu etablieren, welches fixiert in das Strahlvolumen eingebracht werden kann. Zwei unabhängige Arbeitsgruppen beschrieben ein dreidimensionales Zellsystem, bei dem die Zellen fixiert auf einer mit Collagen-beschichteten, porösen Membran wachsen. Sie zeigten für unterschiedliche Zelllinien (SiHa, V79-171b, SCCVII) ein Tumor-ähnliches Wachstum mit Herausbildung nekrotischer Regionen (Cowan et al. 1996, Minchinton et al. 1997). Mit Multilayern fanden bisher nur strahlenbiologische Untersuchungen zu Bystander-Effekten statt (Wilson et al. 2002). In dieser Arbeit sollte die Eignung des multizellulären Aufbaus für die Strahlentherapie untersucht werden.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit geklärt werden:

1. Simulieren die Multilayer ähnlich den multizellulären Sphäroiden besser die in vivo-Situation von soliden Tumoren im Vergleich zur Monolayerzellen?
2. Weisen die Multilayer Unterschiede zwischen der Röntgen- und Schwerionenbestrahlung auf?
3. Zeigen sie eine multizelluläre Resistenz?
4. Zeigen verschiedene Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse?

Ergänzende Untersuchungen sollten zur DNA-Reparatur (Rad51-Expression), Zellzyklusverteilung, Induktion der Apoptose sowie zur Migration stattfinden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zelllinien

In der Arbeit kamen die beiden epithelialen Zelllinien WiDr und SiHa zur Verwendung. Die WiDr-Zellen stammen von einer Explantatkultur eines primären Adenokarzinoms des Dickdarms einer 78-jährigen Frau. Sie wurden bei der Zellbank ECACC unter der Referenznummer 85111501 erworben und stellen ein Derivat der Zelllinie HT29 dar. Die WiDr-Zellen sind radioresistent, besitzen eine p53-Mutation im Kodon 273 (His), produzieren das karzinoembryonale Antigen (CEA) und sind tumorigen (ECACC 2004).

Die Kultivierung erfolgte in Minimal Essential Medium (Eagle) mit Earle's Salzen, 2 mM L-Glutamin, 1 % Non Essential Amino Acids (NEA), 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10 % Cosmic Calf-Serum (standardisiertes Serum). Das Passagieren erfolgte bei Erreichen der Konfluenz durch Splitten bzw. Platieren von 1:5-1:10 bzw. $1-2 \times 10^4$ Zellen/cm².

Die von der Zellbank ATCC unter der Nr. HTB-35 gekauften SiHa-Zellen wurden aus einer primären Gewebeprobe nach einer Operation einer Japanerin mit einem schuppenartigen Gebärmutterhalskarzinom etabliert. Die Zellen sind ebenfalls radioresistent, p53-positiv, haben jedoch das humane Papillomavirus vom Typ 16 (HPV-16) ein- bis zweimal pro Zelle integriert (ATCC 2004). Das HPV-16 kodiert für das E6-Protein, welches an das Tumorsuppressorprotein p53 bindet. Dieses ist somit nicht mehr funktional, wird ubiquitiniert und in den Proteasomen abgebaut (Scheffner et al. 1990). Die SiHa-Zellen benötigten das mit zusätzlich 1 % Natriumpyruvat versetzte Medium der WiDr-Zellen. Die Zellen wurden montags und freitags 1:10 gesplittet und erreichten bis dahin jeweils die Konfluenz. Für Experimente an anderen Tagen war eine entsprechende Zelleinsaat notwendig. Das Wachstum beider Zelllinien fand in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Die Sedimentation der Zellen erfolgte bei 1600 rpm für 8 min bei Raumtemperatur.

2.1.2 Monolayer-Kultivierung

Für die Kultivierung der Zellen kamen gewöhnlich Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² zum Einsatz. Für die entsprechenden Experimente fanden andere Flaschengrößen Verwendung. Die genauen Angaben der Wachstumsflächen und Volumenangaben sind in der Tabelle 1 (siehe Anhang) aufgeführt.

Bei der Passagierung sorgte das Spülen der Zellen mit Hanks-EDTA-Puffer für die Entfernung des Serums und der zur Adhäsion benötigten Calcium- und Magnesium-Ionen. Nach Einwir-

kung des Trypsins im Brutschrank lösten sich die abgerundeten Zellen leicht vom Flaschenboden. Das im Medium enthaltenen Serum diente zum Abstoppen der Trypsinwirkung. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren konnten die vereinzelt Zellen direkt in neue Kulturflaschen eingesät werden. Die WiDr-Zellen neigten nach Zugabe des Medium zu Verklumpungen, die sich mit normalem Auf- und Abpipettieren nicht vollständig auflösten. Für einfaches Passagieren machte dies nichts aus. Für eine genaue Einsaat fand eine Überführung der Zellen in ein 15 ml Röhrchen und eine anschließende Zentrifugation bei 1600 rpm für 8 min bei Raumtemperatur statt. Für die Resuspendierung des Pellets mit 1 ml Medium kam eine 1000 µl Pipette zum Einsatz. Es folgte ein Auffüllen auf 10 ml Medium und die Bestimmung der Zellzahl (siehe Abschnitt Zellzählung). Da sich die beiden verwendeten Zelllinien bezüglich ihres Adhäsionsverhaltens deutlich unterscheiden, variierte der Ablösevorgang etwas, wie er in Tabelle 2 (siehe Anhang) genauer beschrieben ist.

2.1.2.1 Langzeitlagerung von Zellen

Für die Kryokonservierung eigneten sich zu etwa 80 % konfluent gewachsene Zellen. Da sich die Zelllinien bezüglich ihrer Adhäsionsrate in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Wachstumsfläche unterschieden, wurden die entsprechenden Verdünnungsfaktoren und die zu erwartende Wachstumszeit beim Einfrieren der Zellen bedacht. Durch eine Verteilung der Zellen aus einer 75 cm²-Flasche auf 4-6 Kryoröhrchen war nach dem Auftauen eines Kryoröhrchens ein gutes Anwachsen der Zellen nach Einsaat in eine 75 cm²-Flasche gewährleistet.

Nach dem bereits beschriebenen Ablösen der Zellen schloss sich eine Zentrifugation bei 4 °C an. Der nächste Schritt bestand aus der vollständigen Entfernung des Überstandes sowie des Rücklaufes mit dem darin enthaltenem Trypsin. Das Zellpellet wurde mit dem auf 4 °C vorgekühlten Einfriermedium (entsprechendes Zellkulturmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert und auf die Kryoröhrchen verteilt. Es folgte das Einstellen der Kryoröhrchen in einen Einfrierbehälter (Nalgene) mit Isopropanol, der ein Grad Celsius pro Minute kühlt, und die Aufbewahrung über Nacht bei -80 °C. Die Überführung der Kryoröhrchen zur längerfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff bildete den Abschluss.

Ebenso wie beim Einfrieren von Zellen erfolgten die Arbeitsschritte beim Auftauvorgang sehr zügig. Nach Vorkühlen der Zentrifuge und 10 ml Wachstumsmedium auf 4 °C wurden die tiefgefrorenen Zellen durch Schwenken im 37 °C warmen Wasserbad soweit aufgetaut, bis sich der verbliebene Eisklumpen im getauten Medium frei bewegte. Nach dem äußerlichen Abwischen des Kryoröhrchens mit 70 % Alkohol diente die Überführung des Inhalts in das vorgekühlte Medium und dem sofortigen Mischen zur Verdünnung der DMSO-Wirkung. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 4 °C für 8 min bei 1600 rpm schloss sich die Entfernung des Überstandes sowie des Rücklaufes an, um das DMSO vollständig zu entfernen. Das Pellet wurde mit

1 ml Medium resuspendiert, in die entsprechende Kulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt. Falls wider Erwarten die Einsaat der Zellen zu dicht oder zu dünn war, folgte ein Umsetzen der Zellen zur Gewährleistung des optimalen Anwachsens in das entsprechend größere oder kleinere Gefäß.

2.1.2.2 Zellzählung

Zur Zellzählung fand das Zellzählgerät Casy II Verwendung. Als Ergebnis eines Messvorgangs lieferte das Gerät die Zellkonzentration (Zellzahl/ml), das mittlere Zellvolumen und den mittleren Zelldurchmesser. Für die Berechnung der Zellkonzentration war die Eingabe des Probenverdünnungsfaktors erforderlich. Danach richtete sich das Mischungsverhältnis der Zellsuspension (1:50-1:100) mit der isotonischen Casyton-Lösung. Zur Gewährleistung des optimalen Arbeitens benötigte das Zellzählgerät eine wöchentliche Reinigung mit CasyClean nach den Anweisungen des Herstellers.

Die Einstellung eines unteren und oberen Durchmesserwerts (Auswertegrenzen) legte den Durchmesserbereich fest, aus dem das Gerät die Daten für die Berechnung der Zellkonzentration und der mittleren Zellgröße entnahm. Die Wahl der Grenzen fiel so, dass nur intakte, lebende Zellen im Auswertebereich lagen. Für die Festlegung der unteren Grenze dienten isolierte Zellkerne, deren Präparation durch 5-minütige Inkubation von 100 µl Zellsuspension mit 400 µl 96 % Ethanol erfolgte. Die Messung konnte nach Zugabe von 10 ml Casyton beginnen. Um gleichzeitig beide Populationen bei der Einstellung der Auswertegrenzen überblicken zu können, diente die Vermischung der Kernfraktion mit der unbehandelten Zellsuspension. Die ermittelten Auswertegrenzen betragen für WiDr-Zellen 10,60-30 µm und für die SiHa-Zellen 10,95-30 µm. In Abhängigkeit der Wachstumsphase der Zellen veränderte sich der Zelldurchmesser, so dass bei jeder Messung die eingestellten Grenzen für die vitalen Zellen kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert wurden.

2.1.2.3 Mycoplasmentest

Es fand eine regelmäßige Untersuchung der Zellkulturüberstände auf Mycoplasmen statt. In der ersten Hälfte der Arbeit war die Überprüfung der Zellkultur durch einen kommerziellen ELISA-Test der Firma Roche gewährleistet. Wegen des relativ hohen Arbeits- und Zeitaufwands dieses Tests wurde dann auf einen schnelleren PCR-Mycoplasmentest der Firma Minerva umgestellt. Zur Verwendung kamen Überstände von mindestens 90 % konfluenten Wochenendkulturen.

Der Kit für die Mycoplasmen-PCR verwendet Primer für das hochkonservierte rRNA-Operon bzw. der 16S rRNA kodierenden Region des Mycoplasma-Genoms. Hiermit können bereits 1-5 fg DNA (entsprechen 2-5 Mycoplasmen) von allen Mycoplasma-, Acholeplasma- und

Ureaplasma-Spezies nachgewiesen werden. Es findet jedoch kein Nachweis von eukaryotischer oder bakterieller DNA statt. Im Kit waren sowohl die Primer und Nucleotide als auch der Reaktionspuffer, die interne PCR-Kontrolle sowie die Positivkontrolle enthalten. Es kam eine Taq-Polymerase von Promega zur Anwendung. Beim Funktionieren der PCR entstand für den Fall der Negativkontrolle nur das spezifische Produkt der internen Kontrolle von 191 bp. Das PCR-Produkt für die Positivkontrolle war ~270 bp groß. Bei Auftragung der PCR-Proben auf ein Agarosegel waren im Mycoplasmen-positiven Fall Doppelbanden möglich. Doch mit Zunahme der Stärke der Mycoplasmenkontamination bildete sich weniger Produkt der internen Kontrolle.

100 µl des Zellkulturüberstandes waren für 5 min bei 99 °C zu inkubieren. Nach anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 s wurde der Überstand direkt in die PCR eingesetzt oder maximal eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt. Das Protokoll von Minerva diente als Anleitung für die Durchführung der PCR und der Gelelektrophorese.

2.1.3 Multilayer-Kultivierung

Für das dreidimensionale Wachstum der Zellen kamen Zellkultureinsätze der Firma Millipore (Millicell Culture Plate Inserts) zum Einsatz, die eine hydrophile Membran aus Polytetrafluorethylen (Teflon) besitzen. Die Membran hat einen Porendurchmesser von 0,4 µm, eine Wachstumsoberfläche von 0,6 cm² und ist in eine Halterung aus Plastik eingebettet. Am Boden befinden sich kleine Abstandshalter, so dass Flüssigkeit an die Unterseite der Membran gelangen kann (siehe Abb. 14).

2.1.3.1 Collagen I – Beschichtung der Millicell-Membran

Die einzeln steril verpackten Zellkultureinsätze wurden unter der Sterilbank ausgepackt und in eine sterile, nicht-adhäsive Petrischale gestellt. Nach dem Überstülpen eines autoklavierten O-Ringes aus Silikon über den Millicell-Einsatz folgte die Beschichtung der Membran des Zellkultureinsatzes mit Collagen Typ I-Gebrauchslösung (siehe Anhang) durch Pipettieren von 2 x 75 µl (1,5 mg/ml). Die Verdunstung des Ethanol unter der Sterilbank dauerte etwa 4-5 h. Die Membranfarbe zeigte eine vollständige Trocknung an, wenn sie von durchsichtig nach weiß umschlug.

2.1.3.2 Zelleinsaat auf die Millicell-Membran

Für die Einsaat der Multilayer kamen exponentiell wachsende Monolayerkulturen zum Einsatz. Dazu war die Ablösung der Zellen wie für die Subkultivierung und eine anschließende Zentri-

fugation und Zellzahlbestimmung erforderlich. Für die Einsaat fanden 7×10^5 Zellen in einem Volumen von 300-400 μl pro Millicell-Einsatz Verwendung. Dabei erfolgte das Pipettieren der Zellsuspension auf die Membran sehr vorsichtig, so dass es zu keinem Wegspülen des Collagens I kam. In einer Petrischale hatten maximal 5 der vorbereiteten Millicell-Einsätze ausreichend Platz. Die Schale wurde mit 10 ml Medium gefüllt, so dass die Unterseite der Membraneinsätze mit der Flüssigkeit bedeckt war, die Einsätze jedoch nicht aufschwammen. Durch das Anheben der Einsätze mit einer sterilen Pinzette konnten Luftblasen unter der Membran mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernen werden. Die Inkubation der Petrischalen über Nacht im Brutschrank gewährleistete ein Absetzen und Anwachsen der Zellen auf der Membran.

2.1.3.3 Sterilisierung der Kulturboxen

Die Herstellung der Multilayer-Kultivierungskammern (Abb. 14), kurz Kulturboxen genannt, fand in der Werkstatt des Institutes für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Mainz statt. Die Verklebung der zugeschnittenen Plexiglas/Acrylglas-Platten mit Silikonkleber erlaubte keine übliche Sterilisation mit Alkohol, Autoklavieren oder UV-Bestrahlung. Die spezielle Reinigungsprozedur beinhaltete das Einlegen der Boxen und der Befestigungseinsätze über Nacht in warmes Spülmittelwasser. Es schloss sich ein ausgiebiges Spülen unter fließendem, warmem Wasser an, bis keine Seifenreste mehr vorhanden waren. Der nächste Schritt bestand in einem erneuten Einlegen über Nacht in Aqua dest. und einem weiteren Spülen der Teile in frischem destilliertem Wasser. Nach dem Trocknen unter der Sterilbank folgte dort der Zusammenbau der Boxen. Dabei wurde der Deckel zugeklappt, aber nicht mit der Schnalle verschlossen. Die in Alufolie eingepackten Boxen verblieben für mindestens 2 Tage im Wärmeschrank bei 60-65 °C.

Die O-Ringe aus Silikon zum Überstülpen über die Millicell-Einsätze wurden mit 70 % Isopropanol gereinigt und in einem kleinen Schraubbehälter autoklaviert. Die verwendeten Magnet-rührerlinge gewährleisteten ein wirbelfreies Rühren. Deren Reinigung erfolgte ebenfalls mit Isopropanol, bevor sie in Alufolie verpackt autoklaviert wurden.

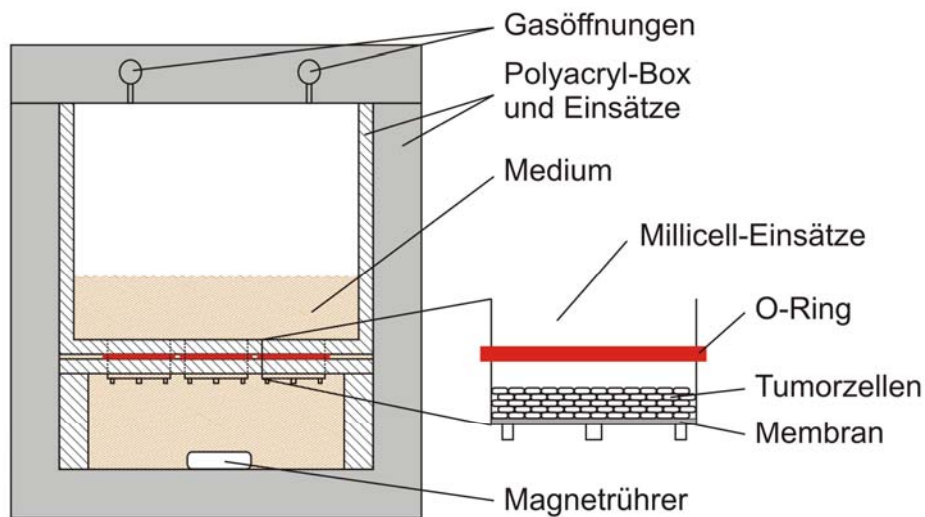


Abb. 14: Schematische Darstellung einer „Kultivierungskammer“ (kurz: „Kulturbox“) für die Multilayer mit Platz für 6 Millicell-Einsätze. Der O-Ring verhindert das Durchfallen der Millicell-Einsätze durch die Acrylhalterungen. Die Metallschnalle zum Verschließen der Box ist in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt.

2.1.3.4 Flutung der Kulturboxen

Zum Einsetzen der Millicell-Einsätze in die Kulturbox wurde diese zunächst aus der Alufolie ausgepackt, der Deckel aufgeklappt und der obere Befestigungseinsatz mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf den Deckel gestellt. Nach dem Hineinlegen eines sterilen Magnetrühringes mit der Pinzette folgte das Pipettieren des Mediums in die Box bis zur Oberkante des unteren Einsatzes. Es schloss sich das Einsetzen der Millicell-Einsätze in die Bohrungen des unteren Befestigungseinsatzes an. Zur Gewährleistung der optimalen Versorgung des Multilayers durften keine Luftblasen unter den Membranen sein. Der vorher übergestülpte O-Ring bewahrte die Millicell-Einsätze vor dem Durchfallen und gewährleistete deren einfache Wiederentnahme. Nach Aufbringen des oberen Befestigungseinsatzes über die Millicell-Einsätze, der sie am Aufschwimmen hinderte, folgte die weitere Befüllung der Box mit Medium bis zu einer Füllhöhe von etwa 4 cm (etwa 120 ml) und das Verschließen des Deckels. Die Boxen wurden im Brutschrank auf einer regulierbaren induktiven Magnetührplatte mit 6 Stellplätzen bei einer Rührgeschwindigkeit von etwa 120 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

In den ersten Experimenten fand die Begasung der Boxen mit einem Gasgemisch von 5 % O₂, 5 % CO₂ und 90 % N₂ (Gasgemisch mit Hilfe einer Gasmischanlage gemischt) auf einer Magnetührplatte in einem trockenen, 37 °C warmen Brutschrank statt. Diese Begasung sollte das Gewebemilieu simulieren. Das Gas gelangte aus der Gasflasche über einen Druckreduzierer und weitere druckmindernde Schlauchübergänge (großer Durchmesser, kleiner Durchmesser, großer

Durchmesser; Eigenbau der Werkstatt des Institutes für Physiologie und Patho-physiologie) in einen Schlauch, von dem 4 Dreiwegehähne abzweigten. Nach Aufstecken von in der Klinik üblichen „Butterflys“ passten die Kanülen in die Anschlußstücke, welche in die Bohrlöcher für die Gasöffnungen hineingeschraubt (unterschiedlich für Gasein- und Gasauslass) wurden. Die Einstellung des Gasdrucks erfolgte über die Dreiwegehähne durch Beobachtung des Aufsteigens der Gasbläschen in kleinen Wasserbechern. Dieses System begaste gleichzeitig mehrere Boxen. Wie sich jedoch zeigte, schwankte die Gasverteilung von Experiment zu Experiment und in Abhängigkeit der angeschlossenen Boxen, so dass von diesem System wieder Abstand genommen wurde.

In späteren Experimenten mit den WiDr-Zellen und bei allen SiHa-Experimenten war die Begasung der Boxen in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank mit Luftsauerstoff (21 % O₂) und 5 % CO₂ – genau wie die Monolayerkulturen – über die unverschlossenen Bohrlöcher gewährleistet. Alle 2-3 Tage erfolgte der Austausch von etwa 25 ml Medium.

2.1.3.5 Entnahme von Millicell-Einsätzen

Um Millicell-Einsätze entnehmen zu können, fand zunächst das Abpipettieren des Mediums in der Box bis auf die Höhe des unteren Befestigungseinsatzes statt. Der obere Befestigungseinsatz konnte mit der Pinzette hochgehoben und auf die Innenseite des aufgeklappten Boxdeckels gestellt werden. Nach Herausnahme der benötigten Millicell-Einsätze mit der Pinzette und Abstellen auf eine sterile, nicht adhäsive Petrischale schloss sich das Heruntersetzen des oberen Befestigungseinsatzes und die Zugabe des Medium auf Wachstumshöhe an.

2.1.3.6 Vereinzelung der Multilayer

Nach Herausholen der Millicell-Einsätze aus der Box und Abstellen auf eine sterile Petrischale folgte die Vereinzelung der Multilayer. Nach einmaligem Versetzen der Einsätze zur Entfernung des Mediums unter der Membran wurden 400 µl Hanks-EDTA-Puffer in die Petrischale pipettiert. Es schloss sich die Entnahme des Mediums über dem Multilayer mit Hilfe einer 100 µl-Pipette sowie das Abstellen des Einsatzes auf den Tropfen Hanks-EDTA-Puffer an. Der nächste Schritt bestand im vorsichtigen Pipettieren von 100 µl Hanks-EDTA-Puffer an den Rand des Einsatzes. Nach Hinablaufen des Puffers sorgte das einmalige Schwenken des Einsatzes dem Spülen des Multilayers. Nach dem Abpipettieren des Puffers und der Gabe von 100 µl Trypsin auf den Multilayer wirkte das Trypsin, entsprechend den Monolayern, ein. Mit Hilfe der 100 µl-Pipette erfolgte das Ablösen der Zellen von der Membran. Die Überführung der vereinzelten Zellen in 10 ml Medium diente dem Abstoppen der Trypsinwirkung. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 100 µl frischem Trypsin und der Ablösung der restlichen

Zellen auf der Membran. Den Abschluss bildete das Spülen der Membran mit Medium und Resuspendierung aller Zellen in diesen 10 ml Medium.

2.1.3.7 Kryostatschnitte von Multilayern

2.1.3.7.1 Einfrieren

Für die Entfernung des Mediums unter der Membran des entnommenen Millicell-Einsatzes sorgte die einmalige Versetzung des Einsatzes auf der Petrischale. Es folgte die Entnahme des Mediums über den Zellen mit einer 100 µl-Pipette und der Abstreifung des O-Ringes. Auf einen bei -80 °C vorgekühlten Metallblock wurde das auf 4 °C vorgekühlte Eindeckmedium Tissue-Tek bis zu einer Größe eines 10 Cent-Stückes getropft. Nach Hineinstellen des kompletten Millicell-Einsatzes auf das fest werdende Tissue-Tek (Farbänderung von durchsichtig nach weiß) schloss sich das Auftropfen einer Schicht Tissue-Tek auf den Multilayer im Millicell-Einsatz an. Der Metallblock wurde nach sofortiger Überführung in -80 °C mindestens eine Nacht dort zum vollständigen Durchfrieren belassen. Zur längerfristigen Aufbewahrung dienten gut beschriftete 6-Well-Platten.

2.1.3.7.2 Ausstanzen des Multilayers

Um von dem Multilayer Kryostatschnitte herstellen zu können, musste vorher die Entfernung der Plastikhalterung des Millicell-Einsatzes stattfinden. Zur Vorbereitung diente die Äquilibration des bei -80 °C durchgefrorenen Multilayers für mindestens eine Stunde bei -20 °C. Nach Überführung des Multilayers in das Kryotom wurde der auf -20°C vorgekühlte und mit einem Kegelmesser geschärfte Stanzer so lange gedrückt und gedreht bis sich der Stanzer durch das Tissue-Tek, den Multilayer und die Membran durchgebohrt hatte. Das Ausgeschnittene befand sich nun im Inneren des Stanzers. Das Herausschieben des Inhaltes aus dem Inneren erfolgte mit dem Schieber vorsichtig und mit gleichmäßigem Druck. Häufig brachen hier Multilayer und Membran wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Spannungen auseinander. Es schloss sich das Aufblocken des Multilayers auf einem vorgekühlten und mit Tissue-Tek vorbereiteten Metallzylinder an. Das Hinlegen des gestanzten Zylinders ermöglichte Schnitte durch alle Zellschichten. Es wurden 10-15 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost Plus-Objektträger aufgenommen.

2.1.4 Kultivierung von Sphäroiden

Nach Einsaat von 5×10^4 Zellen in eine nicht-adhäsive Petrischale mit einem Durchmesser von 94 mm in 15 ml Medium wuchsen die Zellen als dreidimensionale Sphäroide. Zur Gewährleistung der ungestörten Zellaggregatbildung durfte keine Bewegung der Petrischalen während der Inkubation für 4-5 Tage im Brutschrank stattfinden. Bereits am 5. Tag konnte man unter dem Mikroskop kleine Sphäroide erkennen. Die Überführung der Sphäroide in Spinnerflaschen gewährleistete das weitere Wachstum. Spinnerflaschen sind Glasflaschen mit drei Öffnungen. Die Hauptöffnung ist mit einem Silikonstopfen verschlossen, der das Rührwerk enthält und gleichzeitig die Flasche dicht verschließt. Die beiden anderen Schraubverschluss-Öffnungen dienen dem Flüssigkeitsaustausch sowie im angedrehten Zustand dem Gasaustausch im Brutschrank. Durch gleichmäßiges langsames Kreisen der Petrischale sammelten sich die Sphäroide in der Mitte der Schale, von wo man sie in eine sterile 10 ml-Pipette aufnahm. Um relativ gleich große Sphäroide in die Spinnerflasche zu überführen, wurde die Eigenschaft der unterschiedlich schnellen Sedimentation in Abhängigkeit von der Größe ausgenutzt und nur der mittlere Inhalt der Pipette in die Spinnerflasche gebracht. Je nach benötigter Menge reichten bis zu 4 Petrischalen zur Befüllung einer Spinnerflasche mit Sphäroiden. Das Endvolumen einer Spinnerflasche betrug 100 ml. Jeden 2. Tag wurde ein Drittel des Mediums ausgetauscht und die Sphäroide so ausgedünnt, dass die Zellzahl pro Flasche annähernd konstant blieb. Die Spinnerflaschen standen auf einer regulierbaren induktiven Magnetrührplatte mit 6 Stellplätzen bei einer Rührgeschwindigkeit von etwa 120 Umdrehungen pro Minute. Für die Initiierung der SiHa-Sphäroide war eine Vorbeschichtung der nicht-adhäsiven Petrischalen mit 1,5 % Agarose notwendig. Dazu wurden 7,5 g Agarose in 500 ml MEM-Nährlösung ohne Zusätze gegeben, autoklaviert und nach Abkühlung (etwa 60 °C) in sterile Petrischalen gegossen. Die Lagerung der nicht ausplattierten Agaroselösung sowie der bereits gegossenen und steril verpackten Petrischalen erfolgte im Kühlschrank. Zur Beschichtung weiterer Petrischalen sorgte ein Aufkochen in der Mikrowelle zur Verflüssigung der Agaroselösung.

2.1.4.1 Einfrieren der Sphäroide und Erstellen von Kryoschnitten

Das Vorkühlen von zwei Einwegskalpellens mit Plastikgriff sowie eines Kryoröhrchens in flüssigem Stickstoff diente der Vorbereitung des Einfriervorgangs. Nach Überführung der Sphäroide in eine nicht-adhäsive Petrischale mit relativ wenig Medium (5-8 ml) wurde die Petrischale schräg gehalten, so dass das Medium langsam am Schalenboden ablaufen konnte. Dabei blieben die Sphäroide am Boden der Schale hängen. Durch Vorbeiführung des vorgekühlten Skalpellens dicht über das Sphäroid haftete es – bedingt durch den Temperaturunterschied – sofort am Skalpell. Nach dem kompletten Durchfrieren, ersichtlich anhand der Farbänderung des

Sphäroids, ließ sich das Sphäroid leicht mit dem zweiten vorgekühlten Skalpell in das offene Kryoröhrchen abstreifen. Zum Aufblocken wurde das Sphäroid direkt in sich verfestigendes Tissue-Tek auf einem Metallzylinder gegeben und gegebenenfalls mit einer Schicht Tissue-Tek bedeckt. Es schloss sich das Erstellen von 10-15 µm dicken Kryoschnitten im Kryotom für anschließende HE- oder Ki-67-Färbungen an.

2.2 Behandlungsformen

2.2.1 Bestrahlung von Zellen

Sowohl die Röntgen- als auch die Schwerionenbestrahlungen fanden bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt statt. Die Durchführung der Experimente, deren Aufarbeitung direkt nach Abschluss der Bestrahlung notwendig war, wie z.B. der Ansatz der Überlebenskurven, erfolgte im Zellkulturlabor der Abteilung Biophysik der GSI. Dort wurden auch die für den Koloniebildungstest eingesäten Zellen inkubiert. Wenn möglich erfolgte jedoch die Probenaufarbeitung in Mainz. Für den Transport der Zellen war das Auffüllen der Zellkulturgefäße mit Medium erforderlich. Diese wurden gut verschlossen in einer Styroporkiste transportiert. Bis zur Bestrahlung verblieben die Zellen bei Raumtemperatur. Lediglich bei längeren Wartezeiten während der Schwerionenbestrahlung wurden die Zellen in den Brutschrank gestellt.

5 Tage vor der Bestrahlung fand die Einsaat der zu bestrahlenden Zellen standardmäßig entweder als Monolayer in 12,5 cm²-Kulturflaschen oder als Multilayer in den Millicell-Einsätzen in den Kulturboxen statt.

Die Bestimmung der Dosimetriefaktoren dauerte über einen längeren Zeitraum an. Da während dieser Zeit Bestrahlungsexperimente stattfinden sollten, wurde ein kleiner Umweg zur Einführung identischer Bestrahlungsbedingungen der unterschiedlich kultivierten Zellen beschritten. Es erfolgte die Trypsinierung der Zellen von normal kultivierten Monolayern, Multilayern und Sphäroiden direkt vor der Bestrahlung. Nach Überführung von 5×10^5 Zellen dieser frisch hergestellten Zellsuspensionen in 25 cm²-Kulturflaschen schloss sich die Bestrahlung in einem verminderten Mediumvolumen von 3 ml an.

2.2.1.1 Röntgenbestrahlung

Für die Röntgenbestrahlung in der GSI kam die Röntgenröhre Isovolt DS1 (Seifert) zum Einsatz. Sie wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einem Kathodenstrom von 16 mA betrieben. Die Röhre besitzt Filter aus Beryllium, Aluminium und Kupfer mit einer

Dicke von 7 mm, 1 mm und 1 mm. Diese Filter absorbieren die weiche Röntgenstrahlung. Die Dosimetrie erfolgte mit dem Dosimeter SN4 (PTW Freiburg).

Aufgrund der vertikal austretenden Röntgenstrahlen konnten die Proben wachstumstypisch bestrahlt werden, das heißt die Monolayer in den Kulturflaschen liegend und die Multilayer in den stehenden Boxen. Die Dosimeterhalterung war optimal für 25 cm²-Kulturflaschen ausgerichtet, so dass sich das Dosimeter bei der Bestrahlung der Kulturflaschen direkt unter den Zellen befand. Für die Multilayer stellte sich die Dosimetrie weitaus schwieriger dar. Eine Skizze zum Aufbau während der Bestrahlung der Multilayer-Box ist in Abbildung 15 gegeben. Damit die Box sicher stand, musste eine Plexiglasplatte von 1 cm Dicke auf die Dosimeterhalterung gelegt werden. Außerdem waren die Millicell-Einsätze in einer Höhe von etwa 25 mm von der Innenkante der Box entfernt in der Halterung befestigt. Dies entsprach einer absoluten Entfernung zwischen Dosimeter und Zellen von 65 mm.

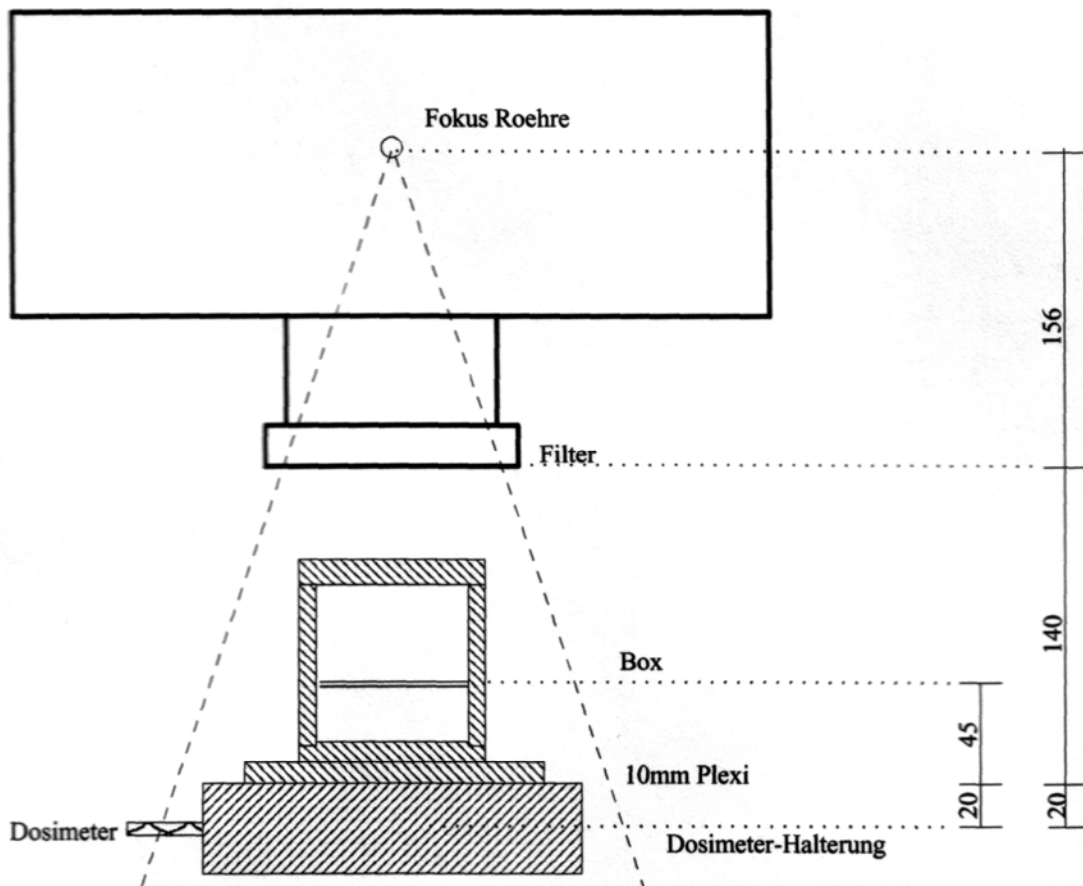


Abb. 15: Aufbau bei der Röntgenbestrahlung, Abmessungen im mm (Abbildung freundlicherweise von PD Dr. M. Scholz zur Verfügung gestellt)

2.2.1.2 Schwerionenbestrahlung

Die Bestrahlung mit $^{12}\text{C}^{6+}$ -Ionen fand am medizinischen Patientenstrahlplatz im Cave M des Schwerionensynchrotrons (SIS) der GSI statt. Die Bestrahlungsexperimente mit den Zellen wurden in den Nachtschichten während der Patientenbestrahlung durchgeführt. Die exakte Patientendosimetrie führten Medizinphysiker aus Heidelberg (Karger et al. 2002) mit Ionisationskammern durch. Wie bereits erwähnt erfolgt beim tumorkonformen Rasterscan-Verfahren die Aufteilung des Tumors bzw. der zu bestrahlenden Proben in Schichten gleicher Reichweite. Der Strahl wird Punkt für Punkt und Zeile für Zeile über das Bestrahlungsfeld geführt. Die Bewegungen in die Tiefe resultieren aus den Variationen der Strahlenergie. Für die genaue Positionierung der zu bestrahlenden Areale projizieren Laserstrahlen das Isozentrum des Strahls, welches 110 cm hinter dem Austrittsfenster entfernt liegt. Die Energie bei der Bestrahlung im Plateau betrug auf den Proben 370 MeV/u (LET=11,5 keV/ μm) und der Kohlenstoffstrahl rasterte zweimal das Bestrahlungsfeld mit der halben Dosis ab. Der ausgedehnte Bragg-Peak war aus 12 einzelnen Bragg-Peaks aufgebaut. Jeder Bragg-Peak hatte eine Ausdehnung von 2 mm. Die Zellposition lag etwa 8 mm vor dem hinteren Ende des ausgedehnten Bragg-Peaks. Der LET betrug 90 keV/ μm .

Das horizontale Auftreffen der Schwerionen auf ihr Target bedingt ein Aufstellen der Kulturflaschen und das Kippen der Kulturboxen um 90° in eine für das Zellenwachstum untypische vertikale Position. Durch den Bestrahlungsaufbau war das vollständige Auffüllen der Kulturflaschen sowie das Auffüllen der Boxen in gekippter Position bis über die obere Kante des Einsatzes mit Medium erforderlich. Durch Einbringen eines Magnetührers in den Aufbau war auch während der Bestrahlung ein Rühren des Mediums der Multilayerboxen gewährleistet.

Die 12,5 cm²-Kulturflaschen standen auf Holzklötzen aufgereiht auf einem ferngesteuerten Fließband. Aus dem Kontrollzentrum heraus konnten die Flaschen präzise und schnell in das Laserstrahl-angezeigte Isozentrum gebracht werden. Das Bestrahlungsfeld für die bei der ersten Schwerionenbestrahlung verwendeten 25 cm²-Flaschen betrug 50 x 85 mm. Da für anschließende Experimente ausreichend Zellen in den 12,5 cm²-Flaschen vorhanden waren, erfolgte der Umstieg auf diese kleineren Flaschen, deren Bestrahlungsfeld mit 45 x 55 mm deutlich kleiner war. In jedem Fall war das Bestrahlungsfeld um mindestens 5 mm in jeder Richtung größer als die Wachstumsfläche der Flaschen. Die Ausrichtung der Proben erfolgte mit Hilfe der drei Laserlinien, die das Isozentrum projizieren. Der Boden der aufgestellten und mit Medium aufgefüllten Kulturflaschen zeigte zum Austrittsfenster und schloss mit einer Laserlinie (x-Achse) ab. Auf dem Flaschenboden markierte der Schnittpunkt der beiden Diagonalen der Wachstumsfläche die Höhe (z-Achse). Für die Orientierung des Laserstrahls der y-Richtung diente die Mitte des Flaschendeckels. Bei der Bragg-Peak-Bestrahlung der Kulturflaschen wurde zusätzlich eine 3 cm dicke Plexiglasplatte zwischen Austrittsfenster und Probe eingespannt.

Die Multilayerboxen standen um 90° gekippt auf einem Magnetrührer. Der Boxdeckel zeigte zum Austrittsfenster. Zur räumlichen Orientierung der Box dienten wiederum die Laserstrahlen. Der Mittelpunkt der Strahlen aus x- und z-Richtung lag im mittleren oberen Einsatz. Die Millicell-Membranen wurden auf die y-Achse ausgerichtet. Die schematische Darstellung der Box zur Bestrahlung ist in Abbildung 16 aufgezeigt. Das Bestrahlungsfeld eines Millicell-Einsatzes war 26×26 mm groß. Der Abstand zwischen den Bestrahlungsfeldern mit unterschiedlicher Dosis betrug 8 mm. Für Zellzyklusexperimente wurden viele Einsätze im Bragg-Peak mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt. Das Bestrahlungsfeld einer kompletten Box betrug 60×40 mm.

Die Dauer der Bestrahlung richtete sich nach der Größe des Bestrahlungsfeldes und den applizierten Dosen. Für eine Überlebenskurve der Monolayer mit 6 Dosispunkten in $12,5 \text{ cm}^2$ -Flaschen dauerte die Bestrahlung im Plateau etwa 30 min, im Bragg-Peak etwa 25 min. Eine Überlebenskurve der Multilayer bestand vorwiegend aus 6 Multilayern, die zur Bestrahlung auf drei Boxen verteilt wurden. Die Bestrahlung dieser drei Boxen einschließlich der Zeit zum Wechseln der Boxen sowie der Schleusenpassagen dauerte etwa 25 min.

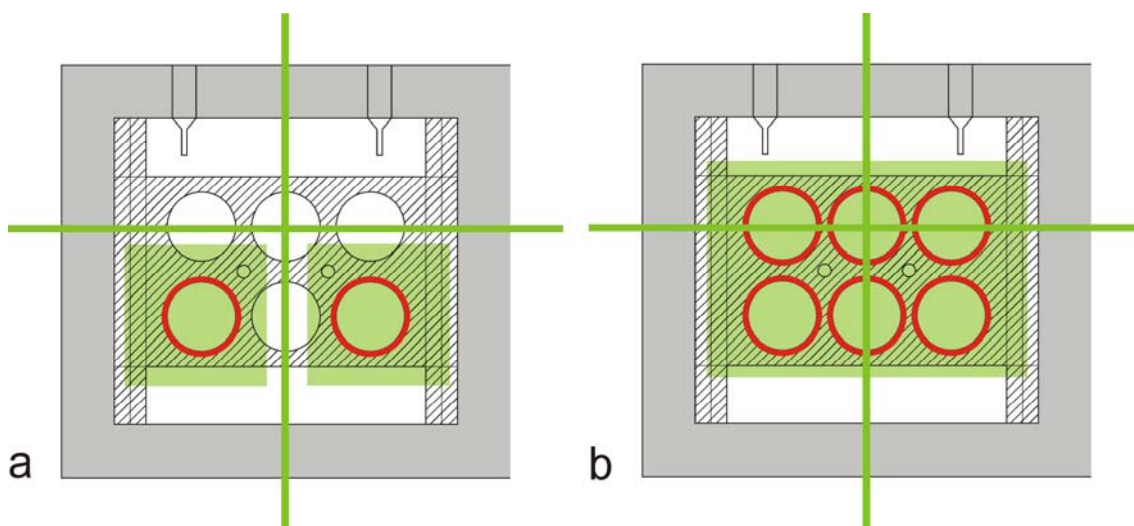


Abb. 16: Schematische Darstellung der um 90° gekippten Kulturboxen mit den Bestrahlungsfeldern und Laserstrahlen (grün)

a: zwei Bestrahlungsfelder mit unterschiedlichen Dosen,

b: ein Bestrahlungsfeld mit der gleichen Dosis

2.2.2 Etoposid-Behandlung

Etoposid, Synonym VP-16, (siehe Abb. 17) ist ein Etopodophyllotoxin-Derivat und bewirkt DNA-Doppelstrangbrüche. Es wirkt als Chemotherapeutikum, indem es die Topoisomerase II inhibiert. Die Topoisomerase II katalysiert die Entwindung der DNA-Helix durch Setzen transientser DNA-Doppelstrangbrüche an definierten DNA-Stellen. Sie erlaubt damit eine ungehinderte Passage eines anderen DNA-Stranges durch diese Bruchstelle. Die Topoisomerase II-Aktivität ist essentiell für die Chromosomen-Kondensation und -Trennung während der Mitose.

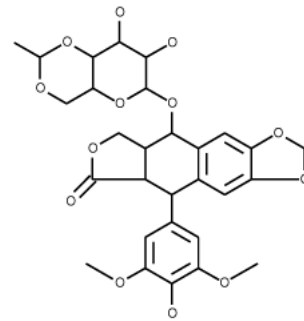


Abb. 17: Etoposid

Etoposid stabilisiert den so genannten „cleavable complex“, bei dem das Enzym kovalent an die Doppelstrangbruch-DNA gebunden ist und verhindert dadurch die Religierung der Bruchenden. Dadurch wird die Proliferation inhibiert oder das Signal zur Einleitung der Apoptose gegeben (Lang et al. 1998, Robert und Larsen 1998).

Die Verdünnung der Etoposid-Stammlösung von 25 mg/ml in DMSO fand direkt vor jedem Experiment frisch im Medium statt. Da die meisten Experimente gepaarte Versuche waren, sorgte die Verwendung der gleichen Etoposid-Verdünnungen für identische Bedingungen in allen Versuchsgruppen. Direkt vor der Behandlung mit Etoposid erfolgte die Trypsinierung der Zellen. Nach abgeschlossener Zentrifugation und Resuspendierung des Pellets in 10 ml Medium schloss sich die Bestimmung der Zellzahl an. Der nächste Schritt bestand aus der Überführung von 5×10^5 Zellen pro Dosispunkt in ein 15 ml-Röhrchen. Nach Auffüllung des Mediums auf 3 ml folgte eine erneute Zentrifugation der Zellen. Danach war das Entfernen des Überstandes mit Rücklauf erforderlich. Das Pellet wurde mit den entsprechend vorher angesetzten Etoposid-Verdünnungen resuspendiert, auf 3 ml aufgefüllt und in 25 cm²-Flaschen überführt. Die 30minütige Inkubationszeit im Brutschrank reichte nicht für eine Adhäsion der Zellen in den Kulturflaschen aus. Es folgte die Entnahme der Zellsuspensionen und Überführung in 15 ml-Röhrchen. Nach Zugabe von 5 ml Medium schloss sich eine Zentrifugation der Zellen an. Der nächste Schritt bestand in der vollständigen Entfernung des Mediums und Resuspendierung des Pellets mit 2 ml frischem Medium. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Aussaat der entsprechenden Zellzahl für die Plating Efficiency.

2.3 Analysen

2.3.1 Charakterisierung des Zellwachstums

Zur Erfassung des Wachstumsverhaltens einer Zelllinie diente die Einsaat von 5×10^4 Zellen in eine adhäsive Gewebekultur-Petrischale mit einem Durchmesser von 94 mm in 15 ml Medium. Bis zur Aufarbeitung wurden die Zellen erschütterungsfrei im Brutschrank inkubiert. Pro Tag kamen je 3 Petrischalen zur Aufarbeitung. Das Ablösen der Zellen erfolgte normal, wobei das Trypsinieren unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Je nach Zellzahl waren 1-12 ml Medium zum Abstoppen erforderlich. Durch die Variation des Mediumvolumens sollten bei der Zellzahlbestimmung Verdünnungsfehler vermieden werden. Für die Charakterisierung der Multilayer erfolgte die Einsaat wie im Abschnitt Multilayer-Kultivierung. Das Zellzählgerät Casy ermittelte die Zellkonzentration, den mittleren Durchmesser und das mittlere Volumen. Zur Bestimmung der Verdopplungszeit diente die halblogarithmische Auftragung der Gesamtzellzahl (natürlicher Logarithmus) in Abhängigkeit von der Zeit. Der so linearisierte exponentielle Teil der Kurve konnte über eine lineare Regression ($y = a + bx$) bestimmt werden. Die Verdopplungszeit t_D ergab sich aus:

$$(4) \quad t_D = \frac{\ln(2)}{b}$$

2.3.2 Erstellen von Überlebenskurven

Die Quantifizierung der Wirksamkeit von Röntgen- und Schwerionenstrahlung als auch des Chemotherapeutikums Etoposid erfolgte über Klonogenitätstest und das Erstellen von Überlebenskurven. Dies galt für Monolayer, Multilayer und Sphäroide.

2.3.2.1 Bestimmung der Plating Efficiency (PE)

Mit Hilfe des Koloniebildungstestes, auch als Plating Efficiency (PE) bezeichnet, bestimmt man die Proliferationskapazität von Zellen. Die makroskopisch sichtbaren Kolonien stammen jeweils von einer Ursprungszelle ab. Das Kriterium für eine Kolonie ist das 6malige Durchlaufen des Zellzyklus und somit der Bildung von mehr als 50 Zellen.

Nach Bestrahlung oder Etoposid-Behandlung erfolgte die Einsaat der Zellen anhand der Experiment-Planung nach entsprechend häufigen 1:10 Verdünnungen in 25 cm²-Flaschen, bei mehr als 50.000 Zellen in 75 cm²-Flaschen. Für jede Dosis bzw. Konzentration war der Ansatz von 3 Parallelproben erforderlich. Der anfangs durchgeführte Mediumwechsel bei den WiDr-Zellen nach 7 Tagen kam bei den späteren Experimenten nicht mehr zum Einsatz. Die Ergebnisse mit

und ohne Mediumwechsel unterschieden sich nicht. Außerdem war die Möglichkeit gegeben, durch die zusätzliche Bewegung der Kulturflaschen während des Mediumwechsels unabsichtlich Kolonien abzuspülen. Die Inkubation der SiHa-Zellen endete nach 10 Tagen, die der WiDr-Zellen nach 14 Tagen. Nach Dekantieren des Mediums schloss sich das Anfärben der Zellkolonien mit 0,3 % Methylenblau-Lösung für 30 min (3 ml auf 25 cm² und 6 ml auf 75 cm²) an. Es folgte das komplette Absaugen der Färbelösung sowie die anschließende Lufttrocknung der Flaschen. Nach Aufbringen eines Rasters auf den Boden der Kulturflaschen erfolgte die Auszählung der Kolonien (mit mehr als 50 Zellen) Rechteck für Rechteck unter dem Mikroskop. Bei dieser Art der Auszählung umgeht man die möglicherweise unbewusst ablaufende Manipulation, bestimmte Koloniezahlen zu erreichen, wie aus eigener Erfahrung mit dem Zellzählstift beobachtet wurde.

Zum Auszählen der Kulturflaschen war der Erhalt von etwa 100-150 Kolonien ideal. Für dieses Ziel wurde auf Ergebnisse vorangegangener Experimente zurückgegriffen oder verschiedene Kolonienzahlen (10, 100 und 1000 Kolonien) ausplattiert, um den idealen Bereich abzudecken. Die PE in Prozent ergibt sich aus folgender Formel:

$$(5) \quad PE = \frac{\text{Anzahl}_{\text{Kolonien}}}{\text{Zellzahl}_{\text{Einsaat}}} \cdot 100$$

2.3.2.2 Bestimmung des relativen Überlebens

Das relative Zellüberleben S (S von survival, engl. für Überleben) lässt sich wie folgt bestimmen:

$$(6) \quad S = \frac{PE_{\text{Dosis}}}{PE_{\text{Kontrolle}}}$$

Die Berechnung des Überlebens bezieht sich bei allen Dosen auf den Kontrollwert. Dieser kann aber prinzipiell auch fehlerbehaftet sein, so dass sich dieser Fehler auf alle Überlebenswerte auswirkt. Um diesen Fehler so klein wie möglich zu halten, wurden die PEs aller Dosen halblogarithmisch gegen die Dosis aufgetragen und für Werte bis 1 % eine lineare quadratische Regressionsanalyse ($y = A + B_1x + B_2x^2$) durchgeführt. Diese repräsentiert den typischen Kurvenverlauf mit Schulterfunktion bei reparaturfähigen Zellsystemen. War bei dem Parameter B_2 der Fehler größer als der Wert selbst, bewegte sich B_2 gegen null. Für diese Fälle erfolgte eine lineare Regressionsanalyse ($y = A + Bx$). Der Schnittpunkt mit der y-Achse entsprach der relativen PE der unbehandelten Kontrolle. Trägt man das relative Überleben halbloga-

rithmisch gegen die Dosis oder Etoposid-Konzentration auf, ergeben sich die so genannten Überlebenskurven.

2.3.3 Bestimmung der relative biologische Wirksamkeit (RBW)

Die relative biologische Wirksamkeit (RBW) drückt die Effizienz einer zu untersuchenden Strahlenart im Vergleich zu einer Referenzstrahlung aus, um den gleichen biologischen Effekt zu erreichen. Hier wurden die Schwerionenstrahlung mit der Röntgenstrahlung in ihrer Wirkung auf die Zellen bei einem Überleben von 10 % verglichen. Die RBW ergibt sich also:

$$(7) \quad \text{RBW} = \frac{\text{Dosis}_{\text{Referenzstrahlung}}}{\text{Dosis}_{\text{Teststrahlung}}} = \frac{\text{Dosis}_{\text{Röntgen}}}{\text{Dosis}_{12\text{C}}}$$

2.3.4 Histologische Untersuchungen am Multilayer

2.3.4.1 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) ist eine histologische Färbung, bei der das Hämatoxilin als basischer Farbstoff mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA reagiert und zu einer blauen Kernfärbung führt. Das Eosin ist ein zur Fluoreszeingruppe gehöriger schwach saurer Farbstoff, der mit den basischen Strukturen des Plasmas reagiert und diese rot färbt (Romeis 1989).

Nach Trocknung der 10-15 µm dicken Kryoschnitte von Multilayern oder Sphäroiden auf den Objektträgern für 2 Tage an der Luft schloss sich eine Fixierung für 5-10 min in Aceton sowie eine zweite Trocknungsphase von 1-2 Tagen an der Luft an. Die Färbeprozedur ist in der Tabelle 3 (siehe Anhang) aufgeführt. Nach der Färbung wurden die Schnitte zur längeren Konservierung entwässert und in wasserfreiem Medium eingebettet.

Die Begutachtung der mit Aceton fixierten und HE-gefärbten Kryoschnitte der Multilayer fand an einem Durchlichtmikroskop statt. Die Vermessung der Dicke der Multilayer erfolgte mit Hilfe eines im Okular enthaltenen Maßstabes. Die Strecke des Okularmaßstabes konnte mit einem Objektträger mit geeichten Maßstab (Skalierung 0,01 mm, gesamt 1 mm) der Firma Olympus unter Berücksichtigung der entsprechenden Vergrößerung berechnet werden.

2.3.4.2 Ki-67-Färbung

Ki-67 ist ein nukleäres Protein, welches in proliferierenden Zellen, aber nicht in ruhenden Zellen exprimiert wird (Gerdes et al. 1984). So eignet es sich gut als Proliferationsmarker. Der

monoklonale Primärantikörper MIB-1 aus der Maus bindet an das humane Ki-67-Protein. Der Anti-Maus-Sekundärantikörper ist Peroxidase-gekoppelt, so dass bei Zugabe des Substrates DAB⁺ an der Stelle der Antikörperbindung ein braunes Endprodukt entsteht.

Von verschiedenen lang kultivierten Multilayern oder Sphäroiden wurden 10-15 µm Kryoschnitte angefertigt, einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Färbung nach dem Auftauen fand die Fixierung der Schnitte für 10 min in Aceton und anschließend eine mindestens einstündige Trocknungsphase statt. Die Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift diente dem möglichst geringen Verbrauch der Antikörper-Lösung. Das Färbeprotokoll ist im Anhang (Tab. 4) aufgeführt.

2.3.5 Analysen am Durchflußzytometer (Fluorescence activated cell sorter, FACS)

Bei einem Durchflußzytometer wird die Zellsuspension mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit durch eine Kapillare gedrückt. Der Flüssigkeitsstrahl mit den vereinzelt Zellen passiert dann einen Laserstrahl. Das FACS bestimmt von jeder Zelle neben Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC) auch bis zu drei verschiedene Fluoreszenzen. Das Vorwärtstreulicht gibt Informationen über die Größe der Zellen, wohingegen das Seitwärtstreulicht Auskunft über die Granularität der Zelle gibt (Toxikologie der Universität Mainz 2004). Zur Trennung der verschiedenen Fluoreszenzen kommen Teilerspiegel und Bandpassfilter zum Einsatz. Photomultiplier verstärken die Signale. Das Durchflußzytometer Coulter Epics XL-MCL der Firma Beckman Coulter wird mit einem Argon-Laser betrieben und besitzt drei Bandpassfilter, die genauer in Tabelle 5 im Anhang beschrieben sind. Die Darstellung der Fluoreszenz erfolgt im Gegensatz zur linearen Auftragung von FSC gegen SSC immer logarithmisch. Eine Ausnahme stellt hierbei die Zellzyklusanalyse dar.

2.3.5.1 Zellzyklus-Analyse mit dem Durchflußzytometer

Die Aufarbeitung startete mit dem Ablösen der Zellen. Nach Überführung von bis zu 1×10^6 Zellen je Probe und Zeitpunkt in Facs-Röhrchen (12 x 75 mm) folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit 1 ml PBS-Glucose-Puffer (PBS ohne Ca- und Mg-Ionen + 0,1 % Glucose) und Zentrifugationsschritten für 8 min bei 1600 rpm. Nach Dekantieren des Überstands schloss sich das Resuspendieren des Zellpellets mit dem Rücklauf (etwa 100 µl) an. Der nächste Schritt bestand in der tropfenweise Zugabe von 1 ml des bei -20 °C vorgekühlten 70%igen Ethanol auf dem Vortexer. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 4 °C oder länger bei -20 °C und eine anschließende Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min bei 4 °C. Nach Dekantieren des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets mit dem Rücklauf folgte die Zugabe von 1 ml Propidium-Iodid-Färbelösung (siehe Anhang), die Propidiumiodid und RNase A enthielt. Das

Propidiumiodid baut sich unspezifisch in doppelsträngige Nukleinsäuren ein. Will man eine quantitative Aussage über den DNA-Gehalt in der Zelle machen, ist ein Verdauen der vorliegenden RNA-Moleküle durch die RNase A erforderlich, da diese sonst das Messsignal überlagern. Die Zellsuspension inkubierte man mit der Färbelösung für 10 min im Dunkeln bei 4 °C. Die anschließende Messung im Durchflußzytometer bildete den Abschluss.

Die Markierung der vitalen Zellen erfolgte im Messfenster FSC gegen SSC. Nur die eingegrenzten Zellen (Gate A) gingen in ein zweites Fenster ein, welches die Peak Fluoreszenz3 gegen Fluoreszenz 3 (PI) aufzeigte. In diesem Fenster kam es zum Ausschluss der Doubletten (Zusammenlagerung zweier Zellen) über eine weitere Eingrenzung (Gate B). Beide Markierungen (vitale Zellen und ohne Doubletten) gingen in das dritte Fenster ein, welches die Anzahl als Funktion der Fluoreszenz 3 darstellte. Hier wurde die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen sichtbar. Nach 10.000 gemessenen Ereignissen im dritten Fenster stoppte die Messung. Die Auswertung der Histogramme und die prozentuale Angabe der Zellzyklusphasen erfolgte in der WinCycle-Software (MultiCycle DNA content and Cell Cycle Analysis Software for Windows, University of Washington). Das Programm kann die Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G0/G1) und doppeltem Chromosomensatz (G2/M) voneinander unterscheiden. Über eine Regressionsanalyse ermittelt das Programm die DNA-Synthese-Phase (S-Phase). Bei den bestrahlten Proben vergrößerte sich in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung stark der Zelldurchmesser. Aufgrund der gestreuten Zellpopulation war es zu späteren Zeitpunkten nicht mehr möglich, die Zellen im Gate A einzugrenzen. Bei diesen Proben und den dazugehörigen unbestrahlten Kontrollen wurde die Auswertung ohne das Gate A vorgenommen, so dass alle Zellen in die Histogramme 2 und 3 eingingen. Das Wincycle-Programm ist jedoch in der Lage, apoptotische Zellen von der Auswertung auszuschließen.

2.3.5.2 Nachweis der Phospho-Glycoprotein-Aktivität

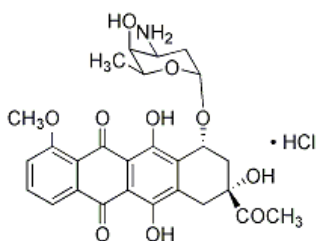


Abb. 18: Daunorubicin

Daunorubicin (siehe Abb. 18) ist ein Antibiotikum und Chemotherapeutikum und besitzt eine rote Fluoreszenz nach Anregung bei 488 nm. Es kann frei durch die Zellmembran in die Zelle eindringen. Bestimmte Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, für die Zelle schädliche Stoffe mit Hilfe von Membranproteinen wie z.B. dem P-Glycoprotein aktiv wieder aus der Zelle hinauszutransportieren. Verapamil ist ein Kalziumkanal-Inhibitor, der diesen Transport verhindert. Vergleicht man also

die Zellen nach Inkubation mit Daunorubicin allein mit der kombinierten Inkubation von Daunorubicin und Verapamil, so ist bei Vorhandensein der Resistenz die Fluoreszenz der Zelle im

ersten Fall niedriger sein als im zweiten Fall, da dort der Auswärtstransport aus der Zelle inhibiert wird (Darzynkiewicz et al. 2001).

Für den Aktivitätstest des P-Glycoptoteins kamen normal abgelöste Zellen zum Einsatz. Die Einsaat von jeweils 1×10^6 Zellen erfolgte in 5 ml Medium in eine 25 cm²-Kulturflasche. Für jedes Experiment wurden 3 Proben angesetzt, einmal als Kontrolle ohne Zusätze, dann mit Zusatz von 200 µl Daunorubicin (0,1 mM-Stammlösung) und als drittes mit Zugabe von 200 µl Daunorubicin und 10 µl Verapamil (5 mM-Stammlösung). Nach 30minütiger Inkubation der Zellen im Brutschrank schloss sich direkt die Messung eines Teils der Zellen im Durchflußzytometer an. Im Messfenster FSC gegen SSC wurden die vitalen Zellen eingegrenzt und die Fluoreszenzintensität der Zellen im Histogramm counts gegen Fluoreszenz 2 verfolgt. LS513-Zellen kamen als Positivkontrolle zum Einsatz. Die Arbeitsgruppe von Professor Vaupel des Instituts für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Mainz stellte die Zellen, ein humanes Coloncancer, sowie das dazugehörige Medium (RPMI 1640 mit 1 % HEPES und 11 % Cosmic Calf Serum) zu Verfügung.

2.3.5.3 TUNEL-Assay (Nachweis der Apoptose)

Oftmals ist die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose schwierig. Doch die Entwicklung verschiedener Assays führte zum spezifischen Nachweis der Apoptose wie z.B. der hier verwendete TUNEL-Assay (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling). Im Ablauf der Apoptose treten niedermolekulare doppelsträngige DNA-Fragmente sowie einzelsträngige Brüche (nicks) in der DNA auf. Diese nicks sind gekennzeichnet durch freie 3'-OH-Enden, an die die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) Sequenz-unspezifisch Nukleotide polymerisiert. Die Nukleotide sind FITC-markiert, so dass über die Fluoreszenz eine Analyse im Fluoreszenzmikroskop oder Durchflußzytometer möglich ist. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit DNase I vor der Enzymreaktion verdaut. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (siehe Tab. 6 im Anhang).

2.3.6 Molekularbiologische Analysen

2.3.6.1 RNA-Analyse

2.3.6.1.1 RNA-Präparation

Die aus den Zellen zu isolierende RNA ist sehr anfällig gegenüber den ubiquitär vorkommenden RNasen. Deshalb kamen steril verpackte oder vor Gebrauch autoklavierte Einweg-Plastik-Reaktionsgefäße zur Verwendung. Bei Verwendung anderer, nicht RNase-freier Gefäße erfolgte ein mindestens einstündiges Einlegen in 0,1 M NaOH mit anschließender Spülung mit DEPC-

Wasser. Für das Ansetzen aller benötigten Lösungen und Puffer kam DEPC-behandeltes Wasser zum Einsatz. Dazu wurden 0,1 % DEPC in Aqua dest. über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. Dabei zersetzt sich das DEPC in Ethanol und CO₂.

Die Durchführung der RNA-Isolierung fand mit dem Rneasy Mini Kit von Qiagen statt. Das Prinzip der RNA-Isolierung der Firma Qiagen beruht auf der Silicagel-Technologie kombiniert mit chaotropen Salzen. Nach Lyse und Homogenisieren der Probe in einem stark denaturierenden Guanidinisothiocyanat-Puffer (RLT) kommt es zur Inaktivierung vorhandener RNasen. Die Versetzung der Proben mit Ethanol bewirkt eine bessere Bindung der Nukleinsäuren an die Silicamembran, die durch chaotrope Salze vermittelt wird. Die Puffer RW1 und RPE waschen die übrigen Substanzen weg. DEPC-Wasser sorgt für die Elution der Gesamt-RNA. Der Rneasy Mini Kit isoliert RNA-Moleküle, die größer als 200 Nukleotide sind. Kleinere RNA-Spezies machen etwa 15-20 % der Gesamt-RNA aus. Durch deren Auswaschen kommt es indirekt zur Anreicherung der restlichen RNA-Spezies wie der mRNAs.

Die RNA-Isolierung startete mit dem normalen Ablösen der Zellen und zweimaligem Waschen mit PBS. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1600 rpm für 8 min. Nach Dekantieren des Überstandes und des Rücklaufes schloss sich die Resuspendierung des Zellpellets (maximal 1×10^7 Zellen) in Abhängigkeit der Pelletgröße mit 350 µl oder 600 µl RLT-Puffer mit frisch zugesetztem β-Mercaptoethanol (10 µl/ml) an. Der nächste Schritt bestand aus dem mehrmaligen Homogenisieren des Pellets mit einer Spritze. Zu Beginn der Experimente wurde das Lysat auf eine Qiasredder-Säule gegeben und für 2 min bei 15000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Lagerung des Durchlaufs fand bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung statt. Bei einem Vergleichsexperiment stellte sich heraus, dass ein Zell-Lysat ohne Shreddersäule etwa die gleiche RNA-Ausbeute ergibt wie mit der Säule. So konnte in späteren Experimenten auf diesen zusätzlichen Schritt verzichtet werden. Die Fortsetzung der RNA-Isolierung fand weitgehend nach dem Qiagen-Protokoll „Rneasy Mini Protocol for Isolation of total RNA from Animal Cells“ statt. Aufgrund der langsam hochtorenden Zentrifuge war eine Verlängerung der Zentrifugationsschritte von 15 sec auf 1 min erforderlich. 30-50 µl DEPC-Wasser sorgten nach Auftrag auf die Säule und einer Inkubation von 1 min für die Elution der RNA. Bei wenig Ausgangsmaterial wurde das Eluat erneut auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert.

2.3.6.1.2 quantitative Bestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration kann aufgrund der aromatischen Ringe der Basen photometrisch bei einer Absorption von 260 nm gemessen werden. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (gültig bei einer Absorption <1) entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Von der isolierten RNA wurden 1:50 oder 1:100-Verdünnungen als Doppelbestimmungen in

H₂O_{DEPC} hergestellt und gegen H₂O_{DEPC} als Leerwert bei 260 nm im Photometer gemessen. Die RNA-Konzentration (µg/ml) berechnete sich wie folgt:

$$(8) \quad c_{\text{RNA}} = \text{OD}_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnung}$$

2.3.6.1.3 Erststrangsynthese: Reverse Transkription

Bei der Erststrangsynthese, auch Reverse Transkription genannt, erfolgt ein Umschreiben der mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA. Dazu verwendet man Oligo-dT-Primer, die an den komplementären Poly-A-Schwanz der mRNA binden, oder „random hexamer“-Primer. Deren Bindung findet jedoch nicht spezifisch an mRNA, sondern auch an anderen RNA-Spezies statt. Je nach Sequenzhäufigkeit der random hexamers bekommt man mehrere cDNA-Fragmente, die auch weiter weg vom Poly-A-Ende liegen können. Je nach Fragestellung muss dies vorher bedacht werden. In dieser Arbeit kamen random hexamers zum Einsatz.

Das Pipettierschema von RT-Mix 1 und RT-Mix 2 sowie den dazugehörigen Konzentrationsangaben sind im Anhang (Tab. 7 und 8) aufgeführt. Der Mix 1 denaturierte bei 65 °C für 15 min im PCR-Cycler, um gebildete Sekundärstrukturen der RNA und Primer-Dimeren aufzulösen. Diese Inkubationszeit reichte zum Ansatz des Mix 2 aus. Nach dessen Zugabe arbeitete die Reverse Transkriptase für 1 h bei 40 °C. Eine Inkubation für 5 min bei 99 °C inaktivierte das Enzym.

2.3.6.1.4 Zweitstrangsynthese: Polymerase-Kettenreaktion

In der Zweitstrangsynthese dient die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung einer in geringen Mengen vorkommenden DNA mit Hilfe eines für diese DNA-Sequenz spezifischen Primerpaares. Es findet ein zyklischer Ablauf von Denaturierung, Annealing und Elongation statt. Bei der Denaturierung kommt es durch Hitzebehandlung zur Trennung der DNA-Doppelstränge. Mit dem Annealing bezeichnet man die Anlagerung der spezifischen Primer an die komplementäre, einzelsträngige DNA-Sequenz. Bei der Elongation wird die Primersequenz in Gegenwart von Nukleotiden von der DNA-Polymerase verlängert. Am Ende eines Zyklus liegt die DNA idealerweise verdoppelt vor, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Sequenz kommt.

Es erfolgten die Nachweise von β-Aktin und rad51. Die verwendeten Primerpaare sind in der Tabelle 9 (siehe Anhang) aufgelistet. Die Primersuche fand in der Sequenz der humanen mRNA für Rad51 mit der kompletten kodierenden Region (D14134) statt (siehe Anhang). Die Sequenzen für die Aktin-Primer stammen von Raff et al. (1997).

2.3.6.1.5 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

Agarosegele dienen der elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren. Das im Gel befindliche Ethidiumbromid bindet stöchiometrisch an die Nukleinsäuren, so dass man unter UV-Licht die Banden auf dem Gel erkennen und bei parallelem Auftragen eines Größenstandards zuordnen kann. In Abhängigkeit der Länge der zu untersuchenden PCR-Produkte kamen verschiedene Agarosekonzentrationen zum Einsatz: für Fragmente um 500 bp 1,5 % und bei etwa 100 bp 1,5-2 %.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle vollständig und schlierenfrei gelöst. Nach Abkühlung (etwa 60°C) folgte die Zugabe von 5 µl 1%iger Ethidiumbromidlösung. Der nächste Schritt bestand aus dem Gießen des Gels in das abgedichtete Gel-Tablett mit den eingesteckten Gel-Kämmen, wobei 100 ml für zwei kleine Gele oder ein großes Gel reichten. An die Verfestigung des Gels schloss sich die Entfernung der Gießabdichtung und das Einlegen des Tablett in die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer an. Nach Entfernung der Käme folgte im nächsten Schritt das Auftragen der Proben. Dafür wurden 5 µl PCR-Probe bzw. Marker zuvor in einer Microwell-Platte mit 1 µl Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgte bei gleichbleibender Spannung von 60-100 V. Als Kontrolle für die zurückgelegte Wanderungstrecke diente die so genannte Lauffront, die entsprechende Farbstoffe wie Bromphenolblau oder Orange G enthielt.

2.3.6.1.6 Sequenzierung und Vorarbeiten

Die Sequenzierung des PCR-Produktes diente zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten rad51-Primer. Der Pipettieransatz entsprach dem der Tabelle 10 im Anhang, jedoch ohne das β-Aktin-Primerpaar. Die Amplifikation erfolgte als Endpunkt-PCR (Cyclerprogramm Tab. 11 im Anhang). Nach Auftrennung des PCR-Produktes in einem 1,5%igen Agarosegel wurde die der PCR-Bande unter Verwendung eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Es schloss sich eine Gel-Extraktion mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen nach deren Protokoll an. Die Firma GENTERprise (Mainz) führte die Sequenzierung durch. Sie benötigte zur Abschätzung der Ausbeute der Sequenzier-PCR ein Gelfoto eines Kontrollgels mit definiertem Volumen von Marker und gereinigtem Produkt sowie den Konzentrationsangaben des Markers. Weiterhin war je ein Aliquot des gereinigten PCR-Produktes sowie des PCR-Primers rad51-F2 erforderlich.

2.3.6.1.7 semiquantitative PCR

Bei der semiquantitativen PCR fand die Amplifizierung des interessierenden Gens rad51 sowie des Haushaltsgens β-Aktin in einer Duplex-PCR statt (Pipettierschema siehe Tab. 10 im An-

hang). Um den zeitlichen Verlauf der PCR, also den exponentiellen Anstieg der beiden PCR-Produkte zu überblicken, erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten die Entnahme der Proben aus dem Cycler. Zur Gewährleistung gleich bleibender Bedingungen im PCR-Ansatz wurden keine Aliquots entnommen, sondern 7 identische Ansätze pipettiert. Nach 19 absolvierten Zyklen fand die Entnahme der ersten Probe statt und anschließend nach jedem weiteren dritten Zyklus, bis 37 Zyklen erreicht waren. Das dazugehörige Cyclerprogramm ist in Tabelle 12 (siehe Anhang) aufgeführt. Mit Auftrennung der unterschiedlich lang inkubierten Proben im Agarosegel in der Reihenfolge der Probenentnahme wurde die Kinetik der PCR-Reaktion sichtbar. Es interessierte das zeitliche Auftauchen der rad51-Bande aus dem Hintergrund im Vergleich zum Haushaltsgen.

2.3.6.2 Protein-Analyse

2.3.6.2.1 Protein-Extraktion

Die Protein-Extraktion startete mit dem normalen Ablösen der Zellen und zweimaligem Waschen mit PBS. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes und Rücklaufes schloss sich die Aufnahme des Pellets in möglichst wenig RIPA-Puffer (siehe Anhang) an. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis fand die mehrmalige Homogenisierung mit einer Spritze statt. Es folgte die Zugabe von je 10 µl Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail und eine anschließende Inkubation von 30 min auf Eis. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm bei 4 °C endete die Extraktion mit der Überführung des Überstandes in neues Gefäß und der Lagerung bei -80 °C.

2.3.6.2.2 Protein-Bestimmung

Für die Proteinbestimmung kam die Methode nach Bradford zum Einsatz. Mit der Komplexbildung zwischen den Proteinen mit dem Coomassie Brilliant Blue kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe von 465 nm nach 595 nm. Die Absorption ist proportional zur Proteinmenge im Bereich von 0,1 bis 1,4 mg/ml Protein. Deshalb erfolgte immer parallel zu den eigentlichen Proben die Vermessung der BSA-Verdünnungen von 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 und 1400 µg/ml. 250 µl Bradford-Reagenz reagierten mit 5 µl der Probe bzw. BSA-Verdünnung in einer 96-Well-Platte. Nach Inkubation von 15 min schloss sich die Messung der Absorption im Microplate Reader bei 595 nm an. Der lineare Anstieg der BSA-Standardkurve nach Auftragung der Absorption in Abhängigkeit der BSA-Konzentration diente der Berechnung der Protein-Konzentrationen der Proben.

2.3.6.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE, dem Western Blot sowie der Immundetektion war das Tragen von Handschuhen erforderlich, um eine Kontamination mit Proteinen der Haut oder Haare zu verhindern. Das Gießen des Gels sowie die anschließende Elektrophorese erfolgte mit Hilfe der Mini-Protean II Electrophoresis Cell der Firma BioRad. Nach Einspannen der Glasplatten mit Abstandshaltern in der Gießhalterung sowie Einstecken des Kammes schloss sich eine Überprüfung der Dichtheit an. Der nächste Schritt bestand aus dem Zusammenpipettieren der Substanzen für das 10%ige Trenngel (Tab. 13 im Anhang) unter Beachtung der gleichmäßigen Durchmischung. Da mit Zugabe des TEMEDs die Polymerisation beginnt, startete sofort nach der Durchmischung das Gießen des Gels zwischen die Glasplatten mittels einer Pasteurpipette bis etwa 1 cm unterhalb des Kammes. Überschichtet wurde mit Isopropanol oder 0,1 % SDS, um den inhibierenden Luftsauerstoff fernzuhalten. Wenn der Rest des Ansatzes im 50 ml-Röhrchen auspolymerisiert war, galt dies auch für das Gel. Nach Abgießen der Überschichtung folgte das Gießen des 5%igen Sammelgels (Tab. 14 im Anhang), wobei keine Luftblasen am Kamm entstehen durften. Der nächste Schritt bestand im Einspannen des fertig auspolymerisierten Gels in die Halterung für die Elektrophoresekammer und der Prüfung auf Dichtheit durch Gabe von 1 x Laufpuffer in die innere Kammer. War das Gel korrekt eingespannt und dadurch die innere Kammer dicht, folgte das Auffüllen der äußeren Kammer mit 1 x Laufpuffer. Nach Herausziehen des Kammes aus dem Gel schloss sich das Spülen der Taschen mit 1 x Laufpuffer an. Es fand die Vermischung der Proben mit gleichem Volumen SDS-Ladepuffer und anschließender Denaturierung für 5 min bei 95 °C statt. Neben den Proben wurde der unbehandelte Proteinmarker RNP 756 der Firma Amersham mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese startete bei 200 V und 120 mA.

2.3.6.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Mit Hilfe des Western Blots transferiert man die nach der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine stabilere Membran. Das Milchpulver sättigt die freien Valenzen der Membran ab. In einem weiteren Schritt binden die Primär-Antikörper (siehe Tab. 15 im Anhang) spezifisch an ein bestimmtes Protein. Ein mit Peroxidase-gekoppelter Sekundär-Antikörper (siehe Tab. 16 im Anhang) erkennt wiederum spezifisch den Primär-Antikörper. Dabei kommt es zur Signalverstärkung, da mehrere Sekundär-Antikörper an einen Primär-Antikörper binden können. Zuletzt findet eine chemische Reaktion statt, bei der die Peroxidase das Substrat Luminol oxidiert. Das dabei entstehende Licht wird durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Nach erfolgter Trennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte der Auseinanderbau der Gelapparatur sowie das Lösen des Gels von den Glasplatten. Das Trenngel äquilibrierte für etwa 20 min in

Transferpuffer. Diese Zeit diente der Vorbereitung der Blot-Membran und der Whatman-Filterpapiere durch Zuschnitt auf die Größe des Gels. Bei der Membran handelte es sich um eine hydrophobe PVDF-Membran. Diese benötigte ein Anfeuchten zunächst kurz für wenige Sekunden in Methanol und dann 2 min in Aqua dest. bevor sich ein Äquilibrieren für mindestens 10 min in Transferpuffer anschloss. Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran kam die Semi-Dry Blottapparatur von Bio-Rad zum Einsatz. Nach Anfeuchtung der Anodenplatte mit Aqua dest. folgte der Aufbau aus drei in Transferpuffer-getränkten Whatman-Filterpapieren, der Membran, dem Gel und erneut drei feuchten Whatman-Filterpapieren. Bei jedem Schritt war das vorsichtige Herausstreichen der Luftblasen erforderlich. Es schloss sich das Auflegen der mit Aqua dest. angefeuchteten Kathodenplatte sowie des Sicherheitsdeckels an. Der Transfer dauerte bei 15 V und 275 mA 30 min. Nach Auseinanderbau des Blots und Waschen der Membran für 5 min in Aqua dest. diente die Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung zur Überprüfung des Transfers und gleichzeitig zur Fixierung der Proteine auf der Membran. Nach Anfärbung der Membran für 5-8 min folgte das Entfärben mit Aqua dest., bis deutliche Banden auf der Membran zu sehen waren. Die eingescannte angefärbte Membran eignete sich später als Ladekontrolle. Während die Membran lufttrocknete, wurde parallel das Gel mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und nach der Entfärbung auf Cellophanpapier in einem Trocknungsrahmen getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte für die spätere Exposition auf dem Röntgenfilm die Nachzeichnung der Markerbanden auf der Membran mit einem wasserfesten Stift, vor dem erneuten Anfeuchten der Membran. Anschließend inkubierte die Membran in der Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBST) für 1 h. Es kam eine feuchte Kammer in Form einer Petrischale zum Einsatz. In dieser lag ein angefeuchtetes Whatman-Filterpapier und darauf ein Stück Parafilm, die beide etwas größer als die Membran waren. Es schloss sich das Pipettieren des in 5 % Milchpulver/TBST verdünnten Primär-Antikörper (Kaninchen Anti-Rad51, Maus Anti-Tubulin) auf die vorher mit Papier geschützte Seite des Parafilms an. Direkt auf diesen Tropfen kam die Membran mit der Proteinseite zu liegen und inkubierte so für 2 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST inkubierte die Membran in der feuchten Kammer in der eben beschriebenen Weise mit dem Sekundär-Antikörper (Kaninchen Anti-Maus bzw. Esel Anti-Kaninchen) für 1 h. Nach erneutem Waschen (3mal für 10 min mit TBST) wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Folie gelegt. Die nächsten Schritte bestanden in der Mischung der ECL-Lösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen (je 1 ml ausreichend für komplette kleine Membran), dem Auftrag auf die Membran und die Inkubation für 1 min. Nach Abtropfen der überschüssigen ECL-Lösungen von der Membran und Auflegen auf eine Einschweißfolie schloss sich nach Zuschweißen der Folie das Aufkleben eines Stückes Leuchtstreifen (Tracker Tape) und Nachzeichnung der Markerbanden an. Der Röntgenfilm inkubierte in einer Filmkassette für unterschiedliche Zeiten auf der Membran:

Rad51 für etwa 10 min, Tubulin für 30 s. Nach Schwenken des Films im Entwickler (1:100 in Aqua dest. verdünnt) bis zum Erscheinen der Banden, folgte ein Waschen in Aqua dest. und die Inkubation des Films im Fixierer (1:100 in Aqua dest. verdünnt) bis zur Transparenz des Films. Nach erneutem Waschen unter fließendem Wasser und abschließend mit Aqua dest. konnte der Film zum Trocknen aufgehängt werden. Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgte anhand der mitgelaufenen Markerbanden. Aufgrund des Auftrages unterschiedlicher Proteinextrakte (SiHa- und WiDr-Zellen und jeweils Mono- und Multilayer) auf eine Membran war ein direkter Vergleich der Banden möglich.

2.3.7 Zellmigration in der Boydenkammer

Zur Bestimmung der Zellmigration *in vitro* kamen Boydenkammern, wie in Abbildung 19 dargestellt, der Firma Neuro Probe zur Verwendung. Sie bestehen aus einer Grund- und einer Deckplatte mit 48 Bohrungen, die exakt aufeinander passen. Die Grundplatte besitzt blind endende Bohrungen, die Deckplatte dagegen durchgehende Bohrungen. Zwischen beide Platten wurde ein Polycarbonatfilter gelegt, der 8 µm große Poren besitzt, die produktionstechnisch bedingt mehr

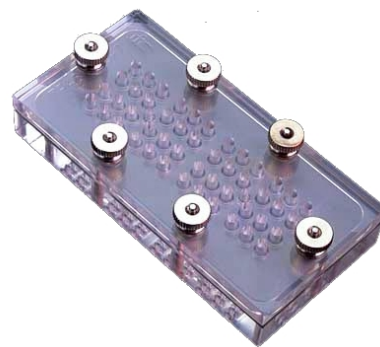


Abb. 19: Boydenkammer
(Neuro Probe 2004)

oder weniger regelmäßig verteilt sind. Zur besseren Fixierung und Abdichtung erfolgte ein Aufbringen einer Siliconmembran auf den Filter und das feste Verschrauben beider Acrylplatten mit 6 Schrauben. Es entstanden somit 48 einzelne Migrationseinheiten mit zwei Kompartimenten. In den oberen Teil fand die Zugabe der Zellen statt, die sich nach Absetzen auf dem Filter aktiv zur und durch die Poren bewegen mussten. Die gewanderten Zellen konnte man dann nach Abwischen der nicht gewanderten Zellen (Startseite) anfärben.

2.3.7.1 Filterbeschichtung

Die Filterseiten unterscheiden sich optisch. Eine Seite, hier mit Startseite benannt, erscheint stumpf, die andere Seite (Ankunftsseite) hingegen glänzend. Zur späteren Zuordnung der Filterbeladung diente das Abschneiden der linken unteren Ecke des Filters, wenn die stumpfe Seite nach oben zeigte. Zuerst erfolgte die Beschichtung der stumpfen Filterseite mit 130 µl der Collagen-I-Gebrauchslösung (siehe Anhang), wobei der enthaltene Ethanol den Filter durchdrang. Nach einer Trocknungszeit von 30 min schloss sich das vorsichtige Auflegen der glänzenden Seite des Filters in eine Petrischale mit Gelatine-Gebrauchslösung (siehe Anhang) ohne Benetzung der stumpfen Seite an. Den Filter inkubierte man auf der Gelatine-Lösung für 30 min

im Brutschrank und für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Für eine Neutralisation der sauren Gelatinelösung sorgte das Überführen des Filters mit der glänzenden Seite nach unten in eine Petrischale mit PBS. Nach 15 min erfolgte der Austausch gegen frischen PBS. Nach dem kurzen Schwenken der Gelatine-beschichteten Filterseite in Aqua dest. zur Verhinderung der Salzkristallbildung endete die Beschichtung mit dem Trocknen der nassen Filterseite nach oben.

2.3.7.2 Vorbereitung der Zellen

Von den normal abgelösten Zellen erfolgte nach der Zellzahlbestimmung die exakte Einstellung der Zellzahl von $1,5-2 \times 10^5/\text{ml}$. Für eine identische Beladung von zwei Boydenkammern parallel wurde für jede Kammer die Zellzahl in einem Volumen von 2 ml angesetzt und erneut die Zellzahl kontrolliert und vermerkt.

2.3.7.3 Beschickung der Boydenkammer

Auf die mit 30 μl Medium luftblasenfrei vorgelegte Grundplatte schloss sich das Auflegen des Filters mit der stumpfen Seite nach oben und der abgeschnittenen Ecke nach links unten an. Dies geschah mit Hilfe von zwei Pinzetten zur Minimierung der Bildung von Luftblasen so, dass zuerst Kontakt der Filtermitte mit dem Medium der Grundplatte stattfand. Nach Auflegen der Silicondichtung, indem sich auch hier die abgeschnittene Ecke unten links befand, folgte das Auflegen und feste Andrücken der Deckplatte. Während der Fixierung beider Platten mit den Schrauben durfte der Druck zwischendurch nicht nachlassen, da sich sonst Luftblasen bildeten. Das ebenfalls luftblasenfreie Einbringen von jeweils 50 μl der vorbereiteten Zellsuspension mit definierter Zellzahl und die anschließende Inkubation der fertigen Boydenkammern für 16-18 h im Brutschrank bildeten den Abschluss.

2.3.7.4 Entnahme und Färbung des Filters

Für die Entnahme des Filters war der korrekte Auseinanderbau der Boydenkammer erforderlich. Nach Lösung der Schrauben folgte das Umstülpen der Kammer, so dass sich die Deckplatte nach unten schieben ließ. Mit Hilfe der Pinzette löste sich die Silicondichtung von der oben liegenden Grundplatte, so dass Letztere entfernt und sofort in Wasser eingelegt wurde. Auf der Silicondichtung befand sich der Filter mit der Ankunftsseite nach oben und der Startseite nach unten. Der nächste Schritt bestand im Einspannen der Enden des Filters jeweils in eine große Filterklemme. Nach Benetzung der unteren Seite des Filters (Startseite) fand das dreimalige Abwischen auf dem vorher mit PBS benetzten Filterwischer statt. Da die Zellen auf der Ankunftsseite noch nicht fixiert waren, trocknete der Filter mit der nassen Seite nach unten

(glänzende Seite nach oben) für 30 min auf Zellstoff. Zum weiteren Entfernen der nicht gewanderten Zellen diente das erneute Einspannen des Filters in die Filterklemmen. Nach Umdrehen des Filters, so dass die stumpfe Seite nach oben zeigte, schloss sich das dreimalige Abwischen der stumpfen Seite (Startseite) mit Hilfe von mit PBS benetzten Wattestäbchen an. Nach einer weiteren Trocknung des Filters für 10 min (glänzende Seite nach oben) erfolgte die Fixierung des Filters für 1 min in Ethanol-enthaltender Hemacolor-1-Lösung. Der Filter sank komplett ein, aber auch hier sollte die glänzende Seite nach oben zeigen, um das Abschmiegeln der Zellen auf der Ankunftseite zu vermeiden. Nach der Trocknung schloss sich die Färbung der Zellen auf dem Filter an, beginnend mit dem Einspannen des Filters in eine große und eine kleine Filterklemme. Der Filter tauchte 4-mal vollständig mit der kleinen Filterklemme nach unten in die Färbeküvette mit der vorher gefilterten Hemacolor-2-Lösung ein. Nach Abtropfen der überschüssigen Farbe erfolgte 7-mal das Eintauchen in die Hemacolor-3-Lösung. Der Filter wurde in einer Petrischale mit Puffer nach Weise entfärbt und dann getrocknet. Das Durchschneiden des Filters in der Mitte ermöglichte das Auflegen je einer Filterhälfte mit der glänzenden Seite auf einen Objektträger. Nach einem erneuten Wischen der oben liegenden Startseite mit einem PBS-getränkten Wattestäbchen konnte das Immersionsöl aufgetropft und das Deckglas aufgebracht werden. Nach der Versiegelung des Objektträgers mit Nagellack war der Filter zur Begutachtung unter dem Mikroskop bereit. Die Beurteilung erfolgte rein qualitativ durch Betrachtung aller Migrationseinheiten einzeln und der Untersuchung der Zellen auf Vitalität und Zellteilungsaktivität. Durch Untersuchung von immer mindestens zwei verschiedenen Ausgangssituationen in einer Boydenkammer war ein direkter Vergleich möglich.

2.3.8 Verwendete Statistik

Für die statistischen Datenanalysen kamen die Programme Excel (Microsoft Excel 2002, Microsoft Corporation, USA) und Origin (Origin 7G SR4, V.7 B552, Origin Lab Corporation, Northampton, USA) zum Einsatz. Mit Excel wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Im Origin erfolgten die Regressionsanalysen. So wurde anhand der Geradengleichung der linearen Regression die Proteinmenge in Abhängigkeit der BSA-Standardkurve, die Verdopplungszeit oder die Korrekturfaktoren der Röntgendosimetrie berechnet. Eine linear quadratische Regressionsanalyse ($y = A + B_1x + B_2x^2$) fand nach halblogarithmischer Auftragung der Plating Efficiency (PE) in Abhängigkeit der Dosis oder Etoposid-Konzentration für PE-Werte bis 1 % statt. War bei dem Parameter B_2 der Fehler größer als der Wert selbst, bewegte sich B_2 gegen null. Für diese Fälle kam eine lineare Regression ($y = A + Bx$) zur Durchführung. Anhand der ermittelten Werte konnte der Schnittpunkt mit der y-Achse berechnet werden, welcher der PE der unbehandelten Kontrolle entsprach.

Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen auf Mehrfachbestimmungen. So fand wenn möglich die Erhebung mehrere Datenpunkte am Tag der Analyse statt (z.B. Dreifachplattierung je Dosispunkt oder Etoposid-Konzentration beim Koloniebildungstest, dreifache Zellzahlbestimmung während der Wachstumskurven, paralleler Ansatz von zwei Boydenkammern mit mindestens 12-24 identisch pipettierten Migrationseinheiten). Weiterhin wurden die Experimente vollständig, das bedeutet von der Aussaat über die Behandlung bis zum Ergebnis, mehrfach wiederholt.

Lagen nur Einzelwerte vor, was nur bei wenigen Experimenten der Fall war, erfolgte ein expliziter Hinweis im Text.

2.3.9 Kodierung in den Diagrammen

Der Einsatz einer Kodierung in den Diagrammen dient zum leichteren Verständnis.

Die unterschiedlichen Symbolformen dienen der Charakterisierung der Kultivierungsformen:

Monolayer	Quadrat
Multilayer	Kreis
Sphäroide	Spitze nach oben zeigendes Dreieck

Die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Behandlungen erfolgte anhand der Füllung der Symbole:

Röntgenbestrahlung / Etoposid	geschlossen
Schwerionenbestrahlung im Plateau	offen
Schwerionenbestrahlung im Bragg-Peak	halb geschlossen

Die Differenzierung der beiden Zelllinien in einem Diagramm wurde durch verschiedene Farben sichergestellt:

WiDr-Zellen	schwarz
SiHa-Zellen	rot

Beim Vergleich der Kultivierungsarten in einem Diagramm erfolgte die Unterscheidung ebenfalls über die Farben:

Monolayer	schwarz
Multilayer	rot
Sphäroide	grün

Unterschiedliche Farben symbolisierten die drei Zellzyklusphasen:

G0/G1-Phase	schwarz
G2/M-Phase	rot
S-Phase	grün

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zellsysteme

3.1.1 Charakterisierung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich ihres Wachstumsbildes, was in Abbildung 20 veranschaulicht wird. Die WiDr-Zellen blieben nach der Zellteilung dicht beieinander, so dass sich Kolonien bildeten. Diese schlossen sich dann zu einem dichten Zellrasen zusammen, wobei sie keine Kontaktinhibition zeigten. Vielmehr bildeten sie nach Erreichen der Konfluenz mehrschichtige Zelllagen mit einem sehr geringen Anteil toter Zellen. Aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften bildeten sie gut Multilayer und Sphäroide.

Die SiHa-Zellen hingegen waren durch vereinzelt Wachstum gekennzeichnet. Sie erreichten auch die Konfluenz, aber starben dann vermehrt ab. SiHa-Zellen wuchsen auf Materialien, die für die Kultivierung adhärenter Zellen nicht vorbehandelt waren. Für die Sphäroidkultur war es deshalb erforderlich, die unbehandelten Petrischalen zusätzlich mit Agarose zu beschichten, um das Anheften der Zellen am Boden zu verhindern. Durch die starke Adhäsion der Zellen bildeten sich keine kompakten Sphäroide sondern sehr große Zellaggregate aus.

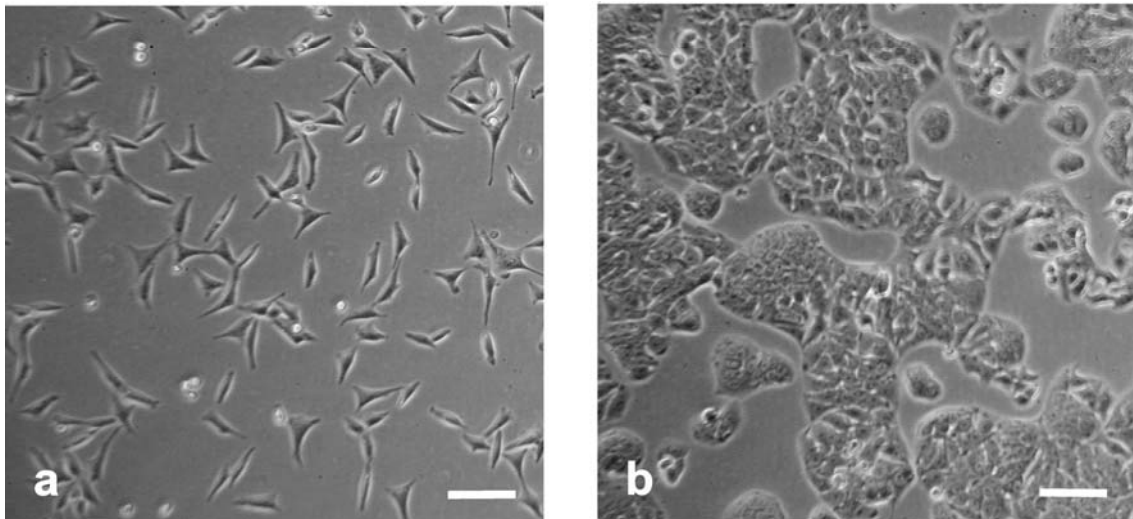


Abb.20: Typische Zellmorphologie der verwendeten Zelllinien bei 10-facher Vergrößerung (Maßstab 100 μm), a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen

Das Passagieren der beiden Zelllinien unterschied sich ebenfalls. So benötigten die WiDr-Zellen eine längere Einwirkzeit des Trypsins. Außerdem kam es beim Abstoppen des Trypsins mit kompletter Nährlösung zur Verklumpung der WiDr-Zellen. Bei dem Vergleich beider Zelllinien war auffällig, dass nach erfolgter Zelleinsaat fast alle SiHa-Zellen adhärten, jedoch ein

Großteil der WiDr-Zellen nicht. Weiterhin schienen die WiDr-Zellen Zellmaterial abzusondern. Der im Zellszählgerät angezeigte große Anteil an Zelldebris der WiDr-Zellen im Vergleich zu den SiHa-Zellen bestätigte diesen Eindruck.

3.1.2 Mycoplasmen-Test

Die Überstände der Zellkulturen wurden regelmäßig mit einem ELISA oder später einer PCR auf Mycoplasmen untersucht. Durch Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen wurde das Funktionieren der Tests sichergestellt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen waren über den gesamten Untersuchungszeitraum frei von Mycoplasmen.

3.1.3 Koloniebildungstest/Plating Efficiency (PE)

Für den Koloniebildungstest wurden die stark verdünnt ausgesäten Zellen nach erfolgter Wachstumszeit mit einer Methylenblau-Lösung angefärbt. Die WiDr-Zellen bildeten sehr kompakte, runde und stark angefärbte Kolonien (Abb. 21 a). Man konnte jedoch nach Anfärbung der Zellen mit Methylenblau im Mikroskop bei großen Kolonien keine einzelnen Zellen mehr erkennen. Für die Auszählung von Kolonien > 50 Zellen war es notwendig, sich kleine Kolonien anzuschauen, bei denen die Grenzen der Einzelzellen auszumachen waren. Man musste sich die Mindestgröße einer Kolonie, die das Kriterium erfüllt, merken und auf die anderen Kolonien übertragen. Im Gegensatz dazu waren die Einzelzellen in den SiHa-Kolonien gut sichtbar. Sie zeigten sehr verschiedene Koloniefornen von stark gefärbten kompakten Kolonien (Abb. 21 b) bis zu schwach gefärbten, locker und weit auslaufenden Kolonien (Abb. 21 c), so dass auch hier die Auszählung am Mikroskop unbedingt erforderlich war.

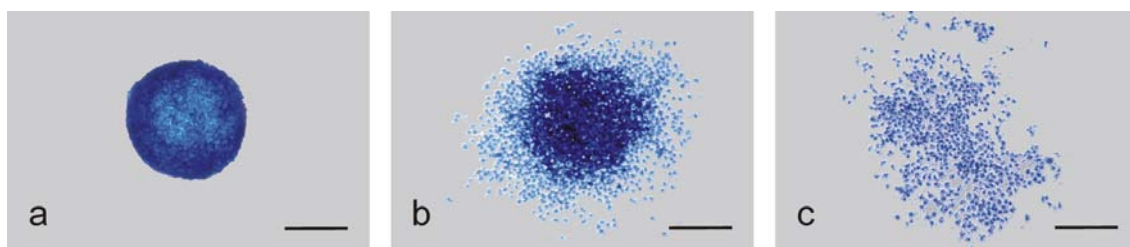


Abb. 21: Aussehen einzelner Methylenblau-gefärbter Kolonien nach dem Koloniebildungstest in 10-facher Vergrößerung (Maßstab 500 µm)

a: WiDr nach 14 d Wachstum, b und c: SiHa nach 10 d Wachstum mit kompakter Form (b) und lockerer Form (c)

Die beiden Zelllinien unterschieden sich in ihrer Fähigkeit, Kolonien zu bilden. In Tabelle 18 sind die PE-Mittelwerte mit Standardabweichung aufgelistet. Dabei handelte es sich um die

unbehandelten Kontrollzellen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die SiHa-Monolayer zeigten eine um etwa 28 % höhere Plating Efficiency (PE) als die WiDr-Monolayer. Dies bestätigte den bei der Betrachtung der Zellkultur gewonnenen Eindruck. Die PE der SiHa-Multilayer war um etwa 13 % niedriger als die der dazugehörigen Monolayer. Für die WiDr-Zellen ergab sich eine höhere PE der Multilayer (mit 7,2 %) im Vergleich zu den Monolayern, die jedoch nicht signifikant war.

Tab. 18: Angaben zur Koloniebildungsfähigkeit (MW \pm SD)

Zelllinie	Kultivierungsart	PE _{Kontrolle} [%]
SiHa	Monolayer	92,9 \pm 4,3
	Multilayer	80,2 \pm 5,4
WiDr	Monolayer	65,1 \pm 11,4
	Multilayer	72,3 \pm 13,9

3.1.4 Wachstumskurven

3.1.4.1 Monolayer

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik für die Monolayer fand eine Zelleinsaat von je 5×10^4 Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 94 mm statt. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl von jeweils drei Proben zu verschiedenen Zeitpunkten. In Abbildung 22 sind die Zellzahlen der SiHa- und WiDr-Monolayer halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Daten stammen aus 3 (SiHa) bzw. 4 (WiDr) unabhängigen Experimenten. Nach einer kurzen Zeit des verzögerten Wachstums (lag-Phase) ging das Wachstum in eine exponentielle Phase über, die bei den SiHa-Zellen bis zum Tag 6, bei den WiDr-Zellen bis zum Tag 8 andauerte. Anhand der Steigung des linearen Teils der Kurven konnte die Zellzahl-Verdopplungszeit berechnet werden. Die SiHa-Zellen benötigten mit 17,3 h weniger Zeit zur Verdopplung als die WiDr-Zellen mit 22,8 h. An die exponentielle Phase schloss sich bei den WiDr-Zellen der allmähliche Übergang in die Plateau-Phase an. Diese ist durch die Ersetzung des Anteils an sterbenden Zellen durch sich neu teilende Zellen gekennzeichnet, so dass es dabei aber zu keiner Änderung der Zellzahl mehr kommt. Bei den SiHa-Zellen konnte jedoch beobachtet werden, dass es mit Eintreten der Konfluenz zu einem vermehrten Absterben der Zellen kam, welches am Abknicken der Wachstumskurve erkennbar ist.

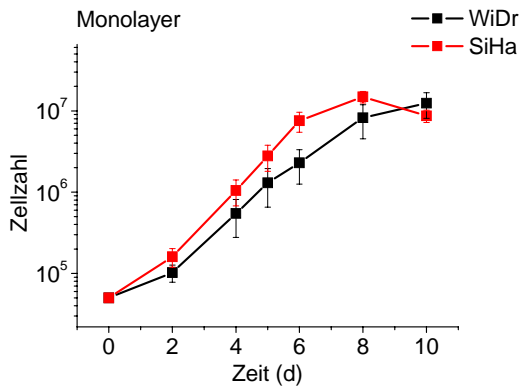


Abb. 22: Auftragung der Gesamtzellzahl der Monolayer von SiHa- und WiDr-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur (MW ± SD von je 3-4 unabhängigen Experimenten)

Neben der Zellzahl ermittelte das Zellzählgerät auch die Werte für das mittlere Volumen und den mittleren Durchmesser. Beide Parameter nahmen über die Zeit ab, was mit dem geringer werdenden Platzangebot bei steigender Zellzahl einhergeht. Bei den WiDr-Zellen sanken beide Parameter bis zum Ende der Beobachtungszeit. Dies korrespondierte gut mit dem langsamen Übergang der Wachstumskurve in die Plateau-Phase. Im Gegensatz dazu war bei den SiHa-Zellen ab Tag 8 und damit etwa zu der Zeit, in der die Wachstumskurve in ein Plateau überging, ein Minimum erreicht und das Volumen bzw. der Durchmesser blieb konstant bzw. nahm sogar leicht wieder zu. In der Abbildung 23 ist ein direkter Vergleich der gemessenen Parameter beider Zelllinien möglich.

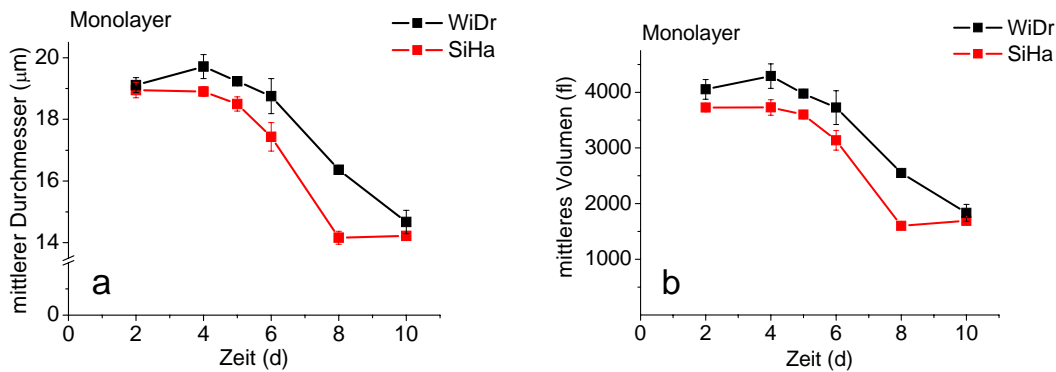


Abb. 23: Auftragung des mittleren Durchmessers (a) bzw. des mittleren Volumens (b) von WiDr- und SiHa-Monolayern als Funktion der Zeit

3.1.4.2 Multilayer

Zur Erfassung der Wachstumskinetik von Multilayern sorgte die Einsaat von je 7×10^5 Zellen in einen Millicell-Einsatz. Nach Inkubation über Nacht schloss sich die Überführung der Einsätze in die Wachstumsboxen an. Zu Beginn der Arbeit fand die Begasung dieser Kulturboxen mit einem Gasmisch (5 % O₂, 5 % CO₂ und 90 % N₂) statt, welches das Gewebemilieu simulieren sollte. In eine Wachstumsbox passten nur jeweils 6 Millicell-Einsätze. Bei der ersten Wachs-

tumskurve mit WiDr-Multilayern kamen für eine Doppelbestimmung pro Tag mehrere Boxen zur Verwendung. Es erfolgte die Entnahme je einer Probe aus zwei Boxen an geraden Tagen und aus zwei anderen Boxen an ungeraden Tagen. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 aufgetragen.

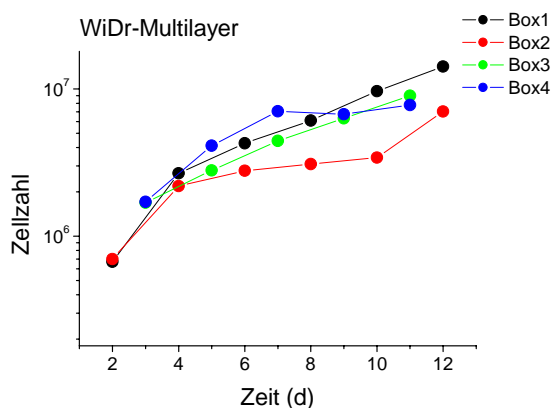


Abb. 24: Zellzahl als Funktion der Zeit von WiDr-Multilayern mit Verteilung der Millicell-Einsätze auf verschiedene Boxen

Obwohl überall die gleiche Zellzahl eingesät wurde, schienen die Unterschiede durch die Verwendung mehrerer Boxen und damit nicht genau gleichen Bedingungen herzurühren. Aus diesem Grund kam für die folgenden Wachstumskurven nur eine Box zum Einsatz, damit für alle zu untersuchenden Proben die gleichen Bedingungen herrschten. Dies bedeutete jedoch auch, dass pro Zeitpunkt nur je ein Einsatz für die Zellzahlbestimmung zur Verfügung stand. Gegebenenfalls diente eine zweite Box zur Entnahme je einer Probe für die Dickenbestimmung der Kryostatschnitte. In Abbildung 25 sind die Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Experimenten der Multilayer-Wachstumskurven zu sehen. Die beiden Zelllinien verhielten sich ähnlich. Bei beiden war ein linearer Anstieg bis zum Tag 6 gut erkennbar. Die Verdopplungszeit ergab sich für die WiDr-Zellen von 57,4 h und für SiHa-Zellen von 61,2 h. Für die WiDr-Multilayer wurde ab Tag 6 der Anstieg beträchtlich geringer, so dass dann die Verdopplungszeit von 2,4 auf 16,5 Tage anstieg. Bei den SiHa-Multilayern flachte der Anstieg nach Tag 6 ebenfalls stark ab. Ähnlich den SiHa-Monolayern nahm auch hier nach Tag 8 die Zellzahl drastisch ab.

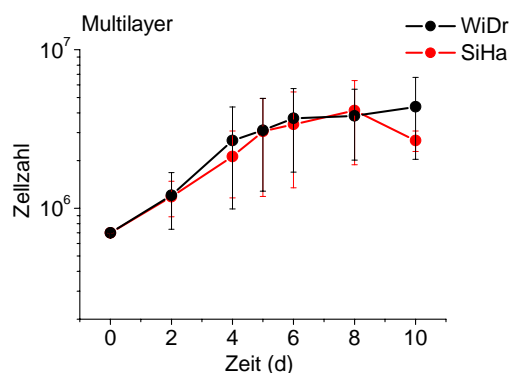


Abb. 25: Auftragung der Gesamtzellzahl von SiHa- und WiDr-Multilayern in Abhängigkeit von der Zeit (MW ± SD von je 3 unabhängigen Experimenten)

Bei der Auftragung der Zellzahlen von Mono- und Multilayern in Abhängigkeit von der Zeit ist der große Unterschied der Verdopplungszeiten zwischen beiden Kultivierungsarten in der Abbildung 26 zu sehen. Die Monolayer wiesen einen weitaus steileren Anstieg auf als die Multilayer (siehe Abb. a und c). In den Nachbardigrammen (Abb. b und d) sind die Zellzahlen je cm^2 aufgeführt. Bei den Multilayern erfolgte die Einsaat sehr vieler Zellen in einen relativ kleinen Millicell-Einsatz, bei den Monolayern hingegen jedoch sehr wenige Zellen in eine große Petrischale. Der Anstieg der Multilayer entsprach etwa dem Anstieg der Monolayer zum Zeitpunkt des Überganges in das Plateau.

Die großen Standardabweichungen der Multilayer verdeutlichten die komplexere Kultivierung der Multilayer, so dass von Experiment zu Experiment mit größeren Abweichungen zu rechnen war.

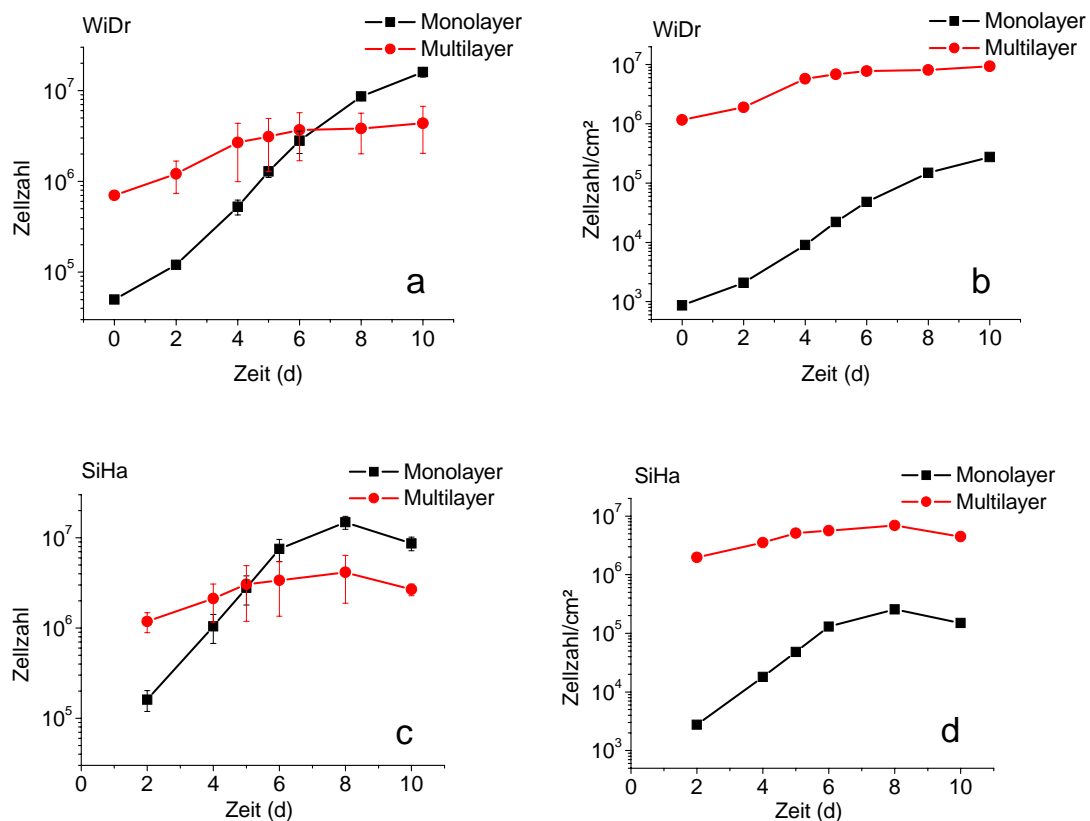


Abb. 26: Zellzahl (a und c) bzw. der Zellzahl/ cm^2 (b und d) von Mono- und Multilayern als Funktion der Zeit

a und b: WiDr-Zellen, c und d: SiHa-Zellen

In Abbildung 27 erfolgte die Auftragung des mittleren Zelldurchmessers in Mono- und Multilayern über die Zeit. Zu Beginn der Untersuchung waren die Multilayerzellen im Vergleich zu den Monolayern deutlich kleiner. Die Messwerte der Multilayerzellen streuten jedoch sehr stark. Bei Betrachtung der Mittelwerte nahm in Abhängigkeit von der Zeit bei beiden Kultivie-

rungsarten, besonders jedoch für die Monolayer, der mittlere Durchmesser ab. Bei den WiDr-Multilayern war am 6. Tag ein minimaler Wert erreicht, welcher konstant blieb. Im Gegensatz dazu konnte sich der Durchmesser der Monolayer über dieses Multilayer-Minimum weiter verkleinern. Für die SiHa-Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Für beide Kultivierungsarten war hier ein Minimum des Durchmessers am Tag 8 erreicht. Dieser Wert blieb bis zum Ende der Untersuchung konstant.

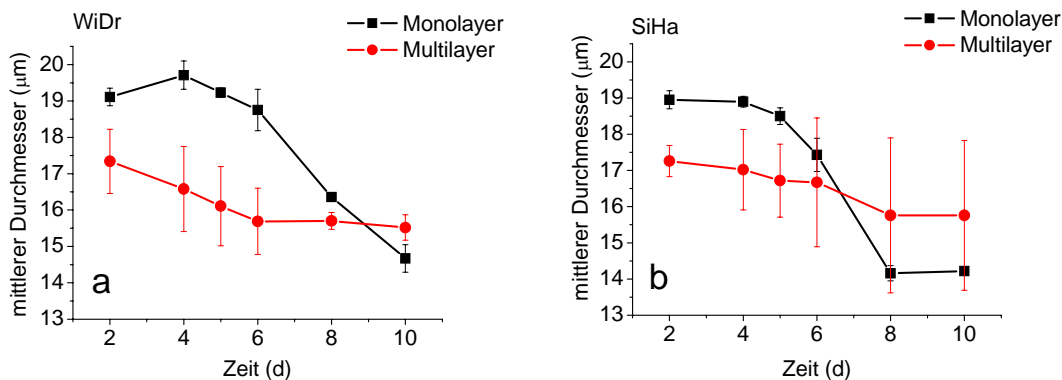


Abb. 27: Mittlerer Zelldurchmesser ($\text{MW} \pm \text{SD}$) in Mono- und Multilayern als Funktion der Zeit: a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen

Bei einer vergleichenden Auftragung der mittleren Zelldurchmesser als Funktion der Zeit beider Zelllinien getrennt nach Mono- und Multilayern (siehe Abb. 28) wiesen die Monolayer der SiHa-Zellen einen etwas kleineren Durchmesser im Vergleich zu den WiDr-Zellen auf. Dieses Verhältnis kehrte sich bei Betrachtung der Mittelwerte bei der Kultivierung als Multilayer um. Doch bei Betrachtung der Größe der Fehlerbalken ist dies nicht signifikant. Die Durchmesser von SiHa- und WiDr-Zellen zeigten zu Beginn und am Ende des Beobachtungszeitraumes bei beiden Kultivierungsarten annähernd die gleichen Werte.

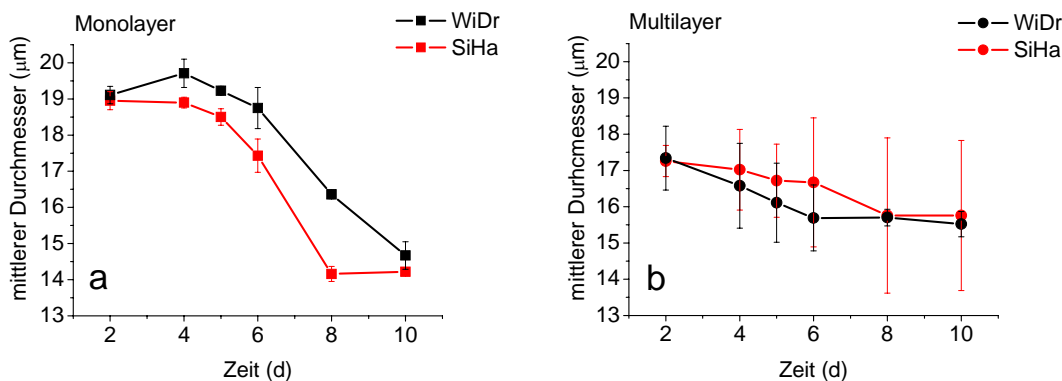


Abb. 28: Mittlerer Zelldurchmesser als Funktion der Zeit von WiDr- und SiHa-Zellen
a: Monolayer (entspricht Abb. 22 a), b: Multilayer

Ein Experiment mit SiHa-Zellen diente der Untersuchung, ob die Abnahme des Zelldurchmessers im Laufe der Zeit auch mit dem Kerndurchmesser korreliert. Die Kernfraktion erhielt man nach 5-minütiger Behandlung der Zellen mit 96 % Ethanol. In der Abbildung 29 ist der Zell- und Kerndurchmesser gemeinsam in einem Diagramm dargestellt. Es war ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Kern- und Zelldurchmesser mit der Zeit erkennbar. Dem besseren Vergleich von Mono- und Multilayer bezüglich der Durchmesserangaben dient Abbildung 30. Der mittlere Zelldurchmesser der Monolayerzellen unterschritt ab Tag 7 die Werte der Multilayer, jedoch blieb der Kerndurchmesser der Monolayer immer kleiner gegenüber den Multilayern.

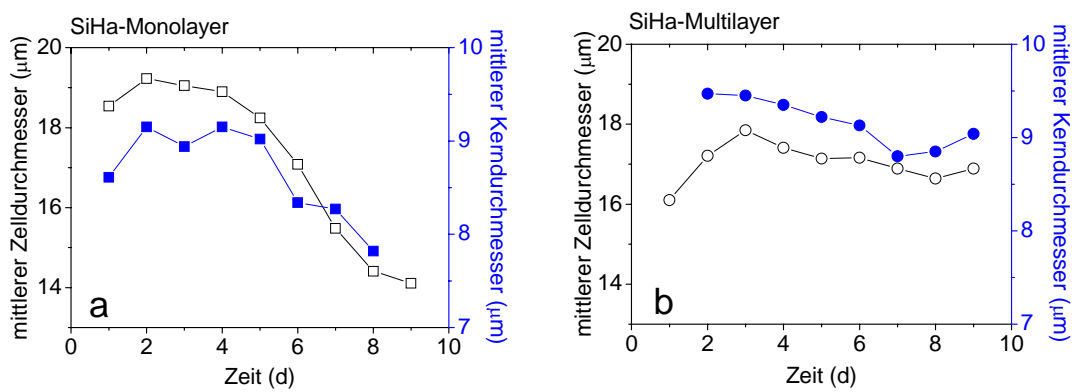


Abb. 29: Mittlerer Zelldurchmesser (offene Symbole) und Kerndurchmesser (geschlossene Symbole) von SiHa-Zellen als Funktion der Zeit

a: Monolayer, b: Multilayer

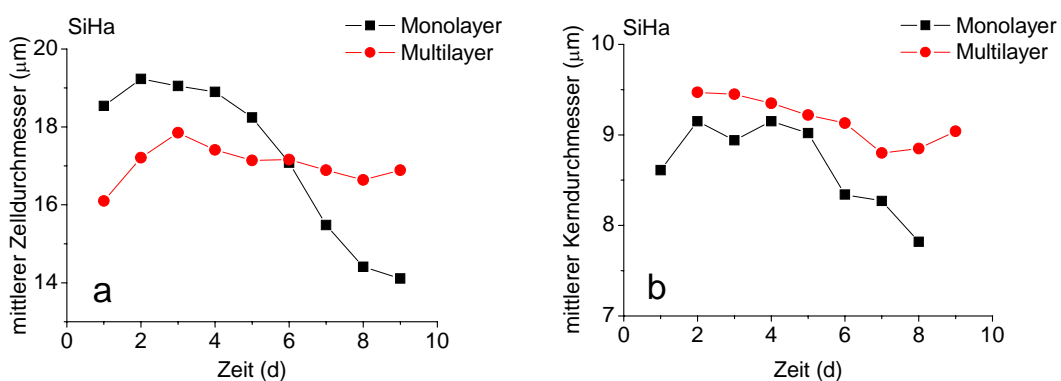


Abb. 30: Mittlerer Zelldurchmesser (a) bzw. mittlerer Kerndurchmesser (b) von SiHa-Mono- und Multilayern als Funktion der Zeit

3.1.4.2.1 Dickenwachstum der Multilayer

Zur Ermittlung des Dickenwachstums dienten Multilayer, deren Entnahme aus der Wachstumsbox zu verschiedenen Zeiten nach Kultivierungsbeginn erfolgte. Nach raschem Einfrieren in flüssigem Stickstoff sowie dem Ausstanzen und Aufblocken des Multilayers schloss sich die Anfertigung der Gefrierschnitte von 10-15 μm Dicke an.

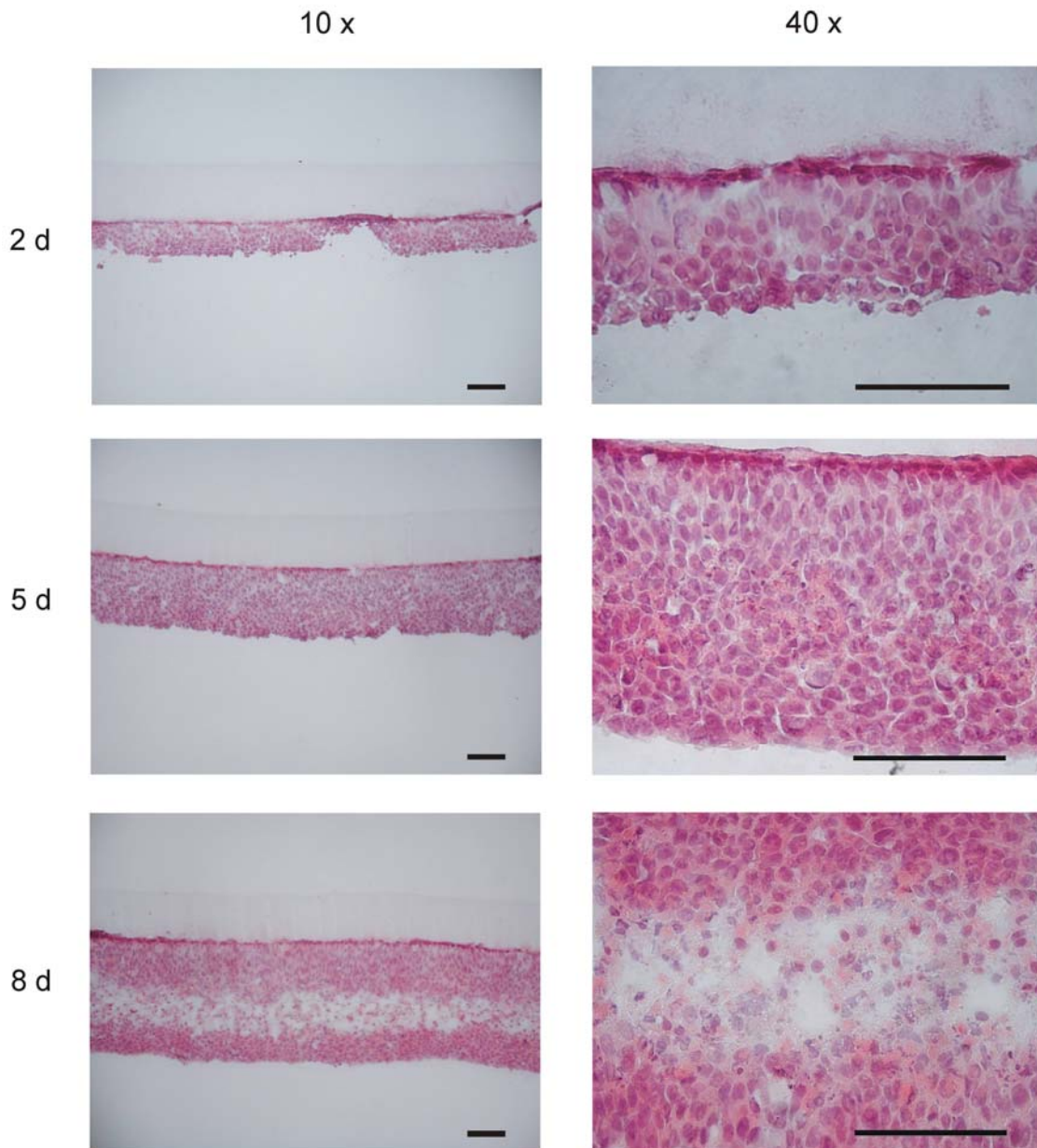


Abb. 31: HE-gefärbte Kryostatschnitte von WiDr-Multilayern nach Wachstumszeiten von 2, 5 und 8 Tagen. Die linken Abbildungen wurden mit einer 10-fachen, die rechten Abbildungen mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Membran ist bei den 10-fachen Vergrößerungen oberhalb des Multilayers diffuse zu erkennen. Der Balken entspricht 100 μm .

Nach einer Aceton-Fixierung kam eine Hämalaun-Eosin-Färbung der Schnitte zum Einsatz, gefolgt von der Begutachtung im Mikroskop. In der Abbildung 31 sind HE-gefärbte Schnitte von WiDr-Multilayern links mit 10-facher und rechts mit 40-facher Vergrößerung zu sehen. Die WiDr-Multilayer wuchsen sehr kompakt. Bereits nach 2 Tagen Kultivierung bzw. einem Tag Wachstum in der Box zeigte sich ein durchgehender Multilayer von 4-6 Zellschichten. Am Tag 5 konnten 12-14 Zellschichten sowie das Auftreten kleinerer Zellen im Zentrum des Layers mit Auflösung der Gewebestruktur beobachtet werden. Ab Tag 6 mit etwa 12-16 Zellschichten prägte die durchgehende Zentralnekrose das Bild.

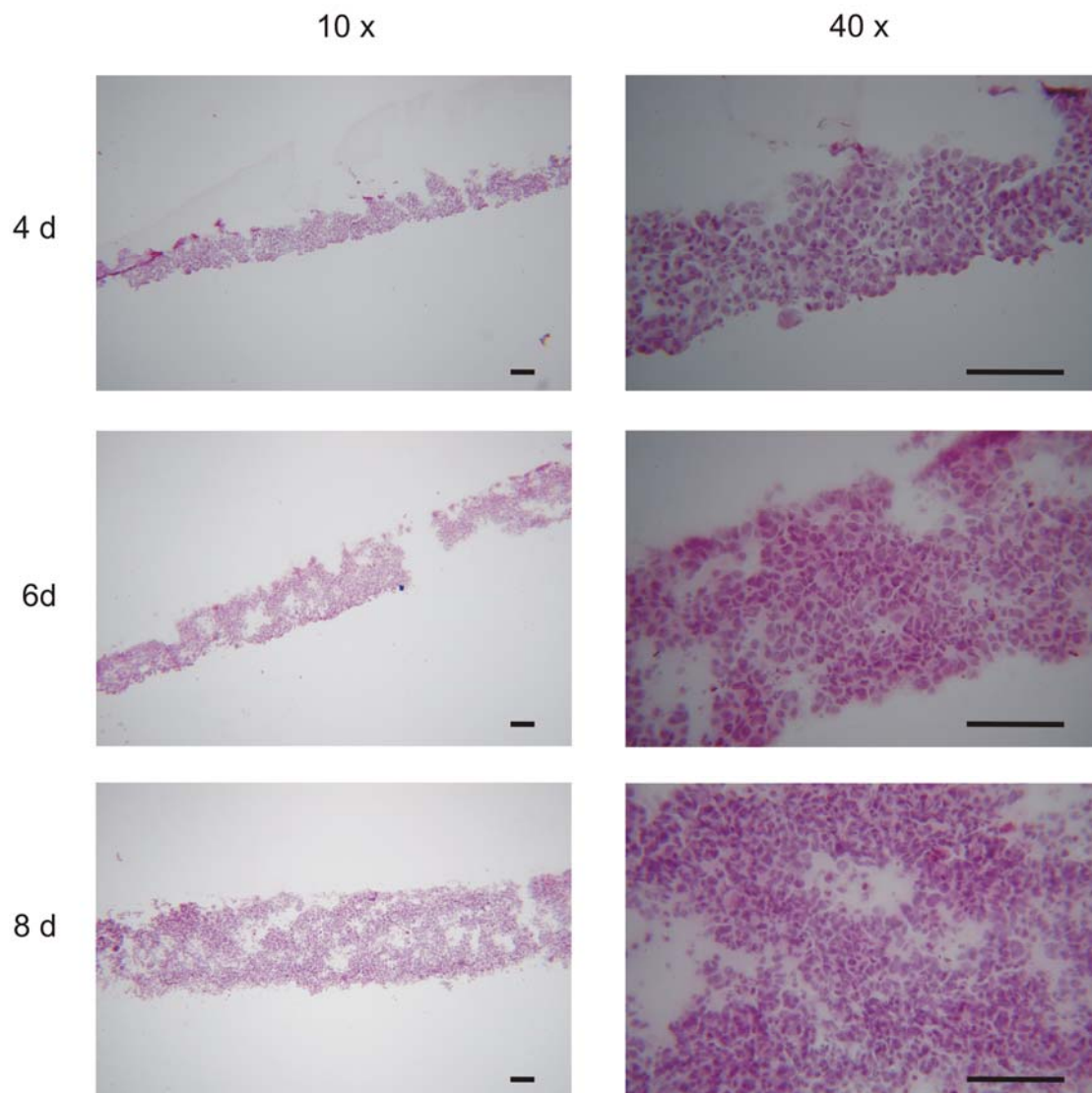


Abb. 32: HE-gefärbte Kryostatschnitte von SiHa-Multilayern nach Wachstumszeiten von 4, 6 und 8 Tagen. Die linken Abbildungen wurden mit einer 10-fachen, die rechten Abbildungen mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Balken entspricht 100 μm .

Die SiHa-Zellen bildeten einen lockeren Multilayer-Verband, waren also weniger kompakt als die WiDr-Multilayer. Einige HE-gefärbte Schnitte sind in Abbildung 32 aufgeführt. Es bildete sich keine Zentralnekrose wie bei den WiDr-Multilayern, sondern nekrotische Nester. Aufgrund des lockeren Zusammenhalts der Zellen untereinander erwies sich das Ausstanzen und Schneiden mit dem Kryotom für die SiHa-Multilayer schwieriger als für die WiDr-Zellen.

Mit Hilfe eines kalibrierten Maßstabs konnte die Dicke der Multilayer vermessen werden. In Abbildung 33 sind drei unabhängige Dickenwachstumskurven von WiDr-Multilayern dargestellt. Die Schichtdicke nahm in Abhängigkeit von der Zeit zu. Die halblogarithmische Auftragung der Schichtdicke sorgte für ein Sichtbarmachen des exponentiellen Zusammenhangs. Die Verdopplungszeit betrug 3,4 d (81,6 h). Nur bei einem von drei Experimenten fiel am 10. Wachstumstag die Schichtdicke ab.

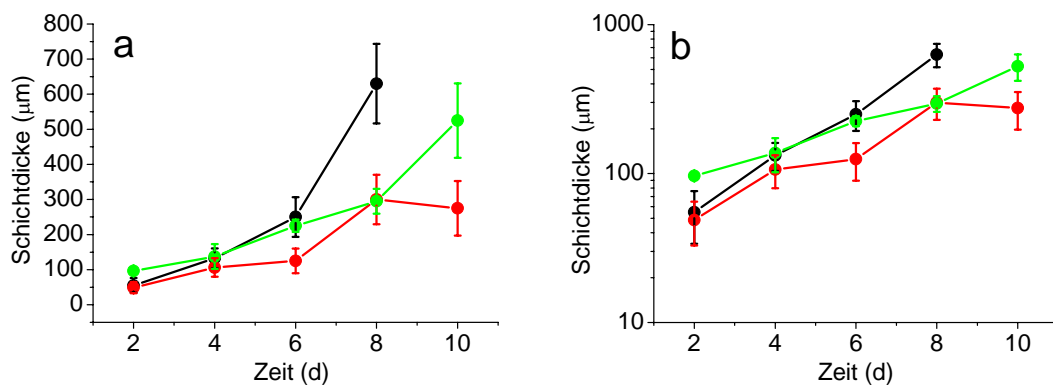


Abb. 33: Auftragung der Schichtdicken von drei unabhängigen Experimenten der WiDr-Multilayer in Abhängigkeit von der Zeit

a: lineare Auftragung, b: halblogarithmische Auftragung

Ein durchgeführtes Experiment der SiHa-Zellen zum Dickenwachstum wurde zusammen mit dem Mittelwert der drei oben gezeigten Experimenten der WiDr-Multilayer (Abb. 32) in Abbildung 34 zusammengestellt. Die SiHa-Zellen verhielten sich ähnlich wie die WiDr-Zellen. Die Verdopplungszeit betrug 3,2 d (76,4 h). Am Tag 5 wurde ein höherer Wert gemessen als der Kurvenverlauf vermuten ließ.

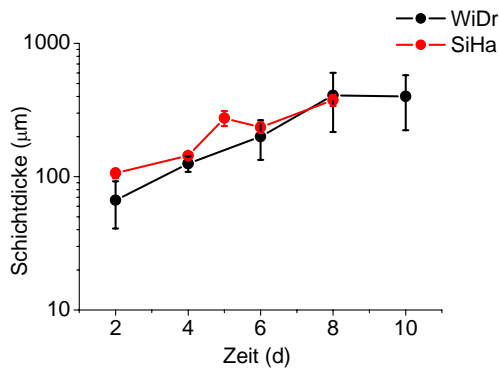


Abb. 34: Schichtdicke von WiDr- und SiHa-Multilayern in Abhängigkeit von der Zeit

Bei jeweils einem Experiment von SiHa- und WiDr-Multilayern fand parallel die Messung der Zellzahl und der Schichtdicke statt. Die Ergebnisse sind in einer gemeinsamen Auftragung je Zelllinie in Abbildung 35 wiedergegeben. Für die WiDr-Multilayer ist anschaulich zu erkennen, dass die Zunahme der Zellzahl bis Tag 6 stärker erfolgte als die der Schichtdicke. Nach dem Tag 6 sank die Zellzahl ab, wohingegen die Schichtdicke weiterhin zunahm. Für die SiHa-Multilayer zeigte sich dieser Zusammenhang ebenfalls, jedoch weniger stark ausgeprägt. Die Verdopplungszeit für die Schichtdicken betragen für die WiDr-Multilayer 3,4 Tage und für die SiHa-Multilayer 3,2 Tage.

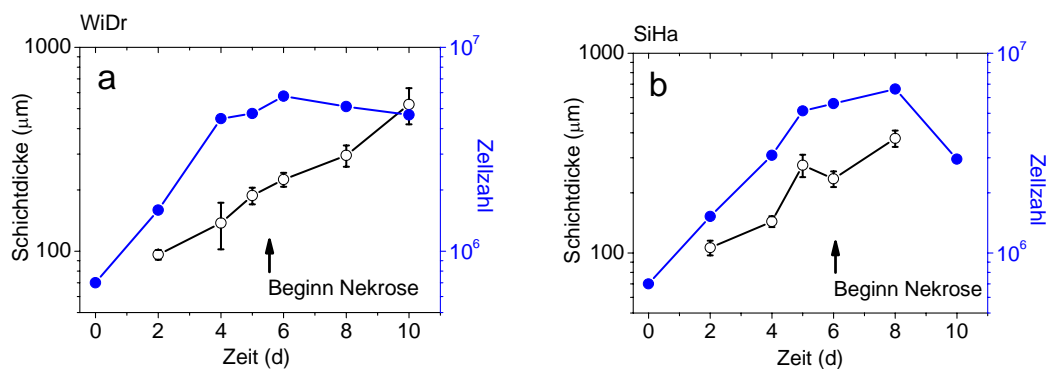


Abb. 35: Halblogarithmische Auftragung von Schichtdicke (offene Symbole) und Zellzahl (geschlossene Symbole) in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur

a: WiDr-Multilayer, b: SiHa-Multilayer

Die Tabelle 19 dient dem Vergleich der Verdopplungszeiten der Zellzahlen und der Schichtdicken beider Zelllinien. Bei Betrachtung der ermittelten Verdopplungszeiten bestanden generell keine großen Unterschiede. Bei den SiHa-Multilayern erfolgte die Zunahme der Schichtdicke in Relation zur Zellzahlverdopplung schneller als bei den WiDr-Zellen.

Tab. 19: Verdopplungszeiten (t_2) der Multilayer bezüglich der Zellzahl und der Schichtdicke

Multilayer	t_2 der Zellzahl	t_2 der Schichtdicke
WiDr	2,4 d (57,4 h)	3,4 d (81,8 h)
SiHa	2,6 d (61,2 h)	3,2 d (76,4 h)

3.1.4.2.2 Ki-67-Färbung der multizellulären Systeme

Die immunhistochemische Färbung des nukleären Proteins Ki-67 diente dem Nachweis des proliferierenden Anteils der Zellen im Multilayer.

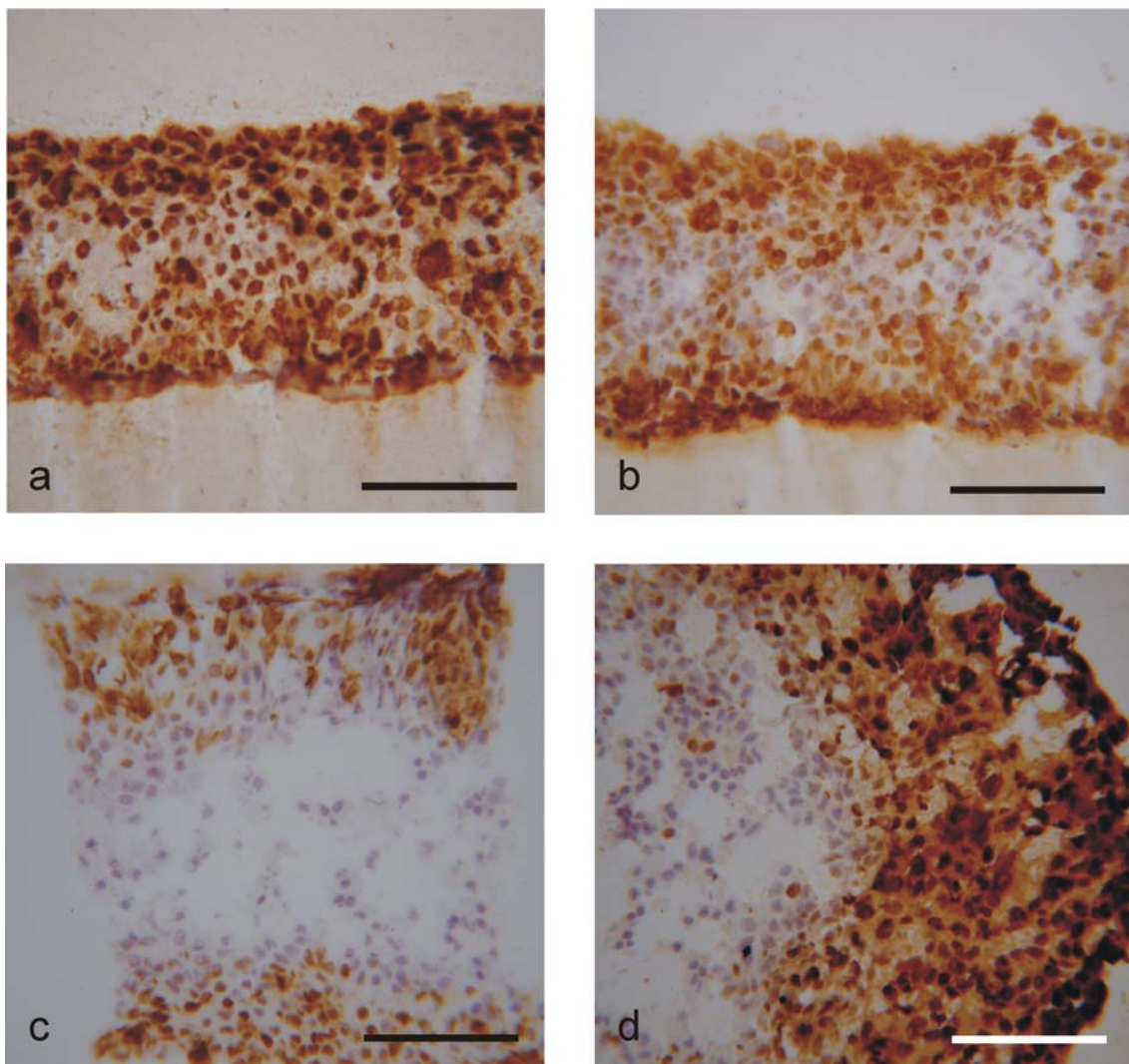


Abb. 36: Darstellung der Gefrierschnitte von WiDr-Zellen nach unterschiedlichen Wachstumszeiten als Multilayer (a-c) oder Sphäroid (d) nach Durchführung der Ki-67-Immunfärbung und Hämalaun-Gegenfärbung in 40-facher Vergrößerung (Balken entspricht 100 μm); proliferierende Zellen erkennbar an der Braunfärbung;

Wachstumszeit: a: 4d, b: 5d, c: 8d, d: 15d

In Abbildung 36 sind Ki-67-gefärbte Schnitte von WiDr-Multilayern (a bis c) sowie eines 15 Tage alten WiDr-Sphäroids (d) nach Gegenfärbung mit Hämalaun aufgeführt. Die Braunfärbung stellt die Ki-67-positiven Zellen dar. In Abhängigkeit von der Zeit nahm die durchgehende Braunfärbung des Multilayers (a) ab und war nach 8 Wachstumstagen nur noch an der Randschicht (c) auszumachen. Die Zellen im Inneren des Multilayers wurden nur durch die Hämalaun-Gegenfärbung erkennbar. Als Vergleich diente die Färbung eines 15 Tage alten WiDr-Sphäroids (d), bei dem ebenfalls die Randschicht, aber nicht alle vitalen Zellen angefärbt waren.

3.2 Röntgenbestrahlung

3.2.1 Methodische Untersuchungen zur Dosimetrie

Die Kultivierung und Bestrahlung fand bei den Monolayern in Zellkulturflaschen und bei den Multilayern in Wachstumsboxen statt. Daraus ergaben sich Unterschiede im Bestrahlungsaufbau, da sich das Dosimeter im Fall der Monolayer direkt unter den Flaschen, bei den Multilayern jedoch in einigem Abstand unter der Box befand. Weiterhin waren die Zellen in der Mitte der Box untergebracht.

Um parallel zu den Untersuchungen zur Dosimetrie Bestrahlungsexperimente durchführen zu können, diente die Bestrahlung von Suspensionszellen. Dazu erfolgte nach Wachstum der Zellen als Monolayer, Multilayer oder Sphäroide eine Resuspendierung der Zellen direkt vor der Bestrahlung. Durch Überführung der Suspensionskulturen in einem verminderten Mediumvolumen in Zellkulturflaschen waren für alle Proben die gleichen Bedingungen während der Bestrahlung gewährleistet.

3.2.1.1 Absorption durch Medium und Plexiglas

Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden in der Abbildung 15 beschrieben, befand sich das Dosimeter 65 mm von den Zellen entfernt. Somit war die Strahlung an den Zellen höher als am Dosimeter. Zur Bestimmung dieses Absorptionsfaktors diente die Messung der Dosis innerhalb einer Integrationszeit von 6 sec in Abhängigkeit von der Box und der Medium-füllhöhe unter Annahme eines Verhaltens von Plexiglas und Medium, das näherungsweise dem von Wasser gleicht. Bei der halblogarithmischen Auftragung der relativen Dosis gegen die Schichtdicke, wie in Abbildung 37 gezeigt, ergab sich nach einer linearen Regression eine Steigung von -0,11.

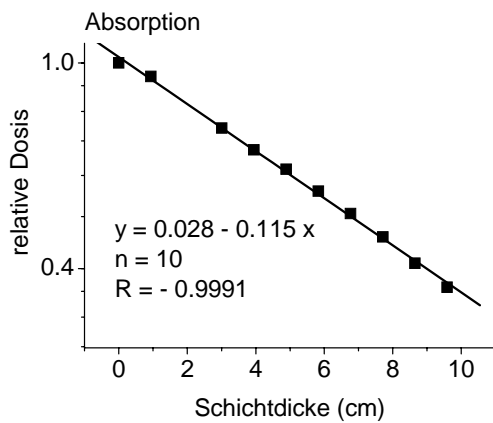


Abb. 37: Auftragung der relativen Röntgendosis als Funktion der Schichtdicke (Plexiglas und Medium)

Die Dosis D nimmt exponentiell mit der Schichtdicke x ab:

$$(9) \quad D(x) = e^{-kx}, \quad k = 0,11$$

Die Gesamtschichtdicke zwischen den Zellen und dem Dosimeter beträgt 6,5 cm, jedoch sind 2 cm davon Luft, die in die Absorption durch das Plexiglas und Medium nicht eingehen. Der Korrekturfaktor R_{abs} ergibt sich aus:

$$(10) \quad R_{\text{abs}} = \frac{D(x - 4,5)}{D(x)} = e^{0,11 \cdot 4,5} = 1,64$$

3.2.1.2 Abstand von der Röntgenröhre

Bei einem idealen punktförmigen Brennfleck der Röntgenröhre sollte die Dosis als Funktion des Abstandes vom Brennfleck quadratisch mit dem Abstand abnehmen.

$$(11) \quad D = \frac{1}{r^2}$$

Zur Überprüfung dieser Annahme erfolgte die Bestimmung der Dosis in Abhängigkeit des Abstandes von der Röntgenröhre.

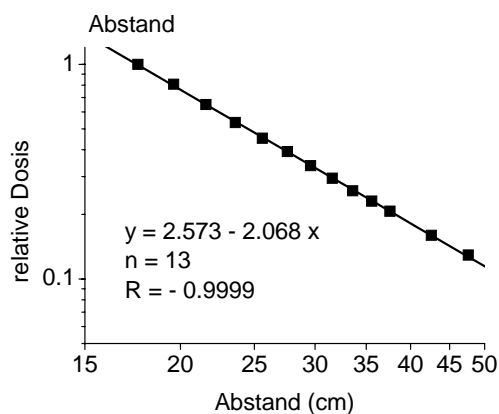


Abb. 38: Auftragung der relativen Dosis in Abhängigkeit vom Abstand der Röntgenröhre (Fokus) zum Dosimeter

Bei der doppelt logarithmischen Auftragung der relativen Dosis gegen den Abstand (Abb. 38) ergab sich eine Steigung von -2,06, die eine gute Näherung des Gesetzes ist. Das Verhältnis der Dosis an der Zellposition zur gemessenen Dosis an der Dosimeterposition ergibt sich bei einem Abstand von 6,5 cm zu:

$$(12) \quad R_{\text{geom}} = \frac{x^{2,06}}{(x - 6,5)^{2,06}}$$

Demnach beträgt bei einem Gesamtabstand von 31,6 cm der geometrische Faktor 1,61. Der Abstand zwischen der Probe und den Filtern betrug ab diesem Zeitpunkt immer 14 cm. Er war durch das Anlegen einer Schablone gewährleistet.

3.2.1.3 Aufbau-Effekt

Für die weitere Klärung der Dosimetrie sorgte die exakte Positionierung des Dosimeters in der Zellposition in der Box, wobei diese Experimente PD Dr. Michael Scholz durchführte. Nach Einbringen von Bohrungen für das Dosimeter in eine Box registrierte er anschließend die Dosis bei zwei verschiedenen Mediumfüllständen, einmal bei 3 cm, bei der das Dosimeter gerade mit Flüssigkeit bedeckt war, sowie bei 6 cm. Weiterhin fanden Vergleichsmessungen in der Dosimeter-Standardposition (Dosimeter unter der Box) statt.

Tab. 20: Dosiswerte in der Standardposition bzw. Zellposition des Dosimeters sowie die sich aus dem Erwartungswert ergebene Abweichung

Füllstand	Dosis unter Box	Dosis in Zellposition	Dosis in Zellposition (erwartet)	Abweichung vom Erwartungswert
3 cm	1,39	3,90	3,67	+ 6 %
6 cm	0,98	3,10	2,59	+ 20 %

In der Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Dosismessung aufgeführt. Durch die Positionierung des Dosimeters in der Box konnte die nach Berechnung erwartete Dosis mit der tatsächlich gemessenen Dosis verglichen werden. In Abhängigkeit des Füllstandes über dem Dosimeter variierte die Abweichung vom Erwartungswert. Aufgrund dieser überraschenden Ergebnisse folgte eine genauere Untersuchung der Dosis in Abhängigkeit der Schichtdicken über dem Dosimeter. Dabei erhöhte sich der Füllstand jeweils um 2 mm ausgehend von dem halbbedeckten Dosimeter (Dicke = 0 cm). Die in Abbildung 39 aufgetragenen Dosiswerte in Abhängigkeit der Schichtdicke ergaben eine Schulterkurve, die erst ab einer Schichtdicke von 2 cm in eine rein exponentielle Form überging. Legte man in diesen linearen Teil der Kurve eine lineare Regression und extrapoliert diese, ergab sich im Schnittpunkt mit der y-Achse ein Wert von 1,14. Diesen Kurvenverlauf konnte Ratul Sarkar (Sommerstudent der GSI) bestätigen (Sarkar 2003). Den beobachteten Effekt nennt man Aufbaueffekt. Er tritt vor allem im Bereich höherer Photonenenergien (>0,6 MeV) auf. Dabei bewirken Sekundärelektronen, die sich in Strahlrichtung bewegen, für den Dosisaufbau. Er wird jedoch auch, wie in diesem Fall, in einem schmalen Bereich der harten Röntgenstrahlung (150-300 kV) beobachtet (Reich 1990).

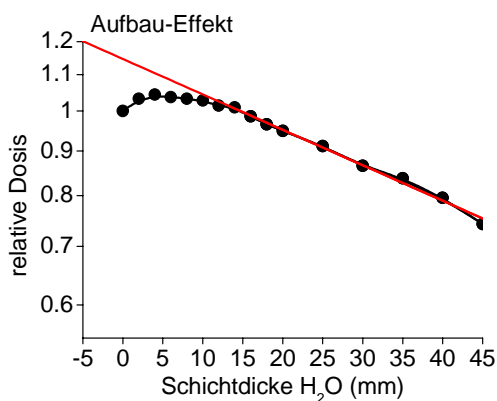


Abb. 39: relative Dosis in Abhängigkeit der Schichtdicke des Wassers über dem halbbedeckten Dosimeter

Die Gesamtkorrektur setzt sich demnach aus drei Korrekturfaktoren zusammen: dem Faktor für die Absorption von Medium und Plexiglas, dem Faktor für den Abstand von der Röntgenröhre und dem Faktor für den Aufbaueffekt, der durch die Mediumhöhe über dem Dosimeter bestimmt ist. Es ergibt sich somit:

$$(13) \quad \text{Korrekturfaktor} = R_{\text{abs}} \cdot R_{\text{geom}} \cdot R_{\text{aufbau}} = 1,64 \cdot 1,61 \cdot 1,14 = 3,01$$

Das Ergebnis der Division der gewünschten Dosis durch den Korrekturfaktor von 3,01 wurde am Dosimeter eingestellt.

3.2.2 Überleben nach Röntgenbestrahlung

3.2.2.1 Vergleichbarkeit der Zellen als adhärenzte Monolayer und als Suspensionszellen

Bis zur abgeschlossenen Bestimmung der Dosimetrie sollten die Zellen als frisch hergestellte Suspensionen bestrahlt werden. Abbildung 40 zeigt die Überlebenskurven von WiDr- und SiHa-Monolayern in Abhängigkeit ihrer Adhäsion zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Für beide Zelllinien bestehen kaum Unterschiede, ob die Zellen als adhärenzte Monolayer (rot) oder als frisch hergestellte Suspensionen (schwarz) bestrahlt wurden. Die adhärenzten WiDr-Zellen besitzen relativ große Fehlerbalken. Bei diesen Experimenten handelte es sich um die allerersten Bestrahlungsversuche, bei denen noch nicht die Qualität der darauf folgenden Untersuchungen bezüglich der Schnelligkeit bei der Aufarbeitung sowie der Genauigkeit bei der Versuchsdurchführung erreicht wurde. Ausgehend von der Übereinstimmung der Monolayerzellen in Abhängigkeit der Bestrahlungsweise war die Bestrahlung der Multilayer als Suspensionskulturen gerechtfertigt.

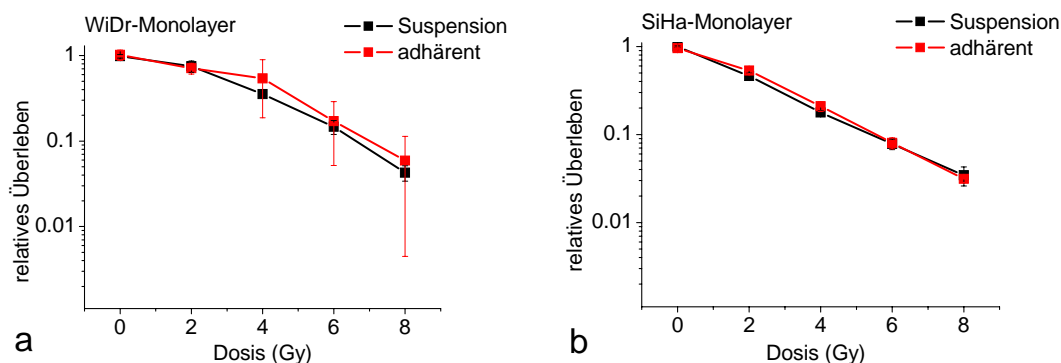


Abb. 40: Monolayer-Überlebenskurven nach Röntgenbestrahlung als adhärenzte Zellen oder in Suspension bestrahlt

a: SiHa-Zellen (n=4); b: WiDr-Zellen (n=3)

3.2.2.2 Wachstumsdauer der Multilayer

Durch die Untersuchungen des Dickenwachstums stellte sich eine Wachstumszeit der Multilayer von 5 Tagen für die Bestrahlungsversuche als optimal heraus. Zu diesem Zeitpunkt ist der Multilayer schon ein komplexes, mehrschichtiges Gebilde von etwa 12-14 Zellschichten, aber es liegt noch keine Nährstoff- oder Sauerstoffmangel anzeigende Nekrose vor. Trotzdem wurde das Überleben verschieden lang kultivierter Multilayer nach Röntgenbestrahlung untersucht. In Abbildung 41 ist ein gepaartes Experiment dargestellt, bei dem die Einsaat der Multilayer an unterschiedlichen Tagen, die Bestrahlung jedoch am gleichen Tag stattfand. Dieses Experiment

erfolgte zu einem Zeitpunkt, bei dem bis dahin nur der Korrekturfaktor bezüglich der Absorption von Medium und Plexiglas bekannt war. Doch anhand der Aufzeichnungen war die Entfernung der Box vom Dosimeter bekannt, so dass mit Hilfe des endgültigen Korrekturfaktors die tatsächlich verabreichte Dosis berechnet werden konnte.

Das Überleben des 3 Tage alten Multilayers war besser als das der dickeren Multilayer, wobei sich kein Unterschied zwischen Tag 5 und 7 zeigte. Aus späteren Untersuchungen zum Zellzyklus während der Wachstumskurven erklärte sich dieser Unterschied mit dem verschiedenen hohen Zellanteilen in der S-Phase (3Tage etwa 28 %, 5 und 7 Tage etwa 15 %).

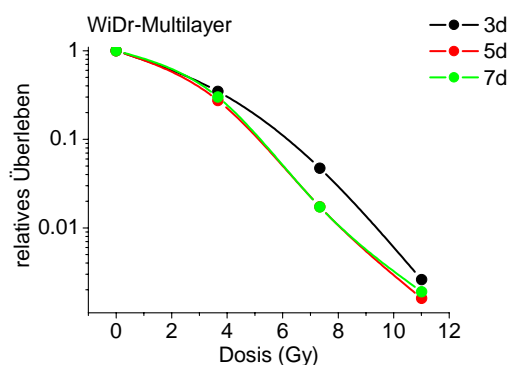


Abb. 41: relatives Überleben als Funktion der Röntgendosis von WiDr-Zellen nach verschiedenen Kultivierungszeiten als Multilayer

3.2.2.3 Begasung der Kulturboxen

Für einige Bestrahlungsversuche mussten mehrere Multilayer-Boxen parallel an die Begasung angeschlossen werden. Dabei stellte sich heraus, dass in Abhängigkeit der Mediumfarbe, also der Versorgung des Mediums mit CO₂, das Überleben stark variierte. Dem Kulturmedium war der Indikator Phenolrot zugesetzt, welcher im pH-Bereich von 6,4-8,2 einen Farbumschlag von gelb nach rot anzeigt.

In einem Experiment (Daten hier nicht gezeigt) erfolgte die Aufteilung der Monolayer in Petrischalen und Multilayer für eine Überlebenskurve auf zwei Boxen. Das Medium der Box 1 (Dosen 0 und 4 Gy) war besser (Mediumfarbe orange-rot) als das der zweiten Box (Dosen 2 und 6 Gy) begast (Mediumfarbe rot-violett). Besonders die Multilayer-Überlebenskurve zeigte eine diskontinuierliche Form. Die gut begasteten Dosispunkte 0 und 4 Gy wiesen ein geringeres Überleben als die schlechter begasteten Dosispunkte von 2 und 6 Gy auf. Scheinbar bewirkte die Begasung beim Multilayer-Wachstum einen stärkeren Effekt als bei den Monolayern.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurde der Versuch unternommen, absichtlich Boxen unterschiedlich gut zu begasen. Als Extrempunkt diente die Kultivierung einer Box in normaler Brutschrankatmosphäre mit Luftsauerstoff. Die Überlebenskurven mit guter Mediumversorgung bei 5 % Sauerstoff-Begasung unterschieden sich nicht von mit 21 % Luftsauerstoff begasteten Zellen

(siehe Abb. 42). Ab diesem Zeitpunkt erfolgte der Verzicht auf die Begasung mit dem Gasgemisch und eine Kultivierung der Boxen in dem normalen Brutschrank mit 5 % CO₂. Damit nahmen die großen Schwankungen von Experiment zu Experiment ab.

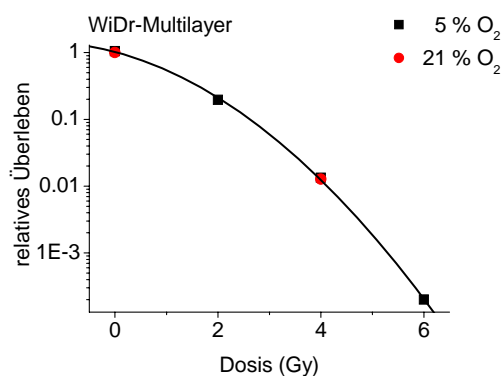


Abb. 42: relatives Überleben von WiDr-Multilayern in Abhängigkeit der Röntgendosis nach unterschiedlichen Sauerstoffbegasungen

3.2.2.4 Suspensionskulturen

Wie im Abschnitt Korrekturfaktoren bereits beschrieben, fand wegen Unsicherheiten in der Dosimetrie der Röntgenröhre der Umstieg auf Bestrahlung von Suspensionskulturen statt. Die Kultivierung erfolgte wachstumstypisch, d.h. für Monolayer in Kulturflaschen und für Multilayer in Boxen. Direkt vor der Röntgenbestrahlung wurden die Zellen trypsiniert. Es schloss sich die Einsaat von 5×10^5 Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen in einem Mediumvolumen von 3 ml Medium an. Die Suspensionszellen hatten, erleichtert durch das verminderte Mediumvolumen, am Ort der Bestrahlung 1 min lang Zeit, sich abzusetzen. In Abbildung 43 sind die Mittelwerte des relativen Überlebens von den WiDr-Zellen (je drei unabhängige Experimente) und SiHa-Zellen (Monolayer 8, Multilayer 4 unabhängige Experimente) zu sehen. Bei beiden Zelllinien zeigten die Multilayer ein sensitiveres Überleben nach der Röntgenbestrahlung als die entsprechenden Monolayer. Dieses Verhalten ist invers zu publizierten Daten von Sphäroiden. Diese zeigten entweder eine multizelluläre Resistenz oder das gleiche Überleben wie die Monolayer. In keinem Fall wurde von einer multizellulären Sensitivierung berichtet.

Bei den WiDr-Zellen war die Schulterform stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu war sie bei den SiHa-Zellen kaum und im Fall der Multilayer überhaupt nicht vorhanden. Das verdeutlichen auch die α/β -Werte in der folgenden Tabelle (Tab. 21). Bei einem kleinen Wert, wie im Fall der WiDr-Zellen, tritt die Krümmung in den Vordergrund. Der Unterschied zwischen Mono- und Multilayern ist bei den SiHa-Zellen ausgeprägter als bei den WiDr-Zellen.

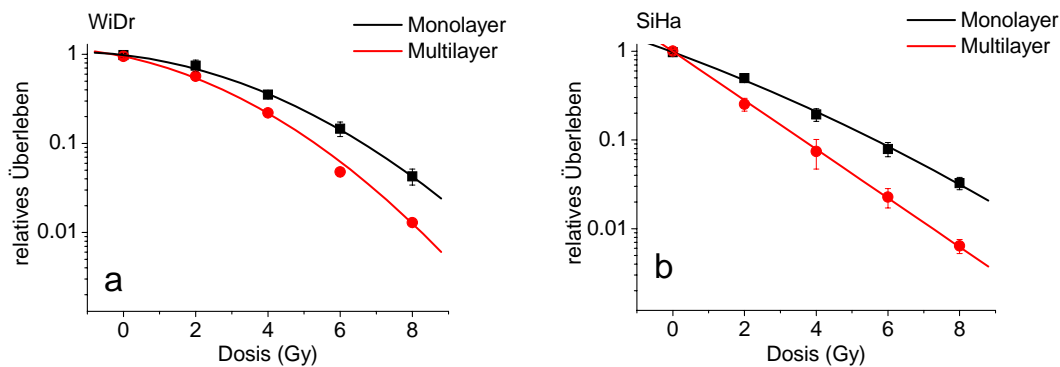


Abb. 43: Auftragung des relativen Überlebens (MW ± SD) von Mono- und Multilayern nach Röntgenbestrahlung als Suspensionskulturen (mindestens drei unabhängige Experimente)
a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen

Tab. 21: Koeffizienten der Überlebenskurven nach Röntgenbestrahlung als Zellsuspensionen

Zelllinie	Kultivierung	n	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	α / β
SiHa	Monolayer	8	0,344 ± 0,058	0,011 ± 0,008	31,3
	Multilayer	4	0,686 ± 0,098	0,007 ± 0,013	/ *
WiDr	Monolayer	3	0,107 ± 0,052	0,036 ± 0,009	3
	Multilayer	3	0,194 ± 0,016	0,043 ± 0,002	4,5

Bei * konnte kein α/β berechnet werden, da β mit 0 verträglich ist.

3.2.2.5 Vergleichbarkeit der Multilayer als Suspensionszellen und adhärent in der Box

In einem Bestrahlungsexperiment nach Abschluss der Dosimetrie der Röntgenröhre kam es zu einem Vergleich der Multilayer, die als Suspension oder als adhärente Multilayer auf der Millicell-Membran in der Box bestrahlt wurden. Die Überlebenskurve nach Bestrahlung der intakten Multilayer in der Box (n=1) wich kaum von dem Überleben der Suspensionszellen (n=4) ab. Die Kurve lag größtenteils im Bereich der Fehlerbalken. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 aufgeführt.

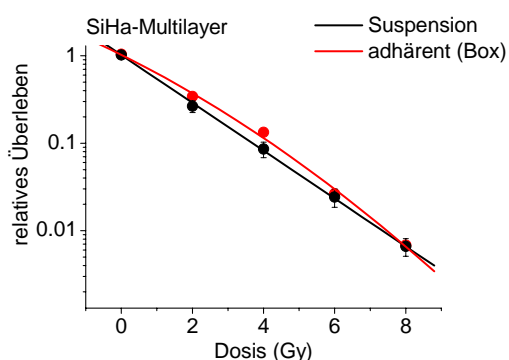


Abb. 44: Überleben von SiHa-Multilayern nach Röntgenbestrahlung als adhärente Zellen in der Box oder als Suspensionskulturen

3.2.2.6 Wachstum der Monolayer auf Collagen

Für das Wachstum der Multilayer ist eine Collagen I-Beschichtung der Membran der Millicell-Einsätze unbedingt erforderlich. Nach Beobachtung eines geringeren Überlebens der Multilayer nach Bestrahlung sollte der Effekt des Collagens auf das Überleben der Monolayer untersucht werden. Dazu diente die Beschichtung der Kulturflaschen entsprechend den Membranen der Multilayerkultivierung. Die Monolayerzellen zeigten keine Veränderung im Wachstum, jedoch dauerte die Ablösung mit Trypsin länger als normal. Die Überlebenskurven der Monolayer mit Collagen-Beschichtung verliefen für beide Zelllinien fast identisch mit der normalen Monolayerkurve. In Abbildung 45 ist exemplarisch das gepaarte Experiment der SiHa-Zellen aufgeführt.

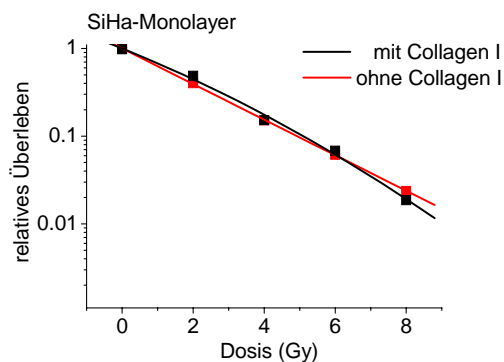


Abb. 45: relatives Überleben als Funktion der Röntgendosis von SiHa-Monolayern nach Kultivierung auf mit und ohne Collagen I beschichteten Kulturflaschen

3.2.2.7 Sphäroide

Wie bereits erwähnt, findet man in vielen Veröffentlichungen über Sphäroide die Beschreibung einer multizellulären Resistenz der Sphäroide nach ionisierender Bestrahlung im Vergleich zu Monolayern. Zur Klärung der Frage, ob es einen Unterschied zwischen Sphäroiden und Multilayern der gleichen Zelllinie hinsichtlich ihres Überlebens nach Bestrahlung gibt, wurden die Sphäroide ebenso wie die Mono- und Multilayer als Suspensionszellen bestrahlt. In der Abbildung 46 ist ein Experiment mit WiDr-Sphäroiden im Vergleich zu den Mittelwerten der entsprechenden Mono- und Multilayer (je drei unabhängige Experimente) aufgeführt. Es ist nur die Aussage eines Experimentes, aber eine signifikante Resistenz ist nicht beobachtbar. Mit den SiHa-Zellen fanden insgesamt 4 Sphäroid-Experimente statt. Wie schon im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, neigten die SiHa-Zellen stark zur unregelmäßigen Zellaggregation. Auch nach Überführung der Sphäroide in die Spinnerflaschen blieben diese unregelmäßig und wenig kompakt. Trotz dieser Unregelmäßigkeiten in der Kultivierung und der damit verbundenen größeren Streuung zwischen den Experimenten war ein deutlicher Trend in Richtung der Multilayer zu beobachten.

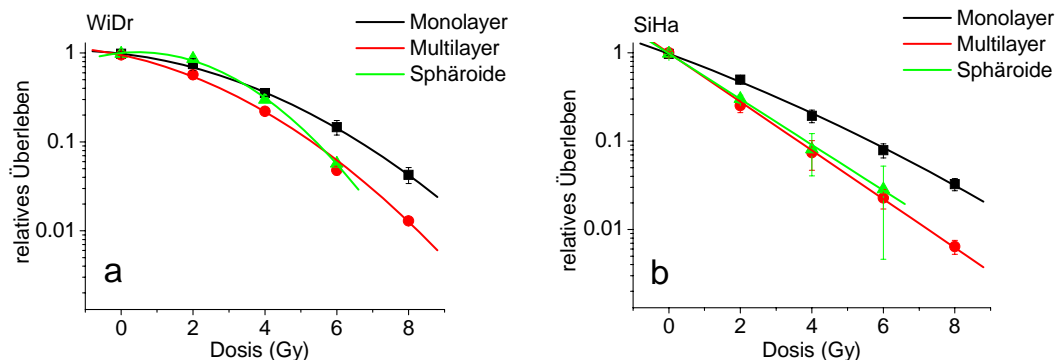


Abb. 46: Auftragung des relativen Überlebens von Monolayern, Multilayern und Sphäroiden als Funktion der Röntgendosis

a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen

In der Literatur führte man zur Beschreibung des Kontakteffektes von Sphäroiden einen Resistenzfaktor ein. Dieser beschreibt das Verhältnis der Dosen bei 10%igem Überleben (D_{10}) der Sphäroide bezogen auf die Monolayerdaten. Zum Vergleich des Überlebens aller Kultivierungsbedingungen sowie der beiden Zelllinien untereinander kamen in der Tabelle 22 das Überleben bei der Dosis von 2 Gy (SF2), die Dosis bei dem 10%igen Überleben (D_{10}) sowie der ermittelte Resistenzfaktor zur Auflistung. Die multizellulären Systeme der WiDr-Zellen zeigten mit 0,80 bzw. 0,81 (Multilayer bzw. Sphäroide) eine geringere Sensitivierung als die SiHa-Multilayer mit 0,63 bzw. 0,67 für die Sphäroide.

Tab. 22: SF2, D_{10} und Resistenzfaktor nach Röntgenbestrahlung in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsbedingungen (Details siehe Text)

Zellen	Kultivierung	n	SF2	D_{10}	Resistenzfaktor
WiDr	Monolayer	3	0,74	6,6	1
	Multilayer	3	0,57	5,3	0,80
	Sphäroide	1	0,84	5,4	0,81
SiHa	Monolayer	8	0,49	5,7	1
	Multilayer	4	0,28	3,6	0,63
	Sphäroide	4	0,30	3,8	0,67

3.2.2.8 Fraktionierte Bestrahlung

Aufgrund der geringen Schulerausprägung der SiHa-Zellen sollte das Reparaturverhalten der Zellen nach Röntgenbestrahlung beurteilt werden. Dies erfolgt durch eine fraktionierte Bestrahlung der Zellen im Vergleich mit einer Einzeldosisbestrahlung. Für die Fraktionierung fand

zunächst die Bestrahlung der Zellen mit jeweils der Hälfte der Dosis statt. Nach Inkubation der Zellen für 6 h im Brutschrank erhielten sie die zweite Hälfte der Dosis. In der Abbildung 47 sind beide Überlebenskurven dargestellt. Die Kurve der fraktioniert bestrahlten Zellen lag ab einer Dosis von 4 Gy oberhalb der Kurve mit den Zellen nach Einzeldosisbestrahlung. Man kann von einer geringen Reparaturfähigkeit der Zellen ausgehen.

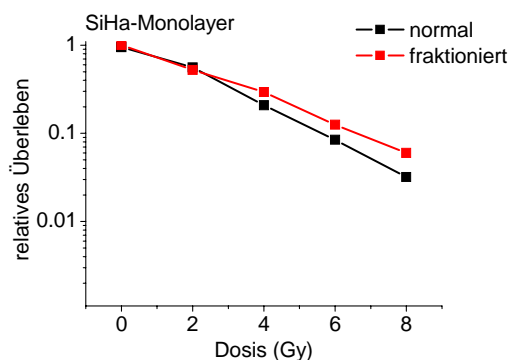


Abb. 47: relatives Überleben von SiHa-Monolayern als Funktion der Röntgendosis nach fraktionierter Bestrahlung oder Einzeldosisbestrahlung

3.3 Überleben nach Schwerionenbestrahlung

Die Schwerionenbestrahlung erfolgte am medizinischen Bestrahlungsplatz der GSI. Für die Positionierung der Patienten und der biologischen Proben wird mit Hilfe von Laserstrahlen ein dreidimensional festgelegtes Isozentrum definiert. Aufgrund der Patientenbestrahlungen erfolgten regelmäßig Dosimetriekontrollen. Die Strahlenergien waren so berechnet, dass 370 MeV (für die Plateaubestrahlung) oder ein ausgedehnter Bragg-Peak auf den Zellen auftrafen.

3.3.1 SiHa-Zellen

In der Abbildung 48 ist das Überleben von SiHa-Mono- und Multilayer nach der Schwerionenbestrahlung dargestellt. Wie erwartet war das Überleben im Bragg-Peak für beide Kultivierungsarten (Abb. a und b) geringer als in der Plateau-Phase. Eine getrennte Auftragung der Strahlenergien (Abb. c und d) zeigt deutlich, dass die Multilayer in beiden Fällen sensitiver waren als die Monolayer. Die Überlebenskurven zeigten einen rein exponentiellen Verlauf.

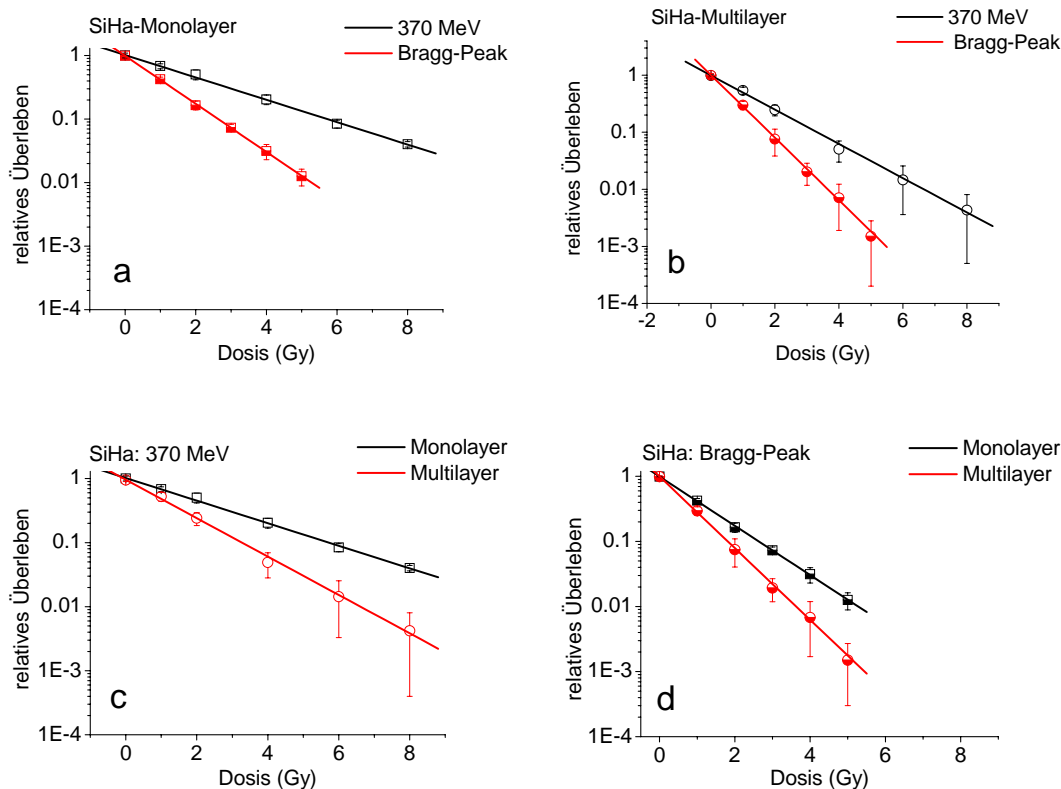


Abb. 48: Auftragung des relativen Überlebens der SiHa-Zellen nach Schwerionenbestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis

a: Monolayer, b: Multilayer, c: Bestrahlung im Plateau, d: Bestrahlung im Bragg-Peak

3.3.2 WiDr-Zellen

Die Bestrahlung der WiDr-Zellen führte zu ähnlichen Ergebnissen (siehe Abb. 49) wie bei den SiHa-Zellen, jedoch war hier der Unterschied zwischen Mono- und Multilayern geringer ausgeprägt. Die WiDr-Zellen wiesen einen Kurvenverlauf mit Schulter auf, wobei die einzige Ausnahme das Überleben der Multilayer im Bragg-Peak darstellte. In den Abbildungen b und d sind zwei Überlebenskurven für die WiDr-Multilayer aufgetragen. Wie im Abschnitt über die Begasung bereits erklärt, wechselte die äußere Atmosphäre von 5 % auf 21 % Sauerstoff, was aber nur die WiDr-Experimente zu Beginn dieser Arbeit betraf. Von insgesamt drei Experimenten mit Plateau-Bestrahlung erfolgte ein Experiment nach der Kultivierung bei 21 % Sauerstoff. Die Überlebenskurve unterschieden sich jedoch kaum von denen nach Kultivierung mit 5 % Sauerstoff. Nach Bragg-Peak-Bestrahlung verhielt sich das Überleben anders. Hier wurden zwei von insgesamt 5 Experimenten mit 21 % Sauerstoff durchgeführt. Die Überlebenskurve aller Experimente (Kultivierung mit 5 % und 21 % Sauerstoff, rote Kurve) lag oberhalb der beiden Bestrahlungen nach 21 % Sauerstoffkultivierung (grüne Kurve). Die Abweichungen vom Mittel-

wert waren bei der Überlebenskurve aller Bragg-Peak-Experimente sehr groß, so dass die Ergebnisse nicht signifikant verschieden von denen mit Luftsauerstoffkultivierung waren.

Bei den WiDr-Multilayern fand eine Änderung der Form der Überlebenskurven statt. So ging die bei den WiDr-Zellen typische Schulterform nach der Bragg-Peak-Bestrahlung in eine rein exponentielle Form über. Das führte dazu, dass bis 3-4 Gy die Multilayer sensitiver, aber ab 5 Gy resistenter als die Monolayer waren.

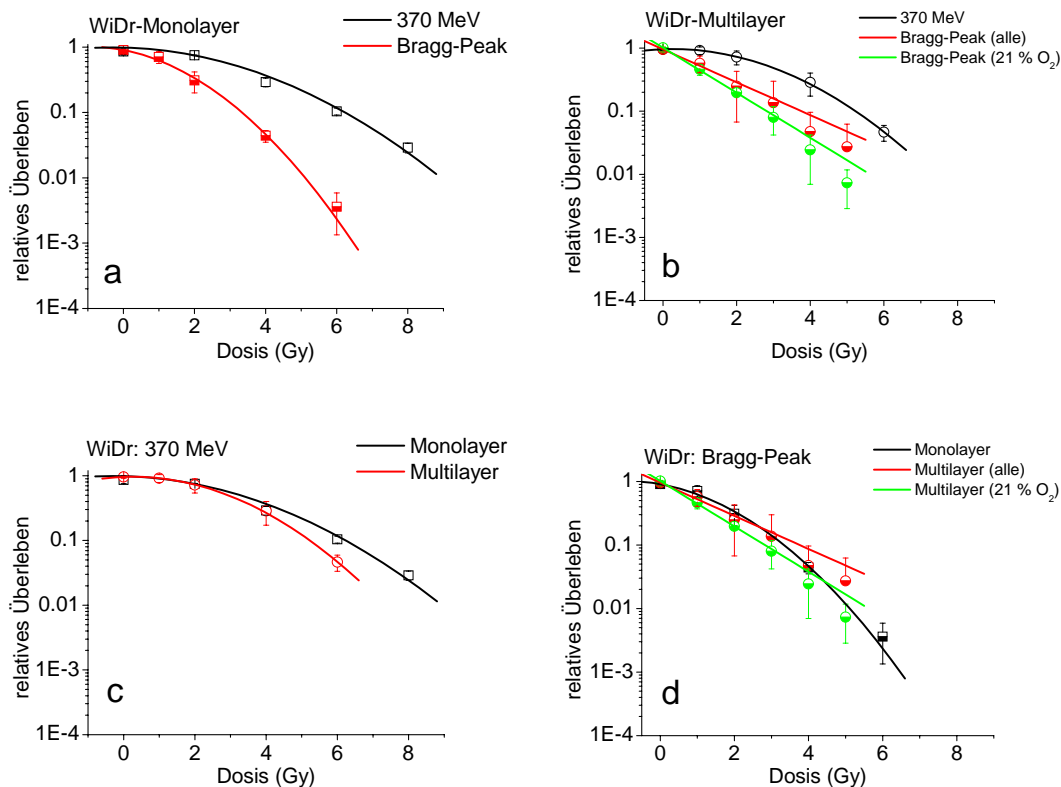


Abb. 49: Darstellung des relativen Überlebens von WiDr-Zellen nach Bestrahlung mit Schwerionen in Abhängigkeit von der Dosis

a: Monolayer, b: Multilayer, c: Bestrahlung im Plateau, d: Bestrahlung im Bragg-Peak

In der Tabelle 23 sind die Koeffizienten der Überlebenskurven nach der Schwerionenbestrahlung unterschieden nach Zelllinie, Kultivierung und Bestrahlung aufgelistet. In allen Fällen war der α -Wert, der Auskunft über die Anfangssteigung gibt, im Plateau kleiner als im Bragg-Peak. Die α/β -Werte waren nur noch für die WiDr-Monolayer sowie die WiDr-Multilayer im Plateau anzugeben.

Tab. 23: Auflistung der Koeffizienten der Überlebenskurven nach Schwerionenbestrahlung

Zellen	Bestrahlung	n	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	α / β
SiHa-Monolayer	Plateau	4	$0,398 \pm 0,072$	$0,001 \pm 0,009$	/ *
	Bragg-Peak	4	$0,868 \pm 0,085$	$0,001 \pm 0,025$	/ *
SiHa-Multilayer	Plateau	4	$0,622 \pm 0,088$	$0,007 \pm 0,018$	/ *
	Bragg-Peak	4	$1,204 \pm 0,216$	$0,026 \pm 0,077$	/ *
WiDr-Monolayer	Plateau	2	$0,029 \pm 0,074$	$0,054 \pm 0,009$	* /
	Bragg-Peak	3	$0,243 \pm 0,205$	$0,125 \pm 0,050$	1,9
WiDr-Multilayer	Plateau	3	$0,047 \pm 0,139$	$0,092 \pm 0,026$	* /
	Bragg-Peak (alle)	5	$0,466 \pm 0,454$	$0,060 \pm 0,173$	/ *
	Bragg-Peak (21 % O ₂)	2	$0,714 \pm 0,113$	$0,052 \pm 0,055$	/ *

Bei * konnte kein α/β berechnet werden, da α oder β mit 0 verträglich sind.

3.4 Vergleich von Röntgen- und Plateaubestrahlung

Nach Auftragung des Überlebens der SiHa-Zellen nach Röntgen- und Plateaubestrahlung gemeinsam in einem Diagramm (Abb. 50) zeigte sich ein fast identisches Kurvenverhalten. Dies bestätigte die Aussagen, dass die Plateau-Bestrahlung etwa der Niedrig-LET-Strahlung wie z.B. der Röntgenstrahlung entspricht.

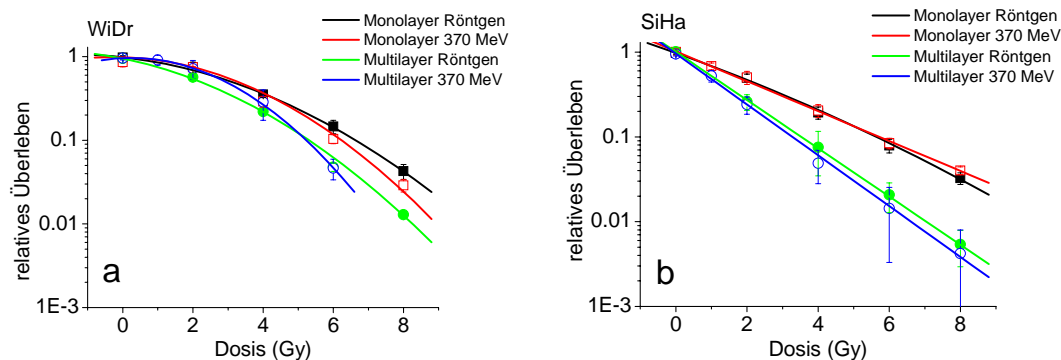


Abb. 50: relatives Überleben von Mono- und Multilayern nach Röntgen- und Plateau-Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis

a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen

3.5 Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW)

Zum Vergleich der Wirkung der verwendeten Strahlenarten für Mono- und Multilayer beider Zelllinien sind in Tabelle 24 die Überlebensdaten bei 2 Gy (SF2), die Dosen bei einem 10%igen

Überleben (D_{10}) und die daraus ermittelte relative biologische Wirksamkeit (RBW_{10}) bei einem 10%igem Überleben bezogen auf die Röntgenbestrahlung aufgeführt.

Tab. 24: SF2, D_{10} , RBW_{10} sowie den Resistenzfaktor in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsbedingungen sowie der Bestrahlungsmodalitäten

Zellen	Bestrahlung	SF2	D_{10} (Gy)	RBW_{10}	Resistenzfaktor
WiDr-Monolayer	Röntgen	0.74	6.6	1.0	1
	370 MeV	0.75	6.3	1.1	1
	Bragg-Peak	0.34	3.3	2.0	1
WiDr-Multilayer	Röntgen	0.57	5.3	1.0	0,80
	370 MeV	0.75	6.3	1.0	0,83
	Bragg-Peak (alle)	0.29	3.7	1.4	1,13
	Bragg-Peak (21 % O ₂)	0.20	2.8	1.9	0,85
SiHa-Monolayer	Röntgen	0.49	5.7	1.0	1
	370 MeV	0.44	5.9	1.0	1
	Bragg-Peak	0.18	2.6	2.2	1
SiHa-Multilayer	Röntgen	0.28	3.6	1.0	0,63
	370 MeV	0.27	3.3	1.1	0,57
	Bragg-Peak	0.08	1.8	2.0	0,70

Die Angaben der RBW_{10} bestätigten die Beobachtungen aus den Überlebenskurven. Die Plateaubestrahlung war in ihrer biologischen Wirkung (Werte 1,0-1,1) vergleichbar mit der Röntgenbestrahlung. Die RBW -Werte der Bestrahlung im Bragg-Peak bei Kultivierung mit Luftsauerstoff waren mit 1,9-2,2 erhöht. Lediglich der Wert für die WiDr-Multilayer, bei dem die Überlebensdaten von 5 % Sauerstoff mit eingingen, lag mit 1,4 niedriger. Die Sensitivierung der WiDr-Multilayer war mit 0,80-0,85 deutlich geringer ausgeprägt als bei den SiHa-Multilayern mit 0,57-0,70.

3.6 Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Etoposid

Bei den Multilayern wurde eine Sensitivierung des Überlebens nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung beobachtet. Bei beiden Bestrahlungsmodalitäten handelt es sich um ionisierende Strahlung, die DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Es interessierte nun das Verhalten der Multilayer nach einer Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Etoposid, welches ebenfalls DNA-Doppelstrangbrüche bewirkt.

3.6.1 Wachstum der Monolayer auf Collagen

Wie schon in früheren Abschnitten erwähnt, erfolgte die Kultivierung der Multilayer auf einer Collagen-beschichteten Membran. Das Collagen I zeigte nach Röntgenbestrahlung keinen Effekt auf das Überleben der Monolayer. In einem gepaarten Experiment wurde dies auch für das Überleben nach der Etoposid-Behandlung untersucht. Es zeigte sich ebenfalls kein Unterschied im Überleben mit und ohne Collagen-Kultivierung der Monolayer wie in Abbildung 51 dargestellt ist.

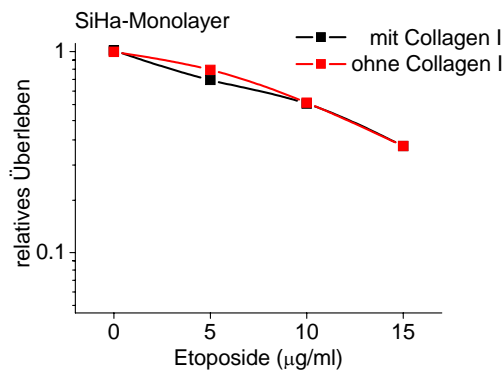
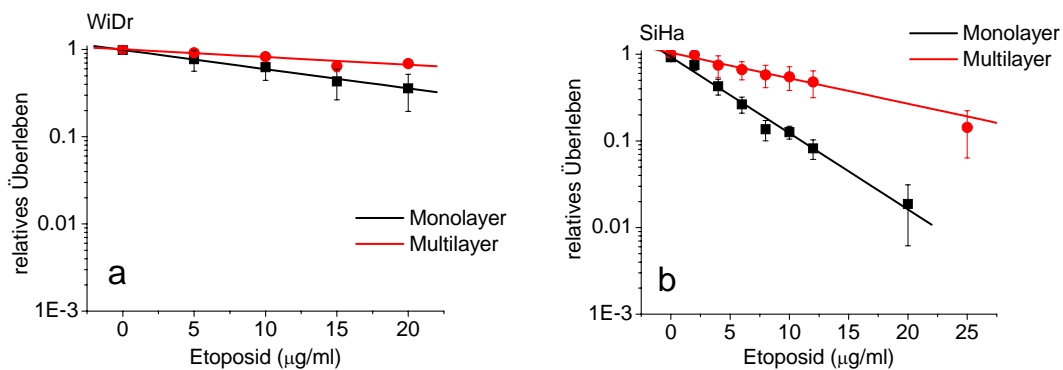


Abb. 51: relatives Überleben von SiHa-Monolayern in Abhängigkeit der Etoposid-Konzentration nach Kultivierung in Kulturflaschen mit und ohne Beschichtung mit Collagen I

3.6.2 Überleben der Suspensionskulturen

Das Etoposid-haltige Medium sollte für 30 min auf die Zellen einwirken. Für den Ausschluss von Diffusionseffekten bei den multizellulären Systemen sorgte die identische Vorbehandlung der Zellen wie bei den Suspensionsversuchen der Röntgenbestrahlung. Direkt vor der Etoposid-Behandlung erfolgte für Mono- und Multilayer sowie Sphäroide die Trypsinierung der Zellen und Einsaat als Suspensionskulturen in Kulturflaschen. In der Abbildung 52 sind die Ergebnisse aus 3-4 unabhängigen Experimenten aufgetragen. Beide Zelllinien zeigten ein besseres Überleben der Multilayer im Vergleich zu den Monolayern. Dieses Verhalten spiegelt die Literaturdaten der multizellulären Resistenz nach Chemotherapie wieder. Es ist jedoch invers zu den hier ermittelten Ergebnissen nach Bestrahlung.



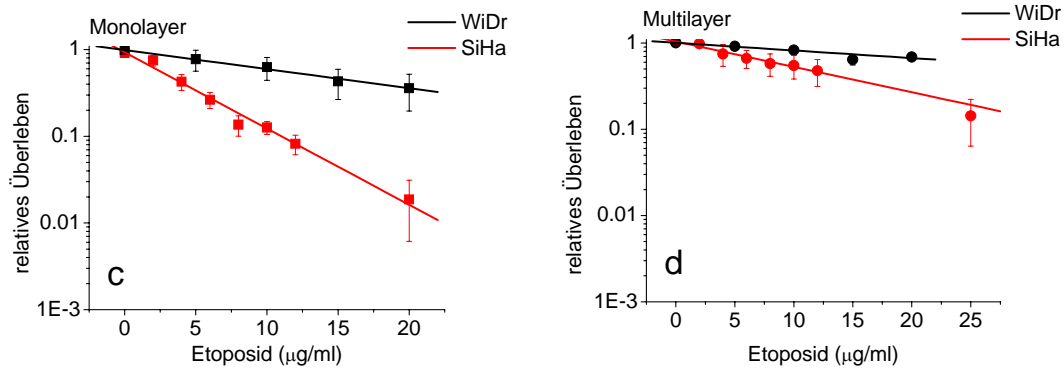


Abb. 52: relatives Überleben als Funktion der Etoposid-Konzentration (MW \pm SD von 3-4 unabhängigen Experimenten)

a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen, c: Monolayer, d: Multilayer

Weiterhin konnte auch ein Experiment mit WiDr-Sphäroiden nach Etoposid-Behandlung durchgeführt werden. Das ermittelte Überleben ist im Vergleich zu den Mittelwerten der Mono- und Multilayer in Abbildung 53 aufgeführt. Die Überlebenskurve der Sphäroide lag zwischen denen von Mono- und Multilayern.

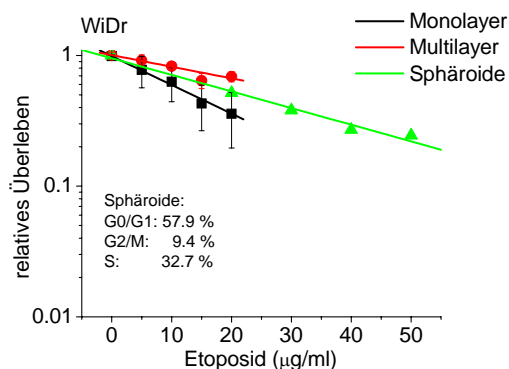


Abb. 53: relatives Überleben von Monolayer, Multilayern und Sphäroiden als Funktion der Etoposid-Konzentration

In der Tabelle 25 sind die Etoposidkonzentrationen bei einem Überleben von 10 % sowie der ermittelte Resistenzfaktor der Multilayer aufgelistet. Dabei wurde auf die Extrapolation der Regressionsgeraden in der Annahme eines weiterhin linearen Kurvenverlaufes zurückgegriffen. Es ergab sich ein Resistenzfaktor von 2,5 für die WiDr-Multilayer und 3,1 für die SiHa-Multilayer bezogen auf die entsprechenden Überlebensdaten der Monolayer. Die WiDr-Sphäroide, es handelte sich hier jedoch um nur ein Experiment, zeigten einen Resistenzfaktor von 1,7 und lagen damit unterhalb der WiDr-Multilayer.

Tab. 25: Angaben der Etoposid-Konzentrationen bei einem 10%igen Überleben sowie des Resistenzfaktors in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsbedingungen

Zellen	Kultivierung	n	Etoposid-Konzentration bei 10%igem Überleben ($\mu\text{g/ml}$)	Resistenzfaktor
WiDr	Monolayer	3	44,7	1
	Multilayer	3	111,5	2,5
	Sphäroide	1	77,3	1,7
SiHa	Monolayer	4	11,2	1
	Multilayer	4	34,5	3,1

3.6.3 Wiederaussaat resuspendierter Multilayer

Die Multilayer zeigten nach der Behandlung mit Etoposid ein deutlich besseres Überleben als die Monolayer. Es interessierte, wie lange diese Resistenz nach Dissoziation der Multilayer anhielt. Dazu erfolgte die Trypsinierung der 5 Tage alten SiHa-Multilayer und die Einsaat der resuspendierten Zellen als Monolayer in Kulturflaschen. Zu verschiedenen Zeiten nach der Wiederaussaat wurden die Zellen erneut trypsinisiert und als Suspensionen mit Etoposid behandelt. Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 54 a aufgeführt. Zur Orientierung dient die Auftragung der Mittelwerte von Mono- und Multilayern, die aus Gründen der Übersicht in einem eigenen Diagramm (Abb. 54 b) dargestellt sind.

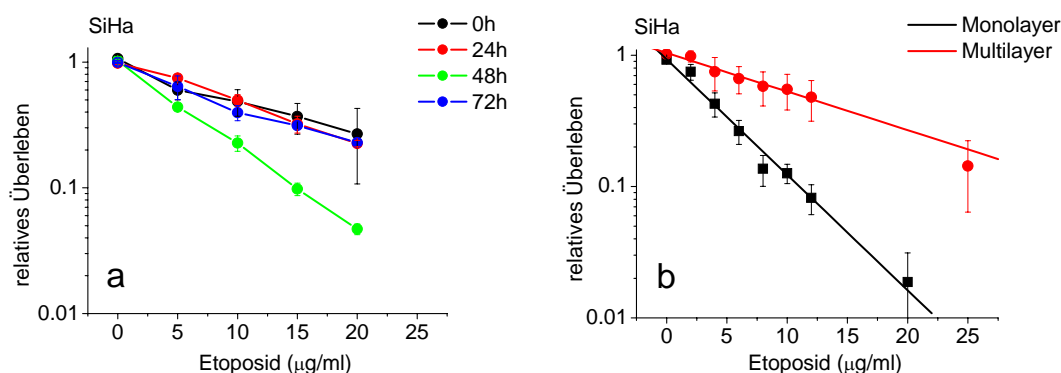


Abb. 54: relatives Überleben von SiHa-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid-Konzentration (MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten)

a: Multilayer, nach Etoposid-Behandlung zu verschiedenen Zeiten nach Dissoziation

b: SiHa-Mono- und Multilayer (entspricht Abb. 52 b, nur mit anderer Skalierung)

Die Experimente nach 0 h sowie 24 h nach Wiedereinsaat zeigten das gleiche Zellüberleben und entsprachen denen der Multilayer-Mittelwerte. Die Kurve nach 48 h war viel sensitiver und

bewegte sich deutlich in Richtung der Überlebenskurve der Monolayer-Mittelwerte. Doch entgegen der Annahme der Fortsetzung dieser Tendenz, wies die Überlebenskurve nach 72 h wieder ein Verhalten wie nach kurzen Zeiten auf. Sie entsprach wieder den resistenten Multi-layer-Mittelwerten.

3.7 Untersuchungen des Zellzyklus

3.7.1 Zellzyklusverteilung während des Wachstums

Mit Hilfe des Durchflußzytometers erfolgte die Messung der Verteilung der Zellen im Zellzyklus. In der Abbildung 55 ist der Anteil bzw. die Gesamtzellzahl der WiDr- und SiHa-Monolayerzellen in den Zellzyklusphasen während der Erstellung einer Wachstumskurve zu sehen. In Abhängigkeit von der Wachstumszeit änderte sich der Zellanteil in der G2/M-Phase gering, wohingegen eine stärkere Abnahme der Zellen in der S-Phase und ein deutlicher Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase zu beobachten war. Die SiHa-Zellen zeigten einen etwas niedrigeren Anteil an Zellen in der S-Phase und dementsprechend etwas höheren Zellanteil in der G0/G1-Phase. Am 10. Tag der Wachstumskurve erfolgte bei den SiHa-Zellen ein Anstieg in S-Phase mit gleichzeitigem Abknicken der Kurve der G0/G1-Phase. Die etwas andere Auftragung in der Abbildung b, nämlich der Gesamtzellzahl in den entsprechenden Zellzyklusphasen, verdeutlichte dieses Abknicken der Kurve der G0/G1-Zellen stärker.

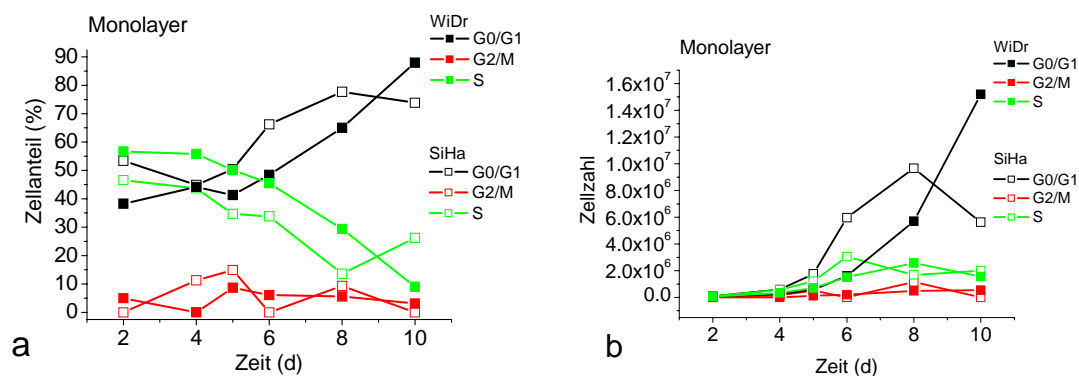


Abb. 55: Prozentualer Zellanteil (a) bzw. Zellzahl (b) von SiHa- und WiDr-Monolayern als Funktion der Kultivierungsdauer

WiDr-Zellen: geschlossene Symbole, SiHa-Zellen: offene Symbole

Bezüglich der Zellzyklus-Verteilung während des Multilayerwachstums unterschieden sich die beiden Zelllinien weniger stark als beim Monolayerwachstum (siehe Abb. 56). Auch bei den Multilayern stieg mit der Zeit der Anteil an G0/G1-Zellen, wohingegen der Zellanteil in der

S-Phase abnahm. Der Anteil an G2/M-Zellen blieb weitestgehend unverändert. Ab Tag 5 änderte sich die Zellzyklusverteilung nicht mehr.

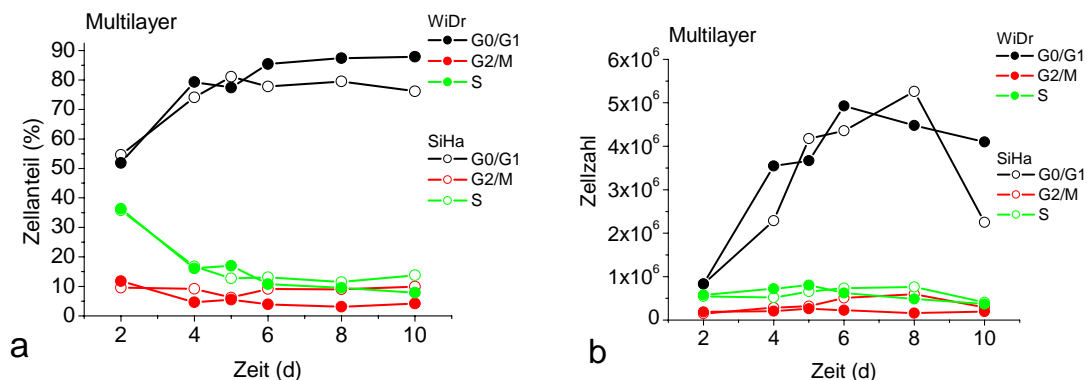


Abb. 56: Auftragung des prozentualen Zellanteils (a) bzw. der Zellzahl (b) von SiHa- und WiDr-Multilayern als Funktion der Kultivierungsdauer

WiDr-Zellen: geschlossene Symbole, SiHa-Zellen: offene Symbole

In der Abbildung 57 ist der Zellanteil in den Zellzyklusphasen von Mono- und Multilayern gemeinsam, aber getrennt nach den Zelllinien aufgetragen. Dabei wird der große Unterschied zwischen den Anteilen der G0/G1-Phase und der S-Phase offensichtlich, wobei die Zellverteilung der G2/M-Zellen fast identisch war. Die Werte für den 5. Wachstumstag sind in der Tabelle 26 zusammengefasst, da an diesem Tag der Beginn der meisten Experimente lag.

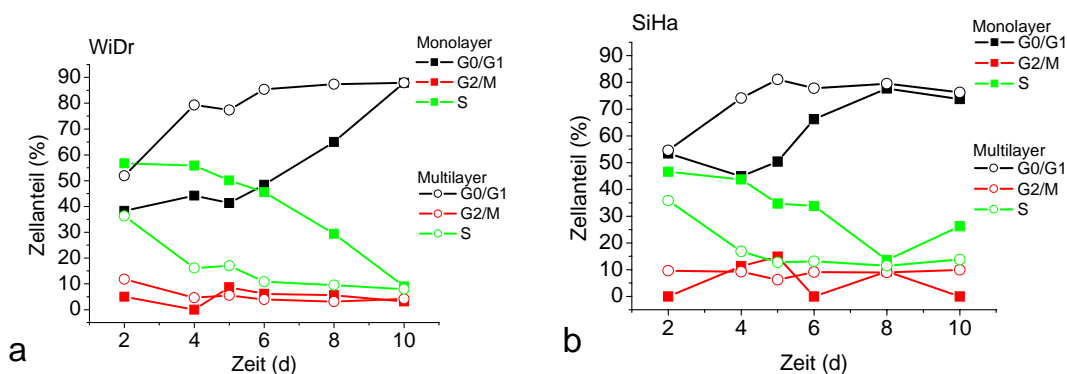


Abb. 57: Prozentualer Zellanteil von Mono- und Multilayern in den jeweiligen Zellzyklusphasen als Funktion der Kultivierungsdauer

a: WiDr-Zellen, b: SiHa-Zellen

Tab. 26: Zellzyklus-Verteilung am Wachstumstag 5 und Start der meisten Experimente

	SiHa			WiDr		
	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Monolayer	50,4	34,7	14,9	41,3	50,1	8,7
Multilayer	81,1	12,7	6,2	77,4	17,0	5,5

3.7.2 Zellzyklus-Analyse nach Bestrahlung

3.7.2.1 Wachstum nach Bestrahlung

Nach 8 Gy Röntgen- und Bragg-Peak-Bestrahlung erfolgte die Untersuchung der Zellzyklus-Verteilung der SiHa-Zellen mittels der Durchflußzytometrie in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung. Da für die Aufarbeitung der Proben maximal 1×10^6 Zellen zur Verwendung kamen, war vorher eine Bestimmung der Zellzahl erforderlich.

In Abbildung 58 sind die zeitabhängigen Beobachtungen von drei unabhängigen Experimenten nach Röntgenbestrahlung aufgeführt. Die Zellzahl der bestrahlten Monolayer stieg weniger an als die der unbestrahlten Kontrolle. Die Verdopplungszeiten betragen für 0 Gy 18 h und für 8 Gy 45 h. Für die unbestrahlten Multilayer war bis 18 h nach Bestrahlung zunächst eine Zunahme der Zellzahl zu beobachten, deren Anstieg dann abflachte. Im Gegensatz dazu nahm die Zellzahl der bestrahlten Multilayer bis 12 h vergleichbar der unbestrahlten Kontrolle zu. Im Anschluss daran blieb die Zellzahl bis etwa 48 h unverändert. Zwischen 48 h und 72 h kam es zu einer Abnahme der Zellzahl, die anschließend wieder leicht anstieg.

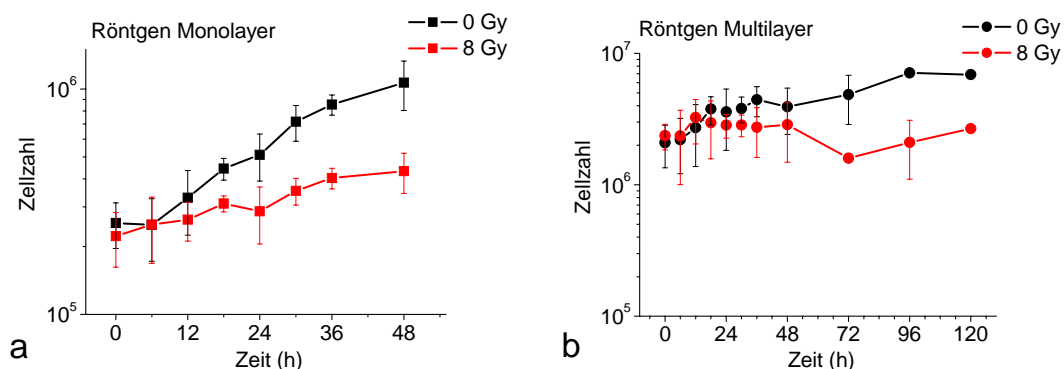


Abb. 58: Zellzahl (MW ± SD) von SiHa-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Röntgenbestrahlung (n=3)

a: Monolayer, b: Multilayer

Nach der Bestrahlung mit Schwerionen verhielten sich die unbestrahlten Zellen ebenso wie nach Röntgen. Bei den bestrahlten Monolayern nahm die Zellzahl nach Bragg-Peak-Bestrahlung geringfügig ab im Vergleich zum leichten Anstieg nach Röntgenbestrahlung. Die Multilayer zeigten eine leichte Abnahme der Zellzahl mit einem größeren Abknicken der Kurve bei 120 h. In der Abbildung 59 sind die Beobachtungen der Mono- und Multilayer unterteilt nach den Bestrahlungsmodalitäten aufgeführt.

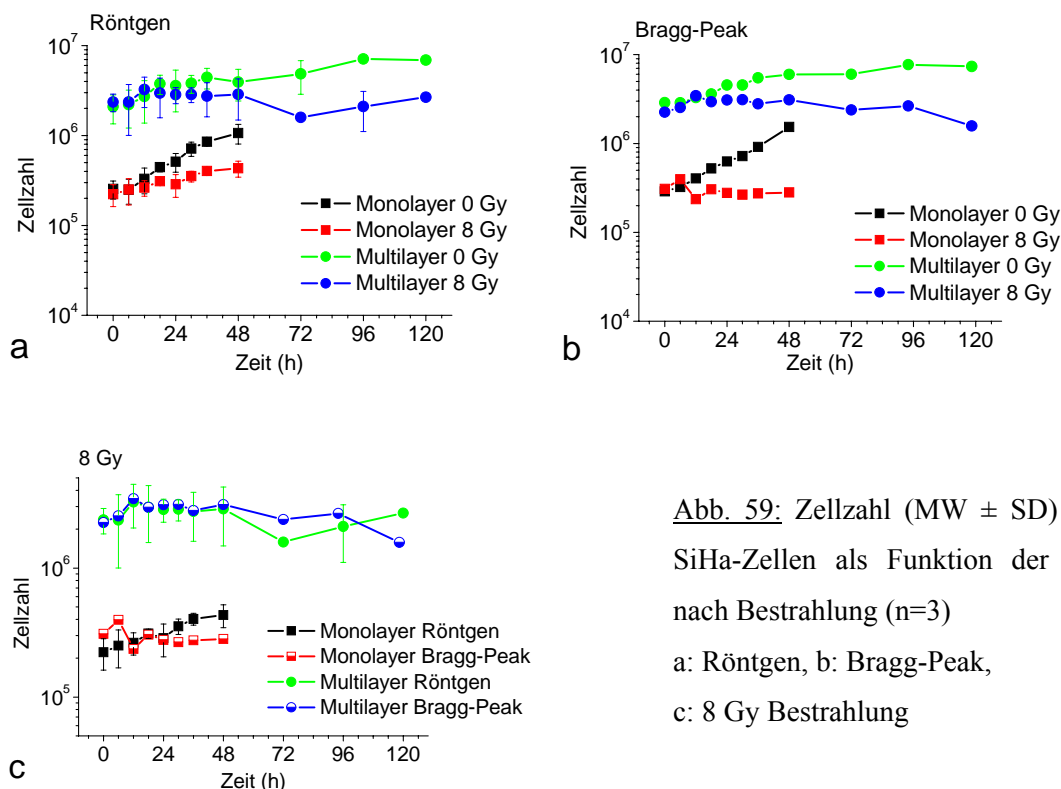


Abb. 59: Zellzahl (MW \pm SD) von SiHa-Zellen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung (n=3)

a: Röntgen, b: Bragg-Peak,

c: 8 Gy Bestrahlung

Mit der Abnahme der Zellzahl nahm gleichzeitig die Zahl der toten Zellen und des Debris zu. In Abhängigkeit von der Zeit wuchs die Zellgröße der bestrahlten Proben an. Dies war sowohl mit dem Zellzählgerät Casy an der Verschiebung der Zelldurchmesser zu größeren Durchmessern als auch im Durchflußzytometer im Diagramm FSC gegen SSC zu beobachten. In Abbildung 60 sind die Durchmesserangaben eines Zellzyklusexperimentes aufgetragen. Der Zelldurchmesser der SiHa-Monolayer nahm ausgehend von etwa 18,5 μm auf etwa 22 μm nach 8 Gy Röntgenbestrahlung bzw. auf etwa 26,5 μm nach 8 Gy Bragg-Peak-Bestrahlung zu. Für die Multilayer bewegte sich die Größenzunahme von 16,5 μm auf 20 μm bzw. 18,5 μm nach 8 Gy Röntgen- bzw. Bragg-Peak-Bestrahlung. Bei den unbestrahlten Proben kam es entsprechend der Wachstumskurve zu einer Abnahme des Zelldurchmessers.

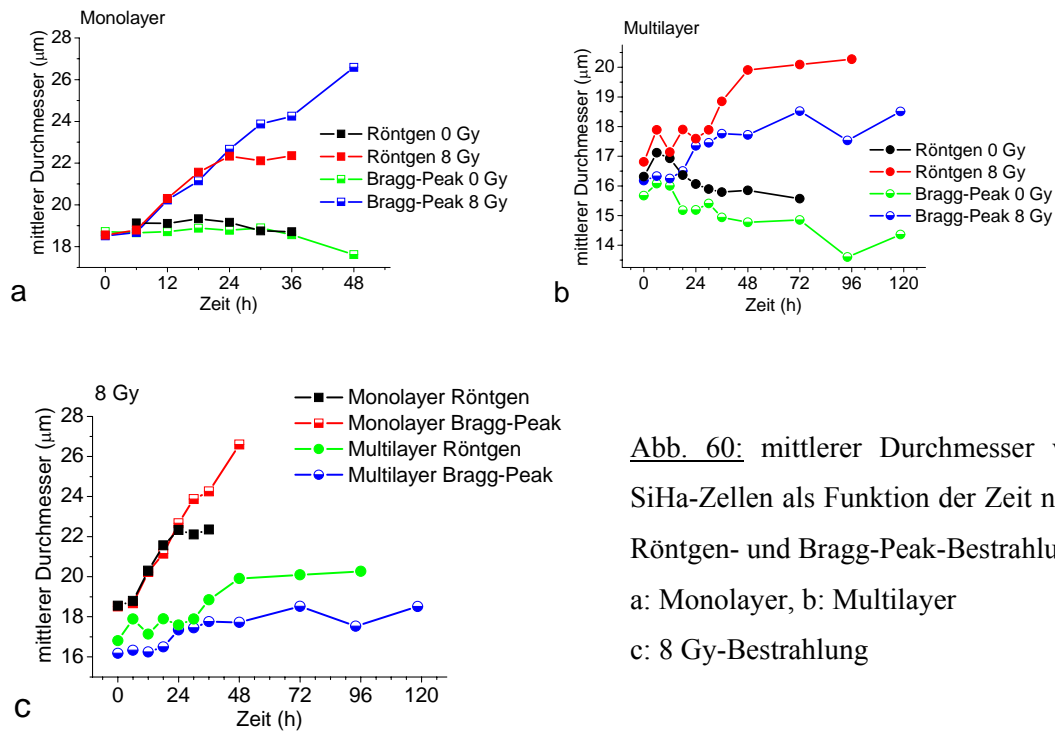


Abb. 60: mittlerer Durchmesser von SiHa-Zellen als Funktion der Zeit nach Röntgen- und Bragg-Peak-Bestrahlung
a: Monolayer, b: Multilayer
c: 8 Gy-Bestrahlung

Aufgrund des zunehmenden Durchmessers der bestrahlten Zellen war es bei den späten Zeitpunkten schwierig, die vitale Zellpopulation im Messfenster FSC gegen SSC einzugrenzen. Um alle Zellen zur Auswertung heranzuziehen, wurde auf das Eingrenzen der vitalen Population verzichtet. Parallel erfolgte dies auch mit den entsprechenden unbestrahlten Kontrollen.

3.7.2.2 Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung

Zwei übliche Zellzyklusverteilungen nach Auswertung im Wincycle-Programm sind exemplarisch in der Abbildung 61 dargestellt, einmal die unbestrahlten Zellen (Abb. 61 a) sowie die nach 8 Gy bestrahlten Zellen im Bragg-Peak (Abb. 61 b). Hier erfolgte die Aufarbeitung beider Monolayerproben 18 h nach der Bestrahlung.

Die unbestrahlten Zellen zeigten den typisch diploiden Chromosomensatz. Der linke Gipfel symbolisiert die Zellen in der G₀/G₁-Phase, der rechte Peak die G₂/M-Zellen. Letztere besitzen den doppelten Chromosomensatz, ersichtlich an der verdoppelten Fluoreszenzintensität (Rechtsverschiebung). Die Zellen zwischen beiden Maxima entsprechen den Zellen in der S-Phase, die gerade in verschiedenen Stufen ihrer DNA-Verdopplung sind. Bei den bestrahlten Zellen stieg der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase signifikant an, wobei sich weniger Zellen in der G₀/G₁- und S-Phase befanden. Die bei der Software-Auswertung ermittelten Prozentzahlen wurden in Abhängigkeit der Dosis oder Zeit aufgetragen.

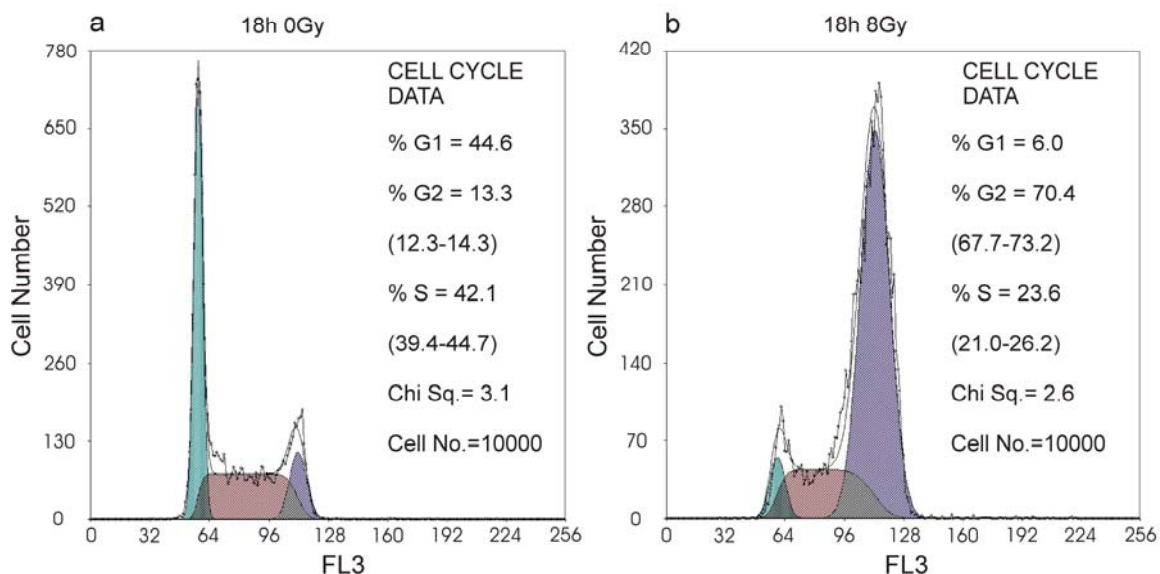


Abb. 61: Zellanzahl als Funktion der Fluoreszenzintensität von SiHa-Monolayer 18 h nach Bestrahlung im Bragg-Peak

a: unbestrahlt, b: mit 8 Gy bestrahlt

Die ersten Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung fanden mit WiDr-Monolayern statt. In der Abbildung 62 ist ein Experiment 24 h nach verschiedenen Dosen mit Bragg-Peak-Bestrahlung aufgeführt. Der dosisabhängige Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase war verbunden mit einer Abnahme der Zellen in der G0/G1- und der S-Phase. Diesen Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase nennt man auch Arrest, weil es zeitweise zur Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase durch Verhinderung der Zyklusfortsetzung kommt.

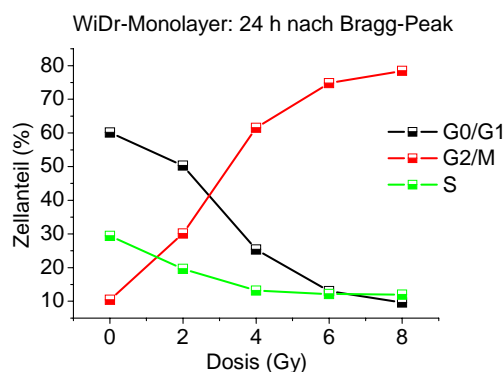


Abb. 62: prozentualer Zellanteil von WiDr-Monolayern als Funktion der Dosis 24 h nach Bragg-Peak-Bestrahlung

Weiterhin gab es Untersuchung zur Zeitabhängigkeit des G2/M-Arrests nach verschiedenen Röntgendosen. Zur besseren Verständlichkeit diente die Abbildung 63 mit der alleinigen Auftragung des Anteils der G2/M-Zellen. Ab einer Dosis von 6 Gy war ein deutlicher Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase zu beobachten, der sich bis 10 Gy weiter steigerte. Mit zunehmender Dosis benötigten die Zellen auch mehr Zeit, um wieder in den Zellzyklus einzutreten.

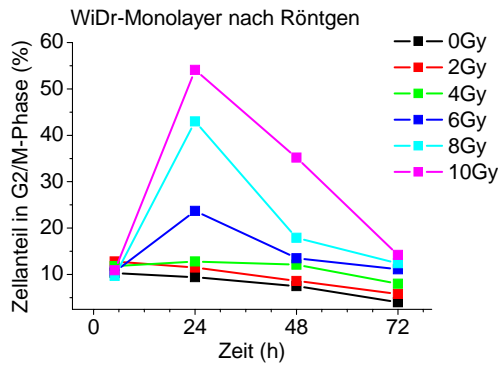


Abb. 63: Prozentualer Zellanteil von WiDr-Monolayern in der G2/M-Phase als Funktion der Zeit nach verschiedenen Röntgendosen

3.7.2.3 Zellzyklus-Analyse nach Röntgenbestrahlung

Für die folgenden Experimente fiel die Wahl auf die Bestrahlung mit den Dosen 0 und 8 Gy, um deutliche Effekte beobachten zu können. Zur Untersuchung kamen ausschließlich SiHa-Zellen, da deren Multilayer eine stärkere Radiosensitivierung im Vergleich zu den WiDr-Zellen zeigten. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte wachstumstypisch, d.h. in Kulturflaschen bezüglich der Monolayer und in Boxen hinsichtlich der Multilayer. Alle Experimente zu den Zellzyklusverteilungen nach Röntgenbestrahlung fanden nach Abschluss der Röntgendosimetrie statt. Somit waren identische Bedingungen von Mono- und Multilayern gewährleistet.

In Abbildung 64 ist die Zellzyklus-Verteilung von drei unabhängigen Experimenten der SiHa-Monolayer zu verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. Bei der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 64 a) änderte sich die Verteilung kaum. Dagegen akkumulierten die bestrahlten Zellen (Abb. 64 b) zeitabhängig 6 h bis 36 h nach Röntgenbestrahlung in der G2/M-Phase. Gleichzeitig nahm der Anteil der Zellen in der G0/G1- und S-Phase ab, da die Zellen im Zellzyklus bis zur G2/M-Arretierung voranschritten.

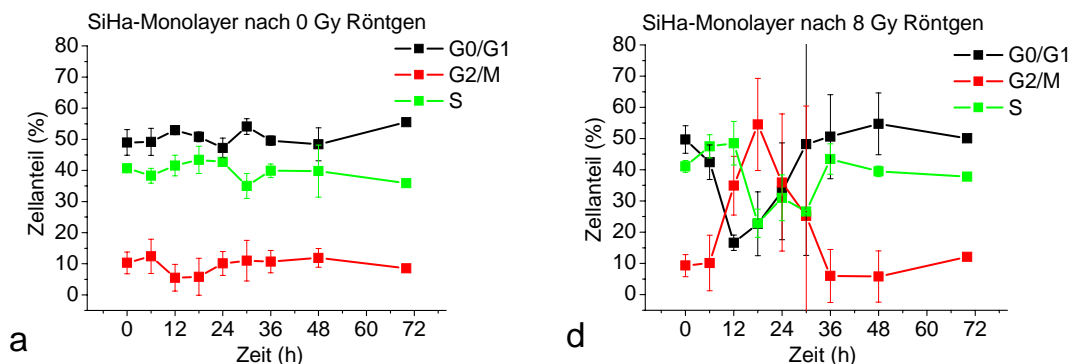


Abb. 64: Prozentualer Zellanteil (MW \pm SD) als Funktion der Zeit von SiHa-Monolayern in den entsprechenden Zellzyklusphasen nach Röntgenbestrahlung (n=3)

a: unbestrahlt, b: Bestrahlung mit 8 Gy

Betrachtet man die Zellzyklusverteilung der SiHa-Multilayer in der Abbildung 65, erkennt man sowohl in der unbestrahlten als auch der bestrahlten Probe eine viel geringere Variation (kleinere Fehlerbalken) zwischen den drei verschiedenen Experimenten als bei den Monolayern. Die mit 8 Gy bestrahlten Multilayer zeigten einen deutlichen, zeitlich sehr begrenzten Anstieg der S-Phase-Zellen (Maximum bei etwa 18 h), der weniger deutlich auch bei den Monolayern beobachtet werden konnte. Nach Abklingen der Akkumulation in der S-Phase begann der G2/M-Arrest, der bis zum Ende der Untersuchung bis maximal 120 h nach Bestrahlung anhielt.

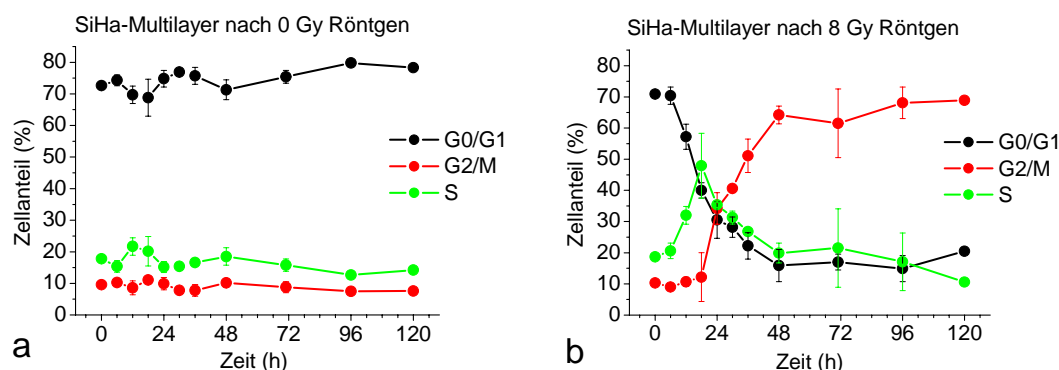


Abb. 65: Prozentualer Zellanteil (MW \pm SD) als Funktion der Zeit von SiHa-Multilayern in den entsprechenden Zellzyklusphasen nach Röntgenbestrahlung (n=3)

a: unbestrahlt, b: Bestrahlung mit 8 Gy

Zur Gegenüberstellung der bestrahlten Mono- und Multilayer (Abb. 66) diente die Auftragung ausschließlich der interessierenden Zellanteile der S-Phase bzw. der G2/M-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. Die Multilayer wiesen eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase in einem scharfen Peak mit dem Maximum bei 18 h auf. Für die Monolayer ließ sich ein solcher Arrest zeitlich gesehen vor den Multilayern nur erahnen. Bei Betrachtung der G2/M-Phasezellen zeigten die Monolayer nach einem scharfen Arrest-Peak, mit einem Maximum bei etwa 18 h, bereits die Rückkehr in den Zellzyklus, als die Multilayer erst allmählich in den Arrest eintraten. Die Multilayer zeichneten sich durch einen länger andauernden Arrest aus, dessen Maximum etwa 48 h nach Röntgenbestrahlung erreicht war.

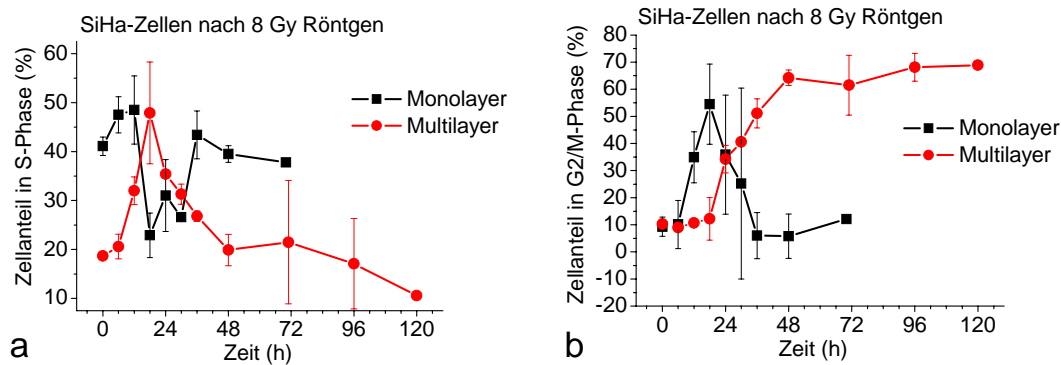


Abb. 66: Prozentualer Zellanteil (MW \pm SD) in der S-Phase (a) bzw. der G2/M-Phase (b) als Funktion der Zeit von Mono- und Multilayern der SiHa-Zellen nach 8 Gy Röntgenbestrahlung (drei unabhängige Experimente)

3.7.2.4 Zellzyklus-Analyse nach Schwerionenbestrahlung

Die Zellzyklus-Experimente erfolgten auch nach Schwerionenbestrahlung. In Abbildung 67 sind die Ergebnisse für die SiHa-Monolayer aufgeführt. Im Gegensatz zur unbestrahlten Kontrolle, bei der die Verteilungen unverändert blieben, zeigte sich in der bestrahlten Probe einen kleinen Peak in der S-Phase, der stärker ausgeprägt war als nach 8 Gy Röntgen, sowie einen nachfolgenden längeren Peak in der G2/M-Phase. Zwei von drei Experimenten lieferten ähnliche Resultate, das dritte Experiment jedoch wich von den beiden anderen ab. Aus anderen Untersuchungen während der gleichen Bestrahlungsperiode war allerdings bekannt, dass diese Zellen auch ein geringeres Überleben zeigten. Deshalb wurde dieses Experiment nicht für weitere Analysen herangezogen.

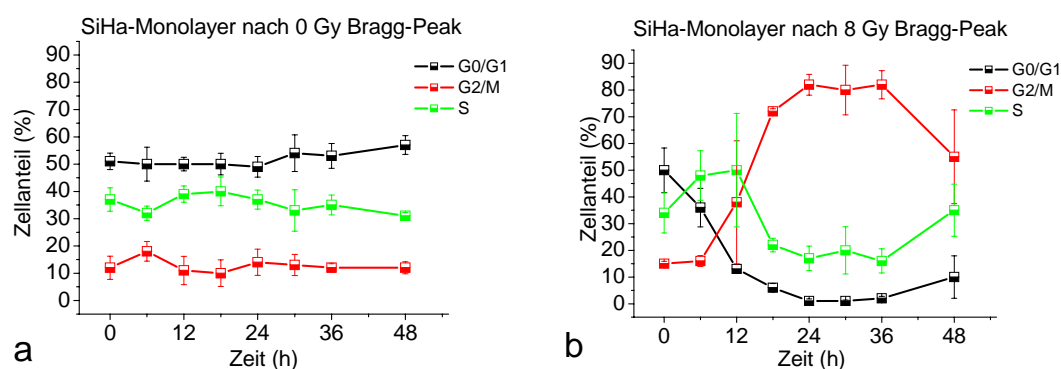


Abb. 67: Prozentualer Zellanteil (MW \pm SD) von SiHa-Monolayern als Funktion der Zeit nach Schwerionenbestrahlung im Bragg-Peak (n=2)

a: unbestrahlt, b: bestrahlt mit 8 Gy

Die Zellzyklusverteilungen der SiHa-Multilayer sind in Abbildung 68 dargestellt. Das unbestrahlte Kontrollkollektiv zeigte auch hier über die Zeit ein unverändertes Verhalten. Über die im Bragg-Peak bestrahlten Multilayer dagegen konnte keine so klare Aussage getroffen werden, da die Ergebnisse der drei unabhängigen Experimente doch sehr stark untereinander variierten. Bei einem Experiment verhielten sich die Zellen in einer Bestrahlungsperiode sowohl im Zellzyklusverhalten als auch im Überleben anders. Dies ging einher mit den eben beschriebenen Abweichungen des Zellzyklusverhaltens der Monolayer nach Bragg-Peak-Bestrahlung. In einer folgenden Bestrahlungsperiode wiesen die Multilayerzellen das gleiche abweichende Verhalten auf, jedoch gab es keine weiteren Kontrolleexperimente zur Untermauerung dieser Abweichung. Aus einem sicher gelungenen Experiment (siehe Abb. 65 b) kann man den Schluss ziehen, dass sich die Multilayer ähnlich wie nach Röntgenbestrahlung in einem länger anhaltenden G2/M-Arrest befanden.

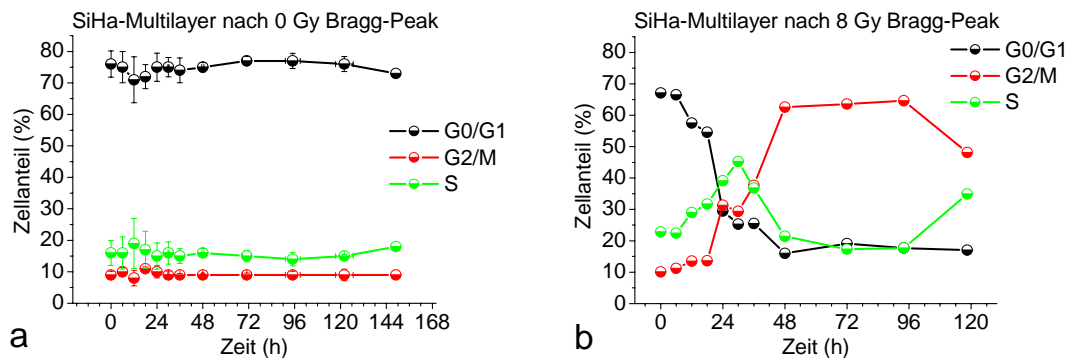


Abb. 68: Prozentualer Zellanteil als Funktion der Zeit von SiHa-Multilayer nach Bragg-Peak-Bestrahlung

a: unbestrahlt (MW \pm SD, n=3), b: mit 8 Gy bestrahlt (n=1)

Dem direkten Vergleich von Mono- und Multilayer nach der Schwerionenbestrahlung dient die Abbildung 69. Auch nach Bestrahlung im Bragg-Peak fanden der S-Phase-Block sowie der G2/M-Arrest der Multilayer zeitlich verzögert gegenüber den Monolayern statt.

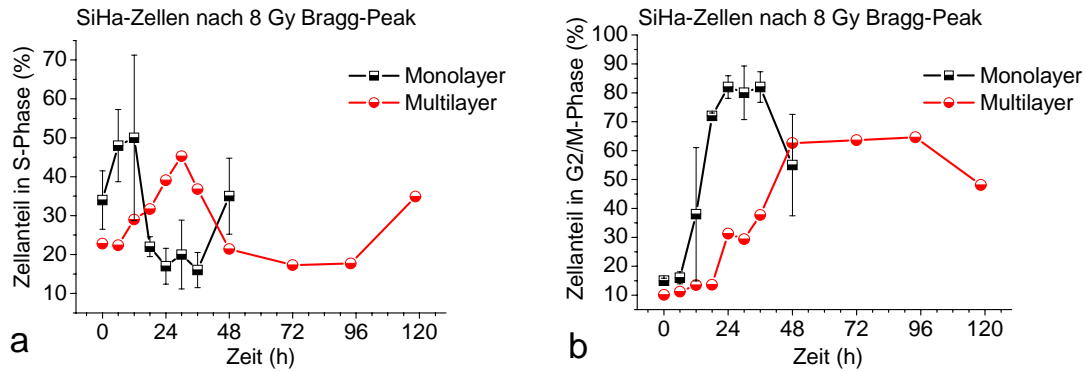
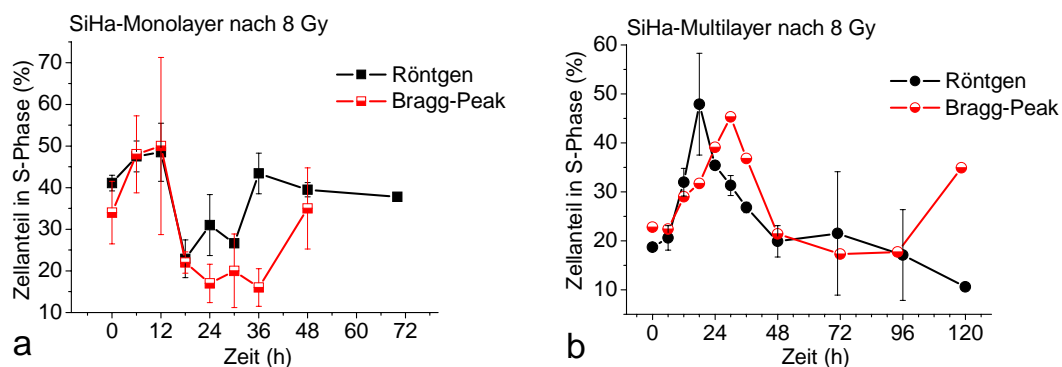


Abb. 69: Prozentualer Zellanteil in der S-Phase (a) bzw. G2/M-Phase (b) von SiHa-Mono- und Multilayern als Funktion der Zeit nach 8 Gy Bragg-Peak-Bestrahlung

Die gemeinsame Auftragung der Arretierung der Zellen in der S-Phase sowie der G2/M-Phase nach beiden Bestrahlungsmodalitäten ist in Abbildung 70 zu finden. Für die Monolayer zeigte sich bezüglich des S-Phase-Blocks kein Unterschied. Im Gegensatz dazu verschob sich das Peakmaximum der Multilayer nach Bragg-Peak-Bestrahlung um 6 h nach hinten. Bei Betrachtung der G2/M-Arreste ergab sich für die Monolayer eine längere Verweilzeit im Arrest nach Schwerionenbestrahlung. So traten die Zellen nach der Röntgenbestrahlung bereits nach spätestens 36 h wieder in den Zellzyklus ein, was nach Schwerionen bis 48 h nach Bestrahlung noch nicht vollständig erfolgt war. Weiterhin waren mehr Zellen in der G2/M-Phase nach Schwerionenbestrahlung blockiert. So nahm im Mittel der Anteil der beteiligten G2/M-Zellen von 55 % auf 82 % zu. Für die Multilayer sah die langfristige Arretierung der Zellen nach beiden Strahlenarten gleich aus. Lediglich zum Zeitpunkt von 120 h nach der Bragg-Peak-Bestrahlung war ein Abknicken der Kurve zu verzeichnen. Dies ist jedoch nur die Aussage eines Experimentes. Für beide Kultivierungsarten war jeweils kein Unterschied im Beginn der G2/M-Arreste in Abhängigkeit der Bestrahlungsmodalität zu bemerken.



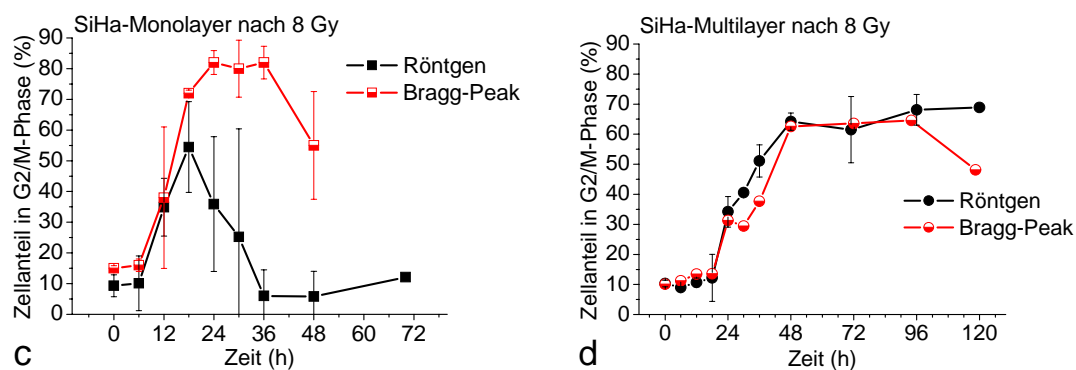


Abb. 70: Prozentualer Zellanteil (MW \pm SD) in der S-Phase (a und b) bzw. in der G2/M-Phase (c und d) nach Röntgen- und Bragg-Peak-Bestrahlung

3.7.3 Einfluss des Zellzyklus auf das Überleben

Aus der Literatur war bekannt, dass Zellen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen unterschiedlich gut auf die Bestrahlung bzw. Behandlung mit Chemotherapeutika reagieren. Dazu kamen bei vielen Experimenten synchronisierte Zellen zum Einsatz (Hall 1978). Da sich die Mono- und Multilayer in ihrer Zellzyklusverteilung unterschieden, stellte sich die Frage, ob dieser Unterschied die Sensitivität der Multilayer nach Bestrahlung bzw. die Resistenz nach der Etoposid-Behandlung erklären kann.

Eine den Multilayern ähnliche Zellzyklusverteilung gelang bei Monolayern durch sehr dichte Zelleinsaat. So kamen statt routinemäßig 4×10^3 Zellen/cm² (dünne Einsaat) nun 4×10^4 Zellen/cm² (dichte Einsaat) zur Plattierung. Das führte nach 5 Tagen Wachstum zu einem sehr dichten Zellrasen, der in der Zellzyklusverteilung zwischen den Mono- und Multilayern lag. Die Angaben der Tabelle 27 bezüglich der dünn bzw. dicht eingesäten Zellen stammen aus 4 unabhängigen Experimenten, wohingegen die Daten der Mono- und Multilayer den Verteilungen während der Wachstumskurven entnommen sind.

Tab. 27: Zellzyklusverteilungen der SiHa-Zellen nach jeweils 5 Tagen Wachstum

	n	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)
Monolayer	14	50,4 \pm 3,9	11,0 \pm 4,0	38,6 \pm 4,1
Multilayer	14	74,4 \pm 4,3	9,5 \pm 1,3	16,1 \pm 3,6
Monolayer: dünne Einsaat	4	55,7 \pm 6,4	10,2 \pm 7,0	34,2 \pm 1,4
Monolayer: dichte Einsaat	4	67,4 \pm 1,0	8,8 \pm 0,5	23,8 \pm 1,1

3.7.3.1 Überleben nach Bestrahlung

Es wurde ein Schwerionenexperiment mit SiHa-Monolayern durchgeführt, bei dem die Bestrahlung der Zellen neben der konventionellen dünnen Einsaat auch nach dichter Einsaat erfolgte. Das Überleben ist in Abbildung 71 dargestellt. Es entsprach nach dünner Einsaat dem der Monolayer-Mittelwerte. Die dicht eingesäten Zellen hingegen zeigten ein radiosensitiveres Verhalten. Die Überlebenskurve dieser dichten Einsaat lag nach Plateau-Bestrahlung zwischen der Mono- und Multilayerkurve, mit Tendenz stärker zu den Multilayern. Nach der Bestrahlung im Bragg-Peak lagen die dicht eingesäten Zellen im Bereich der Multilayer-Mittelwerte.

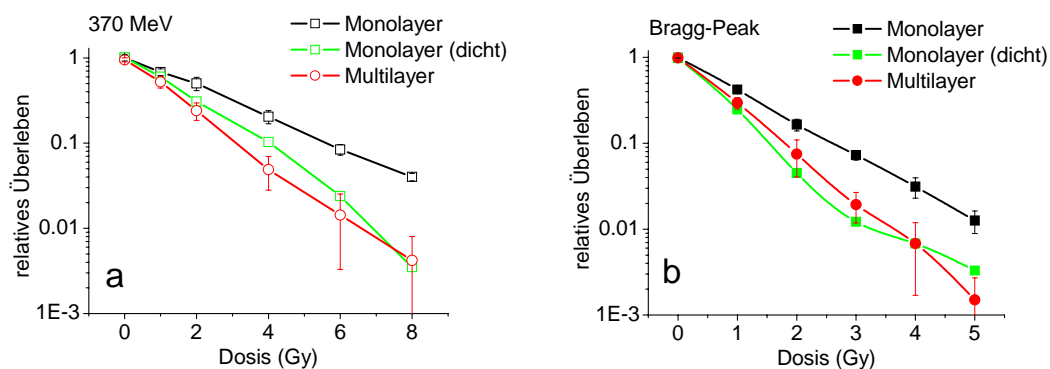


Abb. 71: Relatives Überleben als Funktion der Schwerionendosis von SiHa-Monolayern mit dichter Einsaat, zur Orientierung wurden die Mittelwerte der Mono- und Multilayer mit aufgetragen. a: Bestrahlung im Plateau, b: Bestrahlung im Bragg-Peak

3.7.3.2 Überleben nach Etoposid-Behandlung

Wie bei der Schwerionenbestrahlung erfolgte die Aussaat der SiHa-Monolayern 5 Tage vor der Behandlung dünn bzw. dicht. Die Überlebenskurven von zwei unabhängigen Experimenten nach der Etoposid-Behandlung sind der Abbildung 72 a zu entnehmen. Die dicht ausgesäten Monolayern überlebten die Behandlung besser als die dünn ausgesäten Zellen. Vergleicht man die beiden Überlebenskurven mit denen der Mittelwerte von Mono- und Multilayern (Abb. 72 b), dann wurde ersichtlich, dass sich die resistenteren dichteren Zellen den Multilayern annäherten. Die dünn ausgesäten Zellen lagen etwa im Bereich des Überlebens der Monolayern.

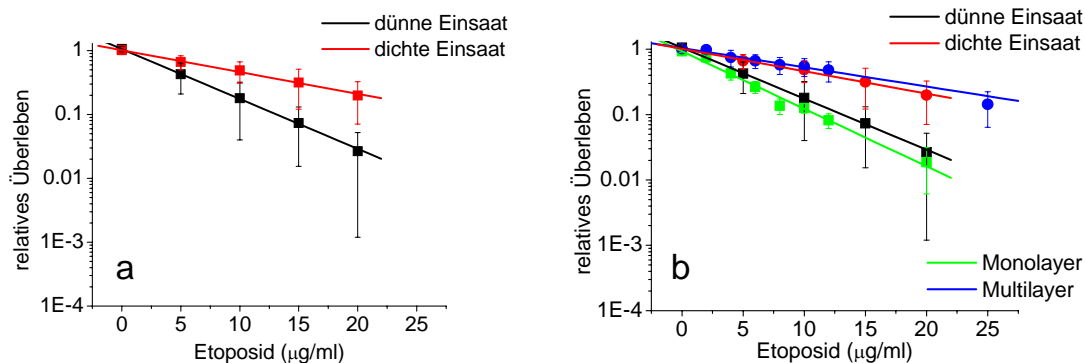


Abb. 72: Relatives Überleben der SiHa-Monolayer als Funktion der Etoposid-Konzentration mit unterschiedlicher Einsaatdichte (MW \pm SD, n=2)

a: alleinige Auftragung der unterschiedlichen Einsaat

b: zusätzlich zur Abb. a Auftragung der Mittelwerte der Mono- und Multilayer

3.8 Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung

Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe des TUNEL-Assays nachgewiesen. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 0 bzw. 8 Gy Röntgenstrahlen bzw. Schwerionen im Bragg-Peak. Für die Überprüfung der Funktionalität des Assays sorgte das Mitführen von Negativ- und Positivkontrollen. Bei der Negativkontrolle kam kein Enzym zum Einsatz, während bei der Positivkontrolle vor der Enzymreaktion zusätzlich eine DNase-Behandlung stattfand. Die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase polymerisierte FITC-markierte Nucleotide an die entstandenen DNA-Einzelstrangbrüche. In der Abbildung 73 sind exemplarisch die Ergebnisse der Messungen am Durchflußzytometer von Positiv- und Negativkontrolle überlagert in einem Histogramm (Anzahl als Funktion der Fluoreszenz 1) zu sehen. Die mit DNase I-behandelte Probe wies eine viel stärkere Fluoreszenz auf, erkennbar an der Verschiebung nach rechts zu höheren Fluoreszenzen.

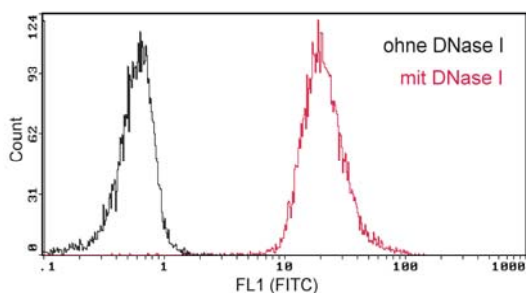


Abb. 73: Histogramm der Kontrolldaten für den TUNEL-Assay am Durchflußzytometer

schwarz: Negativkontrolle,

rot: Positivkontrolle

Die Ergebnisse der für die Durchflußzytometrie aufgearbeiteten SiHa-Monolayer-Zellen nach Röntgenbestrahlung sind in Abbildung 74 aufgeführt. Die unbestrahlte Kontrolle (Abb. 74 a) zeigte keine Veränderung in der Fluoreszenz. Bei den bestrahlten Zellen (Abb. 74 b) dagegen trat ab 48 h nach Bestrahlung ein zweiter, zu höheren Fluoreszenzen verschobener Peak auf. Das Auftreten dieser beiden Peaks verdeutlichte, dass ein Teil der Zellen einen ausgeprägten Einbau der FITC-markierten Nukleotiden aufwies. Es konnte also der qualitative Nachweis erbracht werden, dass die SiHa-Monolayer in der Zeit von 48 bis 72 h nach Röntgenbestrahlung teilweise in die Apoptose gehen.

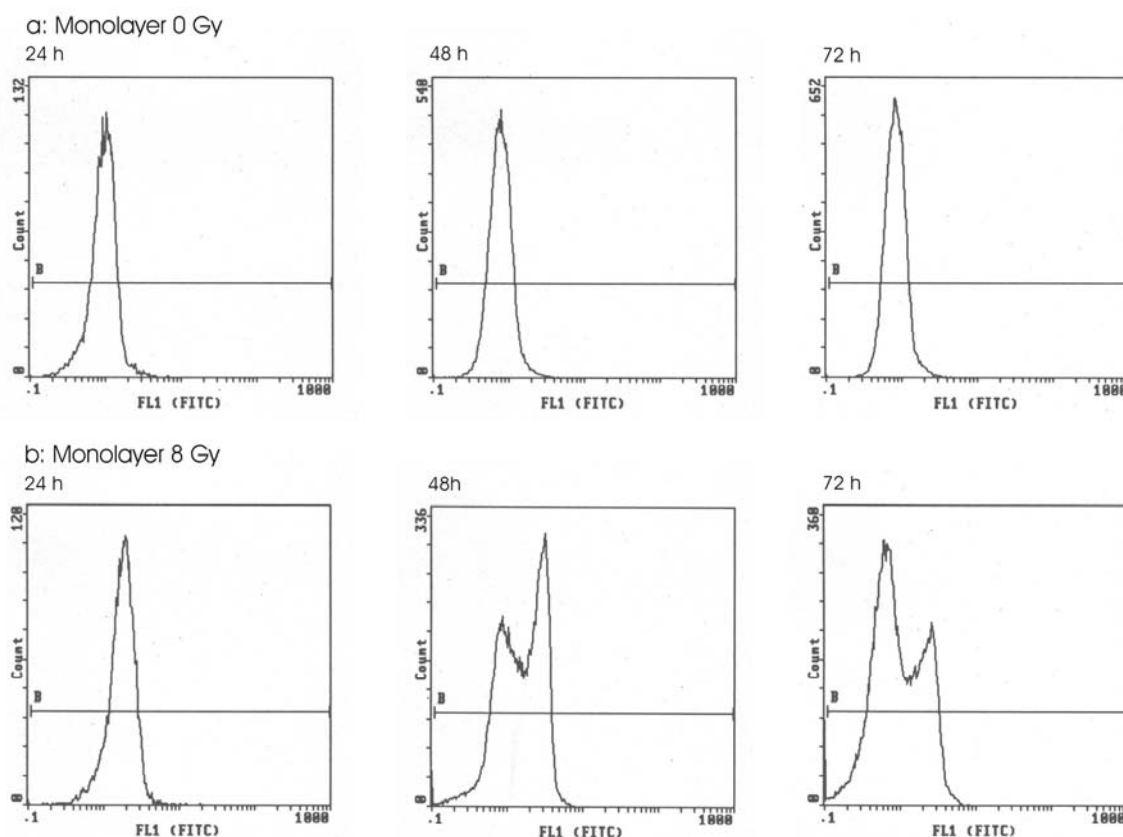


Abb. 74: Auftragung der Anzahl der Zellen als Funktion der Fluoreszenzintensität (FITC) von SiHa-Monolayern nach dem TUNEL-Assay
a: unbestrahlte Kontrolle, b: 8 Gy Röntgenbestrahlung

Die bestrahlten SiHa-Multilayer zeigten bis 72 h nach Röntgenbestrahlung das gleiche Bild wie die unbestrahlte Kontrolle. Die Multilayer-Histogramme entsprachen denen der Monolayer-Kontrolle und sind hier nicht extra aufgeführt.

Der Nachweis der Apoptose über die TUNEL-Färbung erfolgte auch nach 8 Gy Schwerionenbestrahlung im Bragg-Peak. Sowohl die Monolayer als auch die Multilayer zeigten bis 72 h nach Bestrahlung keine Fluoreszenzverschiebung an. Die Histogramme der bestrahlten Proben

entsprachen denen der unbestrahlten Zellen. Das bedeutet, dass nach Schwerionenbestrahlung keine Apoptoseinduktion beobachtbar war.

3.9 Aktivität des P-Glycoproteins (P-Gp)

Die Multilayer zeigten nach Behandlung mit Etoposid ein deutlich besseres Überleben als die Monolayer. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Herausbildung einer Multi Drug Resistance der Multilayer sein, da Etoposid ein Substrat des P-Glycoproteins ist (Hande 1998). Weiterhin wurden in der Literatur [Übersicht siehe (Durand und Olive 2001)], P-Gp-vermittelte Resistenzen von Sphäroiden beobachtet. Zur Überprüfung dieser Vermutung diente der durchflußzytometrische Aktivitätstest des P-Gps. Es kamen jeweils Mono- und Multilayer von SiHa- und WiDr-Zellen sowie LS513-Zellen zum Einsatz. Letztere sind für ihr aktives P-Glycoprotein bekannt. Wie schon im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, ist das Chemotherapeutikum Daunorubicin membrangängig, so dass es zur Ansammlung des Stoffes in der Zelle kommt. Bei aktivem P-Glycoprotein wird das Daunorubicin wieder aus der Zelle herausgepumpt. Die zusätzliche Verabreichung des Kalziumkanalblocker Verapamil sorgt für den Transportstopp des Daunorubicins aus der Zelle und somit einen Anstieg der Fluoreszenz in der Zelle. Enthalten die Zellen jedoch kein aktives P-Glycoprotein, dann unterscheidet sich die Fluoreszenz nach kombinierter Gabe von Daunorubicin und Verapamil nicht von der Fluoreszenz nach alleiniger Verabreichung von Daunorubicin.

In Abbildung 75 sind einige Ergebnisse dargestellt. Mit steigender Fluoreszenz verschiebt sich der Peak nach rechts. Die LS513-Zellen (Abb. 75 a) wiesen eine vorhandene Aktivität des P-Glycoproteins vor, da bei Zugabe des Verapamils eine weitere Zunahme der Fluoreszenz erfolgte. Weiterhin sind exemplarisch die behandelten SiHa-Monolayer (Abb. 75 b) zu sehen. Es gab keinen Unterschied in der Fluoreszenz zwischen der Einzel- oder Kombinationsbehandlung der Zellen. Dies traf auf alle untersuchten Zellen mit Ausnahme der Positivkontrolle LS513 zu. Die Verhältniswerte, ermittelt aus den Fluoreszenzwerten der Kombinations- zur Einzelbehandlung, sind in Tabelle 28 aufgeführt. Da für die Mono- und Multilayer der SiHa- und WiDr-Zellen der Verhältniswert nahe 1 lag, schien das Verapamil keinen Einfluss auf die intrazelluläre Daunorubicin-Konzentration zu haben. Das bedeutete, dass diese Zellen kein funktionelles P-Glycoprotein in relevanter Menge exprimierten. Für die SiHa-Zellen erfolgte die Durchführung des Tests dreimal und für die WiDr-Zellen zweimal. Die Bestimmung der Positivkontrolle fand nur einmal statt, jedoch entsprach der hier ermittelte Wert der LS513-Zellen den Erfahrungswerten von PD Dr. Thews aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Mainz (mündliche Kommunikation). Damit ist die erhöhte Resistenz der Multilayer gegenüber Etoposid nicht auf die Multi Drug Resistance zurückzuführen.

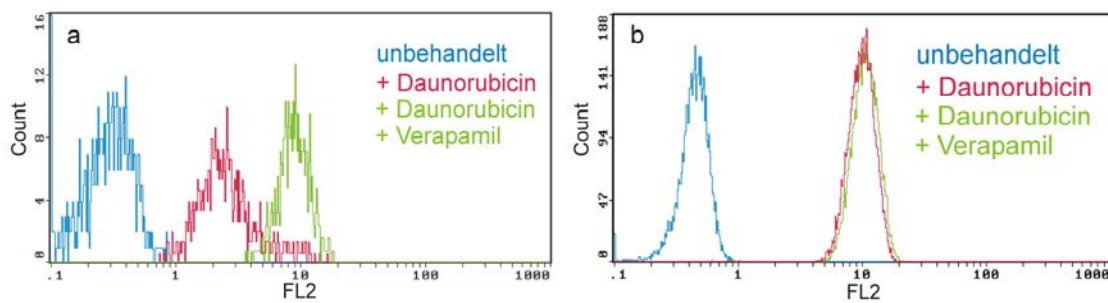


Abb. 75: Auftragung der Anzahl der Zellen als Funktion der Fluoreszenzintensität (FL2) nach Messung der P-Glycoprotein-Aktivitätstest am Durchflußzytometer

a: Positivkontrolle: LS513-Zellen, b: SiHa-Monolayer

Tab. 28: Ergebnisse der P-Glycoprotein-Aktivitätstests am Durchflußzytometer

Zellen	n	Verhältnis: $\frac{(\text{Daunorubicin} + \text{Verapamil})}{(\text{Daunorubicin})}$
LS513-Zellen	1	3,169
SiHa-Monolayer	3	0,935 ± 0,052
SiHa-Multilayer	3	0,793 ± 0,105
WiDr-Monolayer	2	0,930 ± 0,045
WiDr-Multilayer	2	0,826 ± 0,024

3.10 Molekularbiologische Untersuchungen zu Rad51

In der Literatur wurde die Vermutung geäußert, dass die Kontaktresistenz der Sphäroide auf ein erhöhtes Reparaturverhalten zurückzuführen ist. Weiterhin beschrieben Maacke et al. eine Überexpression des Rad51-Proteins bei strahlen- und chemoresistenten Sphäroiden, deren Monolayerkulturen diese Eigenschaften nicht zeigten (Maacke et al. 2000). Das Rad51-Enzym ist an der homologen Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. Bei einer beobachteten Überexpression und Vorhandensein der Kontaktresistenz könnte eine mögliche Herunterregulation des Enzyms die hier beobachtete Sensitivierung erklären. Es interessierte nun, ob und in welcher Höhe das Rad51-Protein in den Mono- und Multilayern exprimiert wird.

3.10.1 Nachweis der rad51-mRNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe des Rneasy-Kits der Firma Qiagen kamen konfluente Monolayer und 5 Tage alte Multilayer zum Einsatz. Nach der quantitativen Bestimmung der RNA-Konzentration im Photometer fand eine Erststrangsynthese statt. Neben dem normalen

Ansatz mit der reversen Transkriptase (+RT) erfolgte für jede Probe in einem parallelen Ansatz die Ersetzung des Enzyms (-RT) durch Wasser. Kam es sowohl im +RT- als auch im -RT-Ansatz nach der Zweitstrangsynthese zur Bildung von PCR-Produkten, dann war in der isolierten RNA-Probe auch genomische DNA enthalten. In allen hier durchgeführten Kontrollen war das jedoch nicht der Fall.

Für die Überprüfung der Spezifität der Rad51-Primer sorgte die Sequenzierung des Produktes nach einer Endpunkt-PCR (Cycler-Programm siehe Anhang). Dazu erfolgte die Auftrennung des PCR-Produktes in einem 1,5%igen Agarosegel, das Ausschneiden der Bande des Amplifikats sowie eine anschließende Aufreinigung mit Hilfe eines Geextraktionskit. Die Sequenzierung führte die Firma GENterprise (Mainz) durch. Der Vergleich der analysierten Sequenz mit der Nucleotid-Datenbank vom National Center for Biotechnology Information (NCBI 2004) zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit dem humanen Rad51-Gen.

Die semiquantitative PCR diente dem Nachweis von β -Aktin und rad51 in einer Multiplex-PCR. Die Verweildauer von sieben identischen Ansätzen im Cycler betrug zwischen 19 und 37 Zyklen. Dies ermöglichte einen Überblick über die Bildung der Amplifikate nach Auftragung auf ein 1,5 %iges Agarosegel. Das Ergebnis der Untersuchung von Mono- und Multilayern der WiDr-Zellen ist in Abbildung 76 aufgezeigt. Je früher ein PCR-Produkt aus dem Hintergrund trat, desto mehr spezifische cDNA bzw. ursprüngliche RNA war im Ansatz vorhanden. Die obere Bande, spezifisch für β -Aktin mit einer Größe von 626 bp, war bereits nach 22 Zyklen sichtbar. Das rad51-Produkt (421 bp) benötigte dafür etwa 6 Zyklen länger. Minimale Unterschiede existierten zwischen Mono- und Multilayern. Bei Betrachtung der Aktin-Banden nach 22 Zyklen sowie der rad51-Banden nach 28 Zyklen erschienen die Banden der Multilayer etwas stärker im Vergleich zu den Monolayern, doch das Verhältnis zwischen β -Aktin und rad51 zeigte keine Änderung. Diese Differenzen lagen im Schwankungsbereich der verschiedenen PCR-Experimente. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine unterschiedliche Expression des rad51-Gen beobachtet wurde.

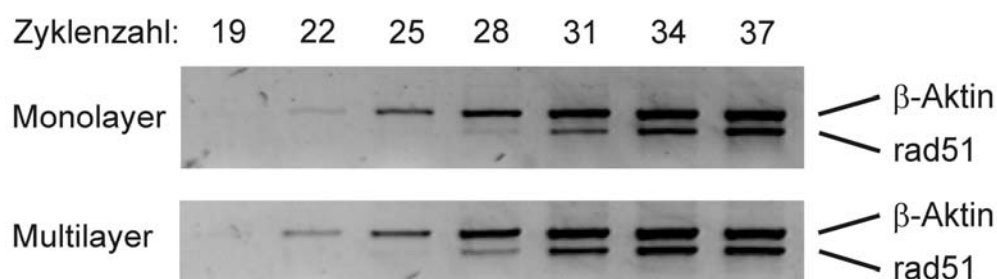


Abb. 76: Gelbild einer quantitativen RT-PCR mit dem Nachweis von β -Aktin und rad51

3.10.2 Nachweis des Rad51-Proteins

Für Western Blot-Analysen kamen Mono- und Multilayer der Zelllinien WiDr und SiHa zur Verwendung. Nach der Proteinisolierung von konfluenten Monolayern und 5 Tage alten Multilayern erfolgte die Auftrennung von 50 µg Protein in einem 10%igen SDS-Gel. Nach einem Semidry-Blot schloss sich das Zerschneiden der Membran an, welche zwei identisch beladene Hälften vorwies. Die eine Hälfte der Membran diente dem Nachweis des humanen Rad51-Proteins (Kaninchen-Antikörper). Der andere Teil der Membran wurde mit dem Maus-Antikörper gegen das humane Tubulin inkubiert. Die Ergebnisse nach der Filmexposition sind in Abbildung 77 dargestellt. Die WiDr-Zellen zeigten im Gegensatz zu den SiHa-Zellen bei der Inkubation mit dem Antikörper gegen das Rad51-Protein eine starke Bande im Bereich von 43 kDa. Jedoch unterschieden sich die Monolayer hinsichtlich der Expressionsstärke nicht von den Multilayern. Bei der Behandlung mit dem Anti-Tubulin-Antikörper war bei allen vier Proben eine gleich starke Bande bei etwa 50 kDa und speziell bei den WiDr-Zellen unterhalb von 45 kDa eine dünnere Bande zu sehen. Es könnte sich um eine degradierte Form des Tubulins handeln. Die vergleichbare Stärke der Tubulinbande bewies eine gleichmäßige Proteinbeladung des SDS-Gels.

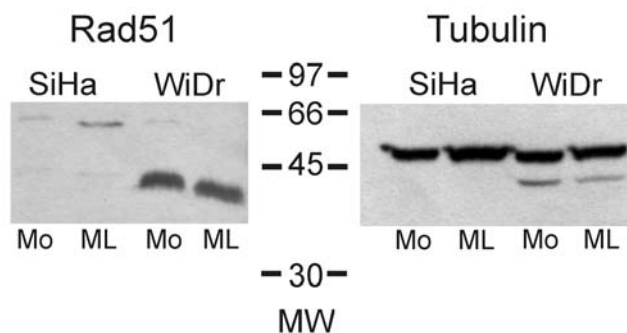


Abb. 77: Western Blot von Mono- und Multilayern von SiHa- und WiDr-Zellen mit dem Nachweis von Rad51 (links) bzw. Tubulin (rechts) (MW: Molekulargewicht in kDa)

3.11 Migration

Das Ziel der Strahlentherapie ist die Abtötung klonogener Tumorzellen bzw. deren Proliferationsinhibierung. In wieweit eine Bestrahlung das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen verändert, ist bisher wenig untersucht. Einen ersten Hinweis auf eventuell migrierende Zellen nach Bestrahlung lieferten die locker gepackten und weitauslaufenden Kolonien der bestrahlten SiHa-Zellen. Da die Multilayer solide Tumoren besser simulieren als Monolayerkulturen, sollte das Migrationsverhalten beider Kultivierungsarten unter Verwendung von Boydenkammern verglichen werden. Aufgrund des Aufbaus der Boydenkammer aus 48 einzelnen Migrationseinheiten konnten in einer Kammer gleichzeitig unterschiedliche Proben getestet und direkt miteinander verglichen werden. Zur statistischen Absicherung erfolgte immer parallel ein iden-

tisches Bestücken von zwei Boydenkammern. Für beide Zelllinien fiel die Wahl auf Wanderungszeiten von 16-17 h. Nach dem Entfernen der Zellen auf der Startseite machte ein Anfärben die gewanderten Zellen auf dem Filter sichtbar. Es schloss sich ein Beurteilen der Filter im Mikroskop, jedoch kein komplettes Auszählen, an. Die Experimente dienten zur ersten Orientierung und zum Vergleich der Wanderungseigenschaften der Mono- und Multilayer.

Die WiDr-Zellen zeigten keine Wanderung durch die Filter der Boydenkammern. Um fehlerhafte Experimente auszuschließen, erfolgte die Einsaat von SiHa- und WiDr-Zellen gemeinsam in eine Boydenkammer. Nach der Anfärbung des Filters fanden sich nur Zellen auf der Filterseite mit den pipettierten SiHa-Zellen. Unter identischen Migrationsbedingungen der SiHa- und WiDr-Zellen wanderten die WiDr-Zellen nicht, so dass alle weiteren Experimente mit den SiHa-Zellen durchgeführt wurden.

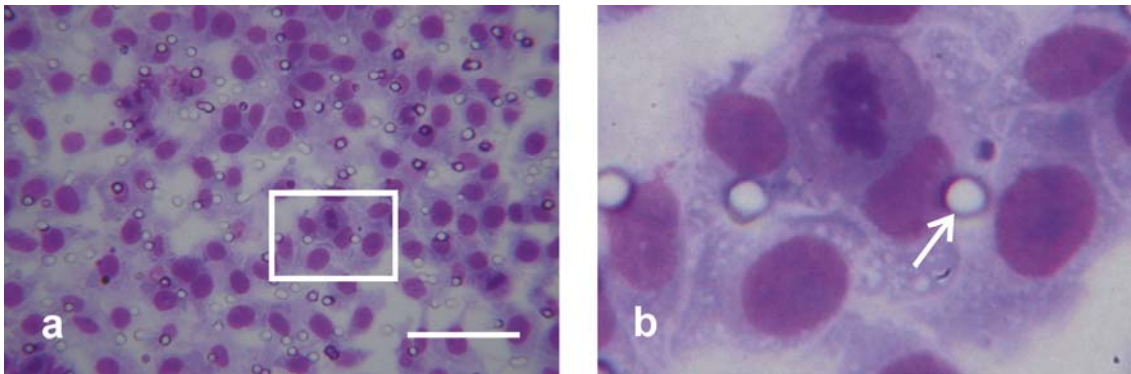


Abb. 78: Ausschnitte aus einer Migrationseinheit (wells) einer Boydenkammer

a: 40fache Vergrößerung, Maßstab entspricht 100 μm

b: Ausschnittsvergrößerung des markierten Bereichs, Pfeil zeigt auf eine 8 μm Pore

In der Abbildung 78 ist ein angefärbter Boydenfilter mit migrierten SiHa-Zellen dargestellt. Die Zellkerne nahmen eine tiefrote und das Zytoplasma eine schwache hellrote/violette Färbung an. Zum Zeitpunkt der Fixierung und Färbung der gewanderten Zellen etwa 16-18 h nach Bestückung der Boydenkammern befanden sich einige Zellen in der Mitose.

Zur Untersuchung der Zellwanderung von Mono- und Multilayern wurden beide Kultivierungsarten nach 5 Tagen Wachstum resuspendiert und gemeinsam in eine Boydenkammer gegeben. Die Multilayer wanderten beträchtlich weniger als die Monolayer und es waren häufig deformierte Kerne zu sehen.

Wie bereits aus anderen Untersuchungen bekannt war, wiesen Mono- und Multilayer eine unterschiedliche Zellzyklusverteilung auf. Zur Annäherung der Monolayerverteilung an den Zellzyklus der Multilayer wurden hier ebenfalls verschieden dicht eingesäte Zellen verwendet. So

kamen dünn und 10-fach dichter ausgesäte Zellen nach 5 Tagen Wachstum gemeinsam mit identischer Konzentration zur Bestückung in Boydenkammern. Wie in Abbildung 79 zu sehen wanderten die zum Wachstum dünner eingesäten Zellen (Abb. 79 a) stärker als die dicker eingesäten Zellen (Abb. 79 b). Auch zeigten die gewanderten Zellen der dünner gewachsenen Monolayer deutlich mehr Zellen in der Zellteilung.

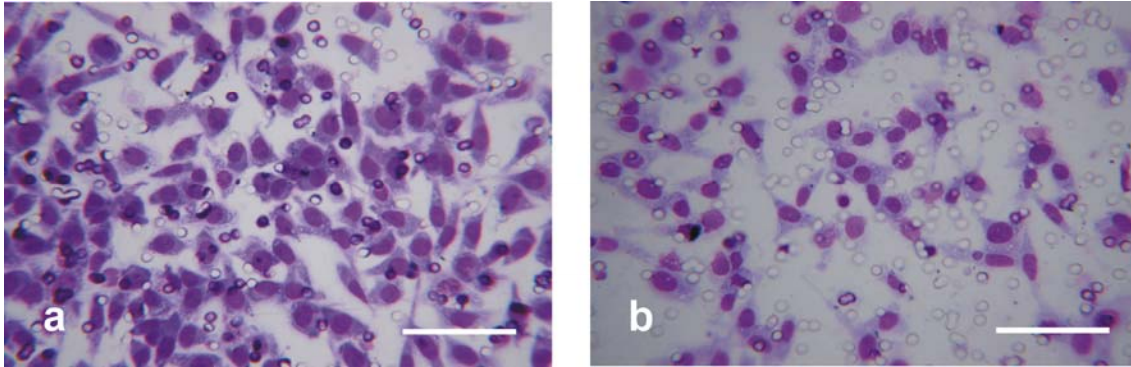


Abb.79: 40-fach vergrößerte Ausschnitte aus Migrationseinheiten (wells) einer 48-well-Boydenkammer mit unterschiedlich dicht kultivierten SiHa-Monolayern

links: dünne Einsaat zum Wachstum, rechts: dicke Einsaat zum Wachstum

Boydenkammer mit identischen Zellzahlen bestückt, Maßstab entspricht 100 μm

Es wurde weiterhin die Wanderung bestrahlter Monolayer untersucht. Dazu erfolgte das Pipetieren der Boydenkammern 3 h nach Röntgenbestrahlung mit 0, 3, 6 und 9 Gy. Man konnte zwischen den vier Proben keinen Unterschied feststellen, weder in der Anzahl (Abschätzung) noch im Aussehen der gewanderten Zellen. Es schloss sich eine Wiederholung dieses Experimentes in leicht abgewandelter Form an. Dabei kamen nur zwei Dosen, 0 und 6 Gy, dafür jedoch zwei Inkubationszeiten, nämlich 5 h und 24 h zum Einsatz. Das Ergebnis nach der kurzen Inkubationszeit von 5 h nach der Röntgenbestrahlung bestätigte den vorherigen Eindruck nach 3 h. Doch nach 24 h wiesen die bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle deformierte Kerne auf. Weiterhin waren Zellabschnürungen ähnlich der apoptotischen Körperchen zu beobachten (siehe Abb. 80).

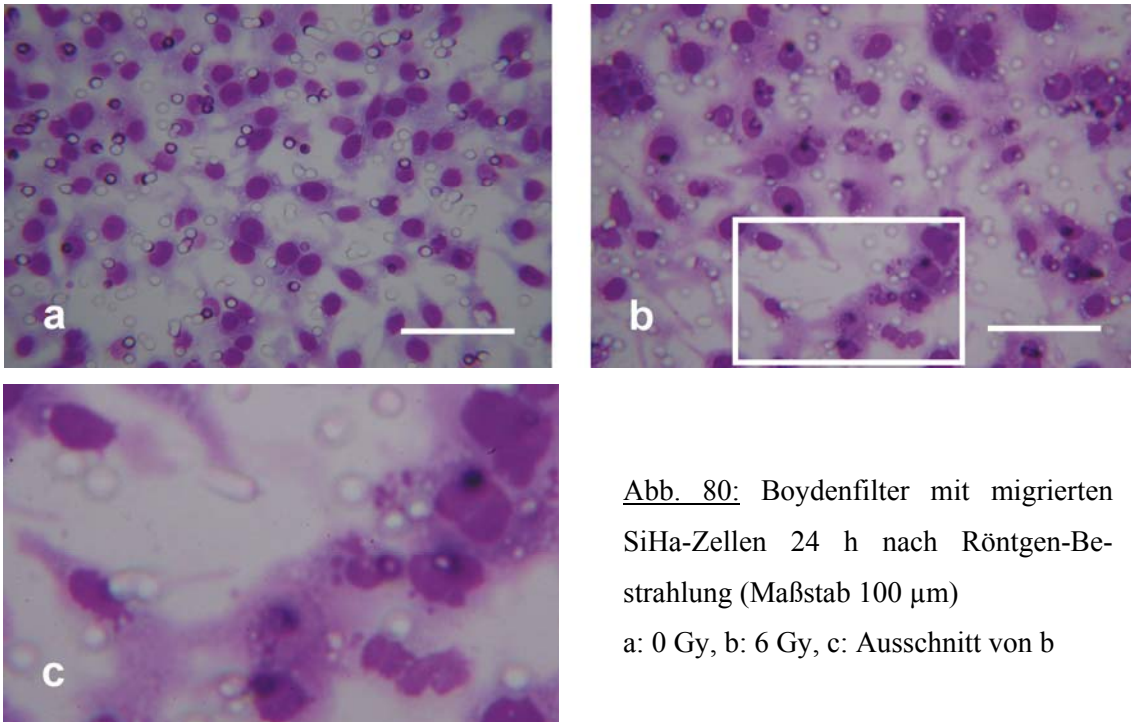


Abb. 80: Boydenfilter mit migrierten SiHa-Zellen 24 h nach Röntgen-Be-
strahlung (Maßstab 100 μm)

a: 0 Gy, b: 6 Gy, c: Ausschnitt von b

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Zellmigration von den verwendeten Zelllinien. Der Unterschied in den Kultivierungsbedingungen beruht wahrscheinlich auf den verschiedenen Verteilungen der Zellen im Zellzyklus.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Zellsysteme

In dieser Arbeit kamen humane Zellen des Zervixkarzinoms (SiHa) und Kolonkarzinoms (WiDr) zum Einsatz. Neben der konventionellen Kultivierung der Tumorzellen als einschichtige Monolayer erfolgte auch die Kultivierung der Zellen als Multilayer sowie zu Vergleichszwecken als Sphäroide. Beide multizellulären Systeme zeigen einen ähnlichen Aufbau. Mit zunehmender Entfernung vom Medium nimmt die Proliferation ab und die Zellen gehen in die Ruhephase über. Bei Erreichen einer kritischen Distanz entstehen, wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel verschiedener Parameter, nekrotische Bereiche. Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Systemen liegt in der Anzahl der entsprechenden Zellen in der jeweiligen Schicht. Bei den planaren Multilayern findet man näherungsweise in allen nicht nekrotischen Schichten die gleiche Zellzahl. Im Gegensatz dazu nimmt bei den Sphäroiden aufgrund des kugelförmigen Wachstums die Anzahl der Zellen pro Schicht von außen nach innen ab. Auch ist die radial gerichtete Diffusion in Sphäroiden prinzipiell verschieden von der Diffusionsgeometrie planarer Zellsysteme.

4.1.1 Wachstumskurven

Zur Einschätzung des Wachstumsverhaltens diente das Anfertigen von Wachstumskurven beider Zelllinien sowohl als Mono- als auch als Multilayer. Die Wachstumskinetik der Monolayer beider Zelllinien zeigte einen typischen sigmoiden Verlauf. Die Verdopplungszeit der SiHa-Monolayer war mit 17,3 h kürzer als die der WiDr-Monolayer mit 22,8 h. Für die SiHa-Zellen wurden keine Vergleichsdaten gefunden, aber Vergleiche mit Literaturdaten bezüglich der WiDr-Monolayer erbrachten ähnliche Werte (siehe Tab. 29).

Die SiHa-Zellen zeigten als Monolayer nach Erreichen der Konfluenz ein verstärktes Absterben der Zellen. Dieses Verhalten passte zu den Beobachtungen am Mikroskop während der Zellkultur. Die WiDr-Zellen hingegen wuchsen dicht in Kolonien, in denen die Zellen einander auch überwachsen konnten. Es überraschte also nicht der allmähliche Übergang der WiDr-Monolayer in die Plateauphase.

Tab. 29: Vergleich der Zellzahl-Verdopplungszeiten mit der Literatur

Zellen	Verdopplungszeit (h)	Quelle
WiDr-Monolayer	22,8	vorliegende Arbeit
WiDr-Monolayer	24	(Hofman-Hüther 2002)
WiDr-Monolayer	19,2 (0,8 d)	(West und Sutherland 1987)
SiHa-Monolayer	17,3	vorliegende Arbeit

Die Multilayer wuchsen im Vergleich zu den Monolayern viel langsamer, was auch die Zellzahl-Verdopplungszeiten signifikant ausdrücken: SiHa-Zellen mit 61,2 h und WiDr-Zellen mit 57,4 h. Die Multilayer wuchsen somit 3,5mal bzw. 2,5mal langsamer als die Monolayer. West und Sutherland ermittelten für die WiDr-Sphäroide eine Volumenverdopplungszeit von 1,2 d (28,8 h), die im Vergleich zu den Monolayern somit 1,5mal länger war (West und Sutherland 1987). Ebenso wiesen V79-Sphäroide mit 22,7 h eine etwa zweifach längere Volumenverdopplungszeit im Vergleich zu den V79-Monolayern (11 h) auf (Zukowski 1999). Auch die Pankreaskarzinomlinie SUI-4 wuchs in vivo in Mäusen (88,8 h) 2mal langsamer im Vergleich zu den Monolayern mit 43,9 h (Kawano et al. 2004). Allgemein scheint sich die Verdopplungszeit von multizellulären Systemen im Vergleich zu den konventionalen Monolayern zu verlängern (siehe Tab. 30).

Tab. 30: Vergleich der Zellzahl- bzw. Volumen-Verdopplungszeiten mit der Literatur

Zelllinie	t ₂ Monolayer	t ₂ Sphäroid/Tumor	Faktor	Quelle
WiDr	22,8 h	57,4 h (2,4 d)	2,5	vorliegende Arbeit
WiDr	19,2 h (0,8 d)	28,8 h (1,2 d)	1,5	(West und Sutherland 1987)
SiHa	17,3 h	61,2 h	3,5	vorliegende Arbeit
V79	11,44 ± 0,28 h	22,7 h (0,945±0,087 d)	2	(Zukowski 1999)
SUIT-4	43,9 h	88,8 h	2	(Kawano et al. 2004)

Mit steigender Zellzahl fand bei allen Untersuchungen dieser Arbeit eine Abnahme des mittleren Durchmessers und des mittleren Volumens der Zellen statt. Bei beiden Zelllinien erstreckte sich die Größenänderung der Monolayerzellen (Abnahme des mittleren Durchmessers von etwa 19-20 µm auf 14,5-15µm) über einen größeren Bereich im Vergleich zu den Zellen der Multilayer (von etwa 17,5 auf 16 µm). Die Fehlerbalken erstreckten sich jedoch bei den Multilayern, besonders für die SiHa-Multilayer, über große Bereiche. Man kann also davon ausgehen, dass sich die Zellgrößen der Mono- und Multilayer am Ende der Beobachtung nicht sehr voneinander unterscheiden.

West et al. beschrieben bei WiDr-Monolayern ebenfalls nach einer anfänglichen Zunahme des Volumens ab Tag 2 des Wachstums eine Abnahme des Zellvolumens von $2576 \pm 23 \mu\text{m}^3$ auf $1772 \pm 104 \mu\text{m}^3$ am Tag 10 (West et al. 1988). Das Volumen der WiDr-Zellen dieser Arbeit nahm von $4291 \mu\text{m}^3$ auf $1835 \mu\text{m}^3$ ab. Die große Diskrepanz der beiden Ausgangswerte ist wahrscheinlich auf die ausgesäte Zellzahl zu Beginn des Experimentes zurückzuführen. West et al. plattierten eine etwa dreifach höhere Zellzahl aus.

Zukowski ermittelte mit V79-Zellen für die Monolayer der exponentiellen Phase einen größeren mittleren Durchmesser ($13,2 \mu\text{m}$) als für Monolayer der Plateau-Phase ($10,8 \mu\text{m}$). Die Sphäroidzellen hingegen entsprachen der Größe der Plateauphasezellen (Zukowski 1999). Andere Untersuchungen zeigten mit zunehmender Sphäroidtiefe und damit Verringerung der proliferierenden Zellen eine Abnahme des Zellvolumens (Freyer 1998).

Die Größenabnahme könnte für die Monolayer einerseits durch den zunehmenden Platzmangel zu erklären sein, da es bei den SiHa-Monolayern beim Erreichen des Plateaus (Tag 10) zum vermehrten Absterben der Zellen und parallel zum Anstieg des mittleren Durchmessers kam. Andererseits besitzen die Zellen in Abhängigkeit des Zellzyklus unterschiedliche Größen. So sind Zellen in der G0/G1-Phase kleiner als die Zellen der S-Phase oder der G2/M-Phase. Mit der Kultivierungszeit änderte sich auch die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. So nahm der Zellanteil an der G0/G1-Phase für beide Zelllinien und beide Kultivierungsarten zu und der Anteil der S-Phase sowie der G2/M-Phase ab. Die Änderungen waren besonders groß bei den Monolayern ausgeprägt.

Die Verschiebung hin zu den kleinen G0/G1-Zellen korreliert mit der Abnahme der Zelldurchmesser. Der für die Multilayer geringere Zellanteil in der S-Phase und der größere Anteil in der G0/G1-Phase im Vergleich zu den Monolayerzellen sprach für die kleineren Anfangsdurchmesser der Multilayer. So zeigt die Zellzyklusverteilung der WiDr-Zellen in Abbildung 54, dass die Verteilung der Monolayer von Tag 7 etwa der Verteilung der Multilayer von Tag 2 entspricht. Bei dem Vergleich der Zelldurchmesser der WiDr-Zellen (Abb. 26 a), kommt man zu dem Ergebnis, dass der Zelldurchmesser der Monolayer am Tag 7 etwa dem der Multilayer am Tag 2 entspricht.

Die Annäherung der Zellzyklusverteilungen gegen Ende der Wachstumskurven deuten demnach daraufhin, dass sich die Zelldurchmesser ebenfalls angleichen müssten.

Für die Charakterisierung der Multilayer kam die histologische HE-Färbung zum Einsatz. Beide Zelllinien wiesen ausgeprägte Unterschiede in Hinsicht auf die Kompaktheit und die Nekrosebildung auf. So entstand bei den kompakten Multilayern der WiDr-Zellen zwischen Tag 5 und 6

eine Zentralnekrose, wohingegen sich nekrotische Nester bei den locker gepackten SiHa-Multilayern bildeten.

Beim Ausstanzen der Multilayer konnten unterschiedliche Materialeigenschaften von Membran und Zellen zum Absplittern der Membran vom Multilayer führen, wobei oft Bruchstücke des Multilayers an der Membran hafteten. Mit Auftreten der Nekrose ergaben sich weitere Probleme, da beim Ausstanzen, Schneiden und Aufnehmen der Schnitte die Multilayer keine mechanische Stabilität mehr aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten Sphäroide neben der Zentralnekrose eine dicke vitale Randschicht, die den lockeren Zellverband im Innern stützte. Da die Multilayer planar wuchsen, sorgte nur die Plastikhalterung des Millicell-Einsatzes für Stabilität. Das Entfernen der Plastikwandung beim Ausstanzen ermöglichte erst das Schneiden, nahm aber gleichzeitig jegliche mechanische Stabilisierung. So konnte es passieren, dass beim Ausstanzen die eine Hälfte des Multilayers bis zur Nekrose an der Membran verblieb. Oder es veränderte sich der nekrotische Bereich bei der Schnittaufnahme. Unter Berücksichtigung dieser Fehlerquellen konnte mit Hilfe eines geeichten Maßstabes die Schichtdicke vermessen werden. Bei beiden Zelllinien stiegen die Schichtdicken der Multilayer nach 10 Tagen Kultivierung im Mittel auf etwa 400-450 μm an und enthielten, unterbrochen durch die Nekrosen, etwa 14-22 Zellschichten. Ähnliche Ergebnisse erhielten Minchinton et al. mit SiHa-Zellen. Sie beobachteten nach 8 d Wachstum als Multilayer etwa 20 Zellschichten, die ebenfalls Nekrosen aufwiesen (Minchinton et al. 1997).

Die Zunahme der Schichtdicke zeigte einen exponentiellen Verlauf. Die Berechnung der Verdopplungszeit für die Schichtdicke ergab für die WiDr-Multilayer 3,4 d (81,8 h) und für die SiHa-Zellen 3,2 d (76,4 h). In beiden Fällen benötigten die Zellen für die Verdopplung der Schichtdicke mehr Zeit als für die Verdopplung der Zellzahl. Für die WiDr-Zellen betrug der Faktor 1,4 und für die SiHa-Zellen 1,2. Die Erklärung dafür könnte die Abnahme des Zellvolumens sein. Die Zelldurchmesser der WiDr-Multilayer nahmen bis zum Tag 6 der Wachstumskurve stärker ab als bei den SiHa-Multilayern. Vermutlich sind bei den Multilayern, ähnlich den Sphäroiden, die äußeren Zellen größer als die inneren. Im Vergleich zu den radial wachsenden Sphäroiden jedoch ist der Anteil an großen Zellen aufgrund des planaren Wachstums der Multilayer geringer. Daraus könnte man schließen, dass der Unterschied zwischen Zellzahl- und Volumenverdopplung im Fall der Sphäroide geringer ausfällt als für die Multilayer. So entsprechen die Volumenverdopplungszeiten (siehe oben) der Sphäroide aus den Literaturangaben wahrscheinlich in Näherung den Zellzahlverdopplungszeiten.

4.1.2 Zellzyklusverteilung während des Wachstums

Während der Erstellung einer Wachstumskurve fand parallel zur Bestimmung der Zellzahl die Untersuchung der Zellzyklusverteilung mit Hilfe des Durchflußzytometers statt. In Abhängig-

keit von der Kultivierungszeit nahm der Anteil in der S-Phase ab, parallel dazu stieg der Anteil an G0/G1-Zellen. Im Gegensatz dazu änderte sich bei Mono- und Multilayern der Zellanteil in der G2/M-Phase kaum. Dies hängt jedoch damit zusammen, dass Änderungen bei niedrigen Werten weniger deutlich wahrgenommen werden. In der Tabelle 31 sind die Anfangs- und Endwerte für beide Zelllinien und Kultivierungen aufgelistet.

Tab. 31: Zellzyklusverteilungen in Abhängigkeit der Wachstumszeit

	G0/G1 (%)		S (%)		G2/M (%)	
	Tag 2	Tag 10	Tag 2	Tag 10	Tag 2	Tag 10
WiDr-Monolayer	38	88	57	9	5	3
SiHa-Monolayer	53	74	47	26	0	0
WiDr-Multilayer	52	88	36	8	12	4
SiHa-Multilayer	55	76	36	14	10	10

Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien waren bei der Kultivierung als Monolayer größer als bei den Multilayern. Der höhere S-Phasenanteil der WiDr-Monolayer passt zu der beobachteten geringeren Kontaktinhibierung. Die Zellzyklusverteilungen von Mono- und Multilayer glichen sich am Ende der Wachstumskurve an. Bei den Monolayern änderte sich die Zellzyklusverteilung bis zum 5. Tag wenig, dafür danach viel stärker. Im Gegensatz dazu fanden die Veränderungen bei den Multilayern hauptsächlich bis zum Tag 5 statt. Eine mögliche Erklärung für die anfangs geringen Änderungen der Monolayer könnte der noch ausreichend zur Verfügung stehende Platz sein, der die Zellen bezüglich ihrer Teilungsrate nicht limitierte.

West und Sutherland publizierten Zellzyklusverteilungen von WiDr-Zellen, die in der Tabelle 32 zusammen mit den hier ermittelten Daten aufgeführt sind (West und Sutherland 1987). Die Werte der Multilayer und der Sphäroide passen sehr gut zusammen. Allerdings variieren die Angaben zu den Monolayern. In beiden Fällen handelte es sich um 5-Tagekulturen, doch können die Zyklusverteilungen in Abhängigkeit der Zellaussaat stark voneinander abweichen.

Tab. 32: Zellzyklusverteilung der WiDr-Zellen

Kultivierung	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Quelle
Monolayer (5 d)	41,3	50,1	8,7	vorliegende Arbeit
	65,2 ± 2	20,1 ± 1	15 ± 1	(West und Sutherland 1987)
Multilayer (5 d)	77,4	17	5,5	vorliegende Arbeit
Sphäroide (1200 µm)	80 ± 3	12 ± 1	8 ± 3	(West und Sutherland 1987)

Bei Betrachtung der Gesamtzellzahlen für die Multilayer war erkennbar, dass die Zellzahlen in der S- und G2/M-Phase unverändert blieben. Nur die Zellen in der G0/G1-Phase nahmen zu. Die Anfärbung der Kryostatschnitte der WiDr-Multilayer mit dem Antikörper gegen das nukleäre Protein Ki-67 diente der Markierung der proliferierenden Zellen (Gerdes et al. 1984). Nahezu alle Zellen von 4 Tage alten Multilayern waren Ki-67-positiv. Bereits am Tag 5 lagen in der Mitte des Multilayers nicht Ki-67-gefärbte Zellen vor. Dies steigerte sich bis zum Tag 8, bei dem nur noch die Randschichten positiv für Ki-67 und damit proliferierend waren. Für die Färbung mitgeführter WiDr-Sphäroide zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.

Zusammengefasst ausgedrückt nahm ab Tag 5 der Anteil an proliferierenden Zellen ab und somit der Anteil an ruhenden Zellen zu. Durch die Kombination der Zellzyklusuntersuchung und dem Nachweis der proliferierenden Fraktion kann man darauf schließen, dass es sich bei der Zunahme des G0/G1-Anteils um die Zunahme von Zellen in der G0-Phase handelte. Diese befanden sich im mittleren Bereich des Zellverbandes. Untersuchungen mit den SiHa-Multilayern fanden hierzu nicht statt. Es wird jedoch von einem ähnlichen Verhalten ausgegangen, da die Zellzyklusverteilung während der Wachstumskurven vergleichbare Ergebnisse brachte.

4.2 Bestrahlung

In Hinsicht auf die unterschiedliche Kultivierung der Zellen erfolgte die Untersuchung ihres Überlebens nach Bestrahlung. Es wurden zwei verschiedene Bestrahlungsmodalitäten gewählt: einmal die locker ionisierende 250 kV-Röntgenstrahlung und die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen im Plateau und Bragg-Peak. Die Röntgenstrahlen trafen vertikal auf die Zellen, so dass die Bestrahlung wachstumstypisch verlief. Im Gegensatz dazu erfolgte der Austritt der Schwerionen horizontal, so dass hier ein Drehen der Zellen wachstumsuntypisch um 90° erforderlich war.

Die Bestrahlungen fanden bei Raumtemperatur statt. Bei den Schwerionenstrahlzeiten vergingen zwischen der Probenvorbereitung (Überführen der Multilayer aus einer Wachstumsbox in mehrere Bestrahlungsboxen, Auffüllen der Kulturflaschen), dem Transport vom Labor zum Bestrahlungsplatz und der eigentlichen Bestrahlung mit Schleusenpassage ohne zusätzliche Verzögerungen des Strahlbetriebes näherungsweise mindestens 45 min, für die Röntgenbestrahlung meist 25-30 min. Eine Temperaturerniedrigung von 37 °C auf Raumtemperatur bewirkt eine Verlangsamung des Stoffwechsels und somit auch eine Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs. Wenn an einem Bestrahlungstag mehrere Überlebenskurven anzufertigen waren, erfolgte nach Bestrahlung der ersten Kurve zunächst die Aufarbeitung bevor sich die Bestrahlung der zweiten Kurve anschloss. Somit konnten die strahlenbedingten Reparatur-

prozesse bis zum Ausplattieren so gering wie möglich und somit miteinander vergleichbar gehalten werden.

4.2.1 Röntgen

4.2.1.1 Methodische Untersuchungen zur Dosimetrie

Durch die Bestrahlung der Multilayer in der Kulturbox ergab sich ein etwas anderer Aufbau bei der Röntgenbestrahlung. Aufgrund dessen war eine exakte Dosimetrie mit der Box notwendig. Es wurde ein Gesamtkorrekturfaktor von 3,01 ermittelt, welcher aus drei Einzelfaktoren zusammengesetzt ist. Die ersten beiden ergaben sich aus der Absorption des Plexiglasses sowie des Mediums ($R_{\text{abs}}=1,64$) und dem Abstand von der Röntgenröhre ($R_{\text{geom}}=1,61$). Der dritte Korrekturfaktor beschreibt den Aufbaueffekt. Die Untersuchungen dazu waren langwieriger, da für die Photonenstrahlen ein Aufbaueffekt erst ab Energien $> 0,6$ MeV beschrieben ist (Kiefer 1981, Goretzki 1987, Kauffmann et al. 2001). Lediglich eine Publikation erwähnt diesen Effekt bei harter Röntgenstrahlung im Bereich von 150-300 kV (Reich 1990). Der ermittelte Faktor für den Aufbaueffekt bei 250 kV-Röntgenstrahlung betrug 1,14 und wurde von Ratul Sarkar bestätigt (Sarkar 2003). Demnach sind die Tiefendosis-Schemata für 200/250 kV Röntgenstrahlung nicht korrekt.

Um während der Ermittlung der Korrekturfaktoren dennoch Röntgenexperimente mit Multilayern durchführen zu können, erfolgte die Bestrahlung mit Suspensionszellen. Da es sich meist um gepaarte Experimente von Mono- und Multilayern handelte, fand die Trypsinierung der Zellen nach Kultivierung als Monolayer, Multilayer oder Sphäroid direkt vor der Bestrahlung statt. Es schloss sich die Überführung definierter Zellzahlen in 25 cm²-Kulturflaschen in einem reduzierten Mediumvolumen an. So waren identische Bestrahlungsbedingungen der zu vergleichenden Proben gewährleistet.

4.2.1.2 Einfluss der Wachstumsdauer der Multilayer auf das Überleben nach Röntgenbestrahlung

Die Wahl für Untersuchungen der Multilayer fiel auf 5 Tage alte Multilayer. Diese wiesen zu diesem Zeitpunkt eine ausreichende Zellzahl für anschließende Experimente und noch keine Nekrosen auf. Das bedeutete, dass die Zellen im Multilayer ausreichend mit Nährstoffen versorgt waren. In einem Experiment wurde neben den üblichen 5 Tage alten Multilayern auch Multilayer mit einer Wachstumszeit von 3 und 7 Tagen bestrahlt. Das Überleben nach Röntgenbestrahlung variierte wenig, doch war der Trend erkennbar, dass der 3 Tage alte Multilayer etwas besser überlebte. Keinen Unterschied gab es zwischen Multilayern der Tage 5 und 7.

Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung während der Wachstumskurve ergaben, dass sich die Multilayer im Zellzyklus nach 5 und 7 Tagen Wachstum nicht, aber zum 3 Tage alten Multilayer unterschieden. Beispielsweise besaßen die Multilayer nach 5 und 7 Tagen Wachstum einen Zellanteil von etwa 15 % in der S-Phase, der 3 Tage alte Multilayer dagegen 28 % Zellen in der S-Phase. Da die S-Phasezellen in der Regel strahlenresistenter sind, könnte diese Differenz in der Zellzyklusverteilung den Unterschied im Überleben erklären.

4.2.1.3 Röntgenbestrahlung von Zellsuspensionen

Je Zelllinie fanden mindestens drei unabhängige Experimente für Mono- und Multilayer, meist als gepaarte Experimente, statt. Das bedeutet, dass die Mono- und Multilayer einer Zelllinie am gleichen Tag eingesät und bestrahlt wurden. Bei beiden Zelllinien zeigten die Multilayer ein geringeres Überleben als die Monolayer. Die Beobachtungen bezüglich des Überlebens bestätigten sich auch bei Betrachtung der gepaarten Einzelexperimente.

Diese Radiosensitivierung der Multilayer steht im Widerspruch zu der beobachteten Kontaktresistenz der Sphäroide aus der Literatur. Dieser Kontakteffekt wurde erstmals 1972 von Durand und Sutherland an 24 h alten V79-171b-Sphäroiden beschrieben. Diese kleinen Sphäroide (10-25 Zellen) waren strahlenresistenter als die entsprechenden Monolayer, ersichtlich an der ausgeprägten Schulterform der Überlebenskurve (Durand und Sutherland 1972).

Sphäroide können aufgrund ihrer Heterogenität und Größe hypoxische Zellfraktionen enthalten, die strahlenresistenter sind als andere Sphäroidareale oder nicht hypoxische Monolayer. Zum Ausschluss der hypoxischen Fraktion wurden zunehmend kleine Sphäroide oder nur die äußeren Zellen großer Sphäroide verwendet.

Doch nicht alle Forschungsgruppen beobachten die gleichen Effekte (siehe Tab. 33). Einerseits könnte dies an Differenzen in der Experimentdurchführung liegen (große bzw. kleine Sphäroide) oder an Veränderungen der Zellen nach langjähriger Kultivierung und eventueller Selektionierung.

Als mögliche Erklärungen für die multizelluläre Resistenz dienten Unterschiede in der interzellulären Kommunikation, Veränderungen der Kernform und DNA-Verpackung sowie effizientere DNA-Reparatur.

Bei direktem Zell-Zell-Kontakt kommt als möglicher Weg für die interzelluläre Kommunikation vor allem die Verbindung über gap junctions in Frage. Doch Untersuchungen zeigten, dass viele transformierte Zellen weniger gap junctions besitzen als das entsprechende Normalgewebe (Holder et al. 1993). Weiterhin beschrieben Durand und Sutherland nur einen allmählichen Verlust der Strahlenresistenz von vereinzelt Sphäroidzellen (Durand und Sutherland 1972). Zwei Gap-junction-defiziente Zelllinien wurden mit Connexin43, einem Hauptprotein der gap junctions, transfiziert. Die EMT-6-Zellen, die keinen Kontakteffekt zeigten, bildeten nach der Trans-

fektion weiterhin keine Kontaktresistenz in den Sphäroiden aus. Auch veränderte sich der vorhandene Kontakteffekt bei den C6-Zellen nach der Transfektion nicht (Luo et al. 1997). Somit waren gap junctions scheinbar nicht direkt am Kontakteffekt beteiligt.

Tab. 33: Kontakteffekt

Zellen	Kontakteffekt	G1-Verteilung	Quelle
WiDr (5 d)	ja (<1), RT	Mono (41 %) ML (77 %)	vorliegende Arbeit
WiDr (1-2 d)	nein	Mono / Sph: kein signifikanter Unterschied	(Oloumi et al. 2002)
WiDr (22 d)	nein, 4 °C	Mono (65 ± 2 %) Sph (80 ± 3 %)	(West und Sutherland 1987)
SiHa (5 d)	ja (<1)	Mono (50 %) ML (81 %)	vorliegende Arbeit
SiHa (1-2 d)	ja (>1)	Mono / Sph: kein signifikanter Unterschied	(Oloumi et al. 2002)
V79-171b	ja		(Durand und Sutherland 1972, Oloumi et al. 2002)
V79-171b	nein		(Reddy et al. 1994)

Mono: Monolayer, ML: Multilayer, Sph: Sphäroide

Untersuchungen zur DNA-Verpackung erbrachten den Nachweis, dass Veränderungen der DNA-Verpackung die Reparaturfähigkeit von Zellen beeinflussen. So werden Schäden in transkribierten DNA-Bereichen schneller repariert (Bohr et al. 1987). Weiterhin unterscheidet sich das Überleben von Zellen in Abhängigkeit ihrer Position im Zellzyklus, da es dort zu großen Veränderungen der DNA-Verpackung kommt (Terasimat und Tolmach 1963). Auch konnten Unterschiede bezüglich der Chromatinstruktur zwischen Monolayern und Sphäroiden gefunden werden (Olive und Durand 1994).

Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Zellform und Genexpression. Aufgrund der fehlenden Haftung der Zellen an einer Oberfläche nehmen die Sphäroidzellen eine nahezu runde Form im Vergleich zu den Monolayerzellen ein. In den äußeren Zellen von Sphäroiden wurden verstärkt Tyrosin-Phosphatasen ermittelt (Mansbridge et al. 1992). Ebenso wurde bei V79-Sphäroiden eine verminderte Phosphorylierung der Topoisomerase II in den äußeren Zellen der Sphäroide gefunden (Luo et al. 1998). Dies ging mit einer 10-fach höheren Resistenz gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren einher (Olive et al. 1993).

Die Überlebenskurven der WiDr-Zellen wiesen eine ausgeprägte Schulterform auf. Dagegen zeigten die SiHa-Monolayer einen fast exponentiellen, die Multilayer einen rein exponentiellen

Kurvenverlauf. Da die Ausprägung der Schulter einen Hinweis auf die Reparaturfähigkeit der Zellen gibt, sollte für die SiHa-Zellen anhand einer fraktionierten Bestrahlung das Reparaturvermögen nach einer Röntgenbestrahlung untersucht werden. Parallel zur Einzeldosisbestrahlung (konventionell) fand eine fraktionierte Bestrahlung mit zwei Fraktionen statt. Die Verabreichung der zweiten Dosis erfolgte nach 6 h. Das Überleben nach fraktionierter Bestrahlung lag ab 4 Gy oberhalb der konventionellen Einzeldosisbestrahlung, so dass man von einer geringen Reparaturfähigkeit ausgehen kann.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Sphäroide zur Vereinzelnung der Zellen häufig eine längere Einwirkzeit des Trypsins benötigen. Dies traf für die Multilayer nicht zu. Die Trypsinbehandlung war für beide Kultivierungsarten identisch. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es keinen Unterschied im Überleben der Zellen gab, wenn sie unmittelbar vor oder nach der Bestrahlung trypsinisiert wurden. So ist das verminderte Überleben der Multilayer nicht auf eine Trypsinbehandlung zurückzuführen. Auch Olive und MacPhail kommen zu dem Schluss, dass Trypsin keine Auswirkungen auf das Überleben nach Bestrahlung zeigt (Olive und MacPhail 1992).

Eine mögliche Erklärung der Sensitivierung der Multilayer könnte der Unterschied im geometrischen Aufbau sein. So nimmt im kugeligen Sphäroid die Zellzahl pro Schicht nach außen hin zu. Das Verhältnis aus ruhenden Zellen im Inneren und proliferierenden Zellen in den Randschichten verschiebt sich zu Gunsten der proliferierenden Zellen. Im Multilayer hingegen sind die Zellanteile durch den parallelen Aufbau gleich groß.

Um die Ergebnisse der Multilayer besser mit Sphäroiddaten aus der Literatur in Relation setzen zu können, wurden auch einige Experimente mit Sphäroiden nach 5 Tagen Wachstum durchgeführt. Die WiDr-Zellen wuchsen zu kompakten und gleichmäßig geformten Sphäroiden heran, während die SiHa-Zellen sehr große unregelmäßige Aggregate bildeten. So überraschte es auch nicht, dass die Überlebenskurven der vereinzeln SiHa-Sphäroide viel stärker schwankten als die der Mono- oder Multilayer. Die Mittelwerte der drei Sphäroid-Experimente lagen jedoch fast identisch auf der Überlebenskurve der Multilayer. Somit waren die SiHa-Sphäroide ebenfalls sensitiver als die Monolayer. Obwohl nur ein Röntgenexperiment mit WiDr-Sphäroiden zur Durchführung kam, entsprach die Überlebenskurve bei niedrigen Dosen etwa dem Monolayerverhalten. Der Dosispunkt bei 6 Gy lag auf der Höhe der Multilayerkurve. Auf keinen Fall war eine multizelluläre Resistenz erkennbar. Somit sind die vorangegangenen Überlegungen bezüglich der unterschiedlichen Geometrie zwischen Multilayern und Sphäroiden nicht zutreffend.

Oloumi et al. verwendeten für ihre Untersuchungen 24-48 h alte Monolayer und Sphäroide von WiDr- und SiHa-Zellen (Oloumi et al. 2002). Ihre Angaben zum 10%igen Überleben (D_{10}) sowie die in dieser Arbeit ermittelten Daten mit den ermittelten Resistenzfaktoren in Bezug auf die entsprechenden Monolayer sind in Tabelle 34 aufgelistet. Ein Wert > 1 bedeutet ein resistenteres Verhalten der Sphäroide. Ein Resistenzfaktor < 1 hingegen spricht für eine Sensitivierung.

Tab. 34: D_{10} -Vergleichswerte nach Röntgenbestrahlung aus der Literatur

Zellen	Kultivierung	D_{10} (diese Arbeit)	Resistenz- faktor	D_{10} (Oloumi et al. 2002)	Resistenz- faktor
WiDr	Monolayer	6,6	1	$8,5 \pm 0,3$	1
	Multilayer	5,3	0,80		
	Sphäroide	5,4	0,81	$8,4 \pm 0,7$	1
SiHa	Monolayer	5,7	1	$5,8 \pm 0,3$	1
	Multilayer	3,6	0,63		
	Sphäroide	3,8	0,67	$7,3 \pm 0,4$	1,3

Oloumi et al. fanden im Fall der WiDr-Sphäroide keine, für die SiHa-Sphäroide jedoch eine Kontaktresistenz. Der Vergleich der Multilayer und Sphäroide dieser Arbeit ergab für beide Zelllinien ein fast identisches Überleben, welches sensitiver war als das der dazugehörigen Monolayer. So war die Sensitivierung der WiDr-Multilayer mit 0,80 schwächer ausgeprägt als die der SiHa-Multilayer mit 0,63. Eine mögliche Erklärung könnte die Differenz im Zellzyklus sein. Denn sowohl als Monolayer als auch im Multilayer wiesen die WiDr-Zellen einen höheren S-Phasenanteil (Monolayer: 50 %, Multilayer 17 %) als die SiHa-Zellen (Monolayer: 35 %, Multilayer 13 %) auf. Die S-Phasezellen überleben die Photonenbestrahlung am besten, ermittelt anhand von Überlebenskurven mit synchronisierten Zellen (Hall 1978).

Die 10%-Überlebenswerte der SiHa-Monolayer dieser Arbeit waren vergleichbar mit den Angaben von Oloumi et al. sowie Gruninger et al. ($D_{10} = 5,7$) (Gruninger et al. 1999). Jedoch lagen die Werte der WiDr-Monolayer weit unter den von Oloumi et al. ermittelten Werten. Weitere Vergleichsdaten aus der Literatur bezüglich der WiDr-Monolayer sind in Tabelle 35 aufgeführt. Bischof et al. zeigten einen Unterschied im Überleben in Abhängigkeit der Position der Zellen im Zellzyklus. Der Anteil an den strahlenresistenten S-Phasezellen wirkt sich deutlich auf das Überleben aus. So benötigten die Zellen mit 60 % S-Phasezellen 1,6 Gy mehr um den gleichen biologischen Effekt (10 % Überleben) zu erreichen als die Plateauzellen, deren S-Phaseanteil deutlich niedriger war (< 20 %). Das entspricht etwa 26 % mehr Dosis.

Ähnliche Beobachtungen wurden in dieser Arbeit mit WiDr-Zellen gemacht. Hier betrug die Differenz zwischen Monolayern (50 % S-Phase) und Multilayern (77 % G1-Phase) 1,3 Gy und bedeutete 24,5 % mehr Dosis für die Kultur mit hohem S-Phasenanteil.

Tab. 35: D₁₀- und SF2-Vergleichswerte aus der Literatur

Zelllinie	Strahlenart	D ₁₀	SF2	Quelle
WiDr-Monolayer (50 % S-Phase)	250 kV-Röntgen	6,6	0,74	vorliegende Arbeit
WiDr-Multilayer (77 % G0/G1-Phase)	250 kV-Röntgen	5,3	0,57	vorliegende Arbeit
WiDr (Plateau-Phase)	200 kV-Röntgen	6,7	0,74 ±0,24	(Hofman-Hüther 2002)
WiDr (>60 % S-Phase)	6 MeV-Röntgen	7,8		(Bischof et al. 2003)
WiDr (~80 % G1-Phase)	6 MeV-Röntgen	6,2		(Bischof et al. 2003)

Bisher wurde in der Literatur nur das Vorhandensein einer Kontaktresistenz diskutiert. Eine Ausnahme bildet die Veröffentlichung von Staab et al. (Staab et al. 2004). Mit Sphäroiden der Hamsterzelllinie V79 konnte eine sehr geringe Strahlensensitivierung beobachtet werden. Allerdings existierten parallel dazu keine Angaben zur Zellzyklusverteilung der untersuchten Monolayer und Sphäroide. Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben zum ersten Mal eine signifikante multizelluläre Strahlensensitivierung von zwei humanen Tumorzelllinien.

4.2.2 Schwerionenbestrahlung

Bei der Schwerionenbestrahlung ist dem ausgedehnten Bragg-Peak ein Plateau vorgelagert. Da die Positionierung des Bragg-Peaks im Tumor erfolgen soll, findet die Applikation der Energie des Plateaus im Normalgewebe vor dem Tumor statt. Zur Simulation des Überlebens von Normalgewebe und Tumor diente die Bestrahlung der Mono- und Multilayer beider Zelllinien im Plateau mit 370 MeV bzw. im ausgedehnten Bragg-Peak.

Das Überleben beider Zelllinien als Monolayer war im Bragg-Peak niedriger als im Plateau. Beim Vergleich von Mono- und Multilayern der SiHa-Zellen innerhalb einer Bestrahlungsenergie zeigte sich wie nach Röntgenbestrahlung, dass die Multilayer schlechter überlebten als die Monolayer. Für die SiHa-Zellen waren exponentielle Überlebenskurven typisch. Die WiDr-Zellen verhielten sich anders. So unterschieden sich die Mono- und Multilayer nach Plateau-Bestrahlung aufgrund der Schulterform der Überlebenskurven erst bei höheren Dosen (ab 4 Gy).

Lediglich bei den Multilayern im Bragg-Peak ging die Schulterform in eine rein exponentielle Form über. Als Folge davon blieb das Überleben der Multilayer bei kleinen Dosen unterhalb, bei höheren Dosen (ab 5 Gy) oberhalb der Monolayerkurve.

Tab. 36: Vergleich der RBW-Werte mit Literaturdaten nach Kohlenstoff-Bestrahlung

Zellen	Kultivierung	Bestrahlung ^{12}C	LET (keV/ μm)	RBW	Quelle
WiDr	Monolayer	370 MeV/u eBP (25 mm)	11,5 90	1,1 2,0	vorliegende Arbeit
WiDr	Multilayer	370 MeV/u eBP (25 mm)	11,5 90	1,0 1,9	vorliegende Arbeit
WiDr	Monolayer	397,6 MeV/u eBP	11 89	1,3 2,9	(Hofman-Huether et al. 2004)
SiHa	Monolayer	370 MeV/u eBP (25 mm)	11,5 90	1,0 2,2	vorliegende Arbeit
SiHa	Multilayer	370 MeV/u eBP (25 mm)	11,5 90	1,1 2,0	vorliegende Arbeit
V79	Sphäroide	227 MeV/u eBP	18 60	1,4 2,1	(Staab et al. 2004)
HLE	Monolayer		13 76	1,2 2,6	(Ofuchi et al. 1999)
HLF	Monolayer		13 76	1,1 2,6	(Ofuchi et al. 1999)
V79	Monolayer	266 MeV/u 11 MeV/u	13,7 153,5	1,4 3,4	(Weyrather et al. 1999)
CHO-K1	Monolayer	266 MeV/u 11 MeV/u	13,7 153,5	1,4 4,2	(Weyrather et al. 1999)
xrs5	Monolayer	266 MeV/u 11 MeV/u	13,7 153,5	2,2 1,5	(Weyrather et al. 1999)
MIAPaCa-2	Monolayer		13 80	1,3 1,8	(Matsui et al. 2004)
SUIT-2	Monolayer		13 80	1,2 1,6	(Matsui et al. 2004)
BxPC-3	Monolayer		13 80	1,8 2,5	(Matsui et al. 2004)

Die Resistenzfaktoren in Abhängigkeit von der Bestrahlung waren für die WiDr-Multilayer von 0,80 (Röntgen), 0,83 (Plateau) und 0,85 (Bragg-Peak-Bestrahlung der mit Luftsauerstoff-begasteten Multilayer) sehr ähnlich. Für die SiHa-Multilayer ergaben sich folgende Werte: 0,63 (Röntgen), 0,57 (Plateau) und 0,70 (Bragg-Peak). Für beide Zelllinien zeichnete sich ein geringer Rückgang der Sensitivität der Multilayer im Bragg-Peak ab.

Die fast identischen Kurvenverläufe sowie die RBW-Werte bestätigen die Vergleichbarkeit der Röntgenstrahlung (RBW = 1) mit der Plateaubestrahlung (RBW = 1,0-1,1). Für die Bragg-Peak-Bestrahlung ergaben sich RBWs von 1,9-2,2.

In der Literatur (siehe Tab. 36) differieren die RBWs in Abhängigkeit der untersuchten Zelltypen und der Reparaturkapazität der Zellen. So zeigten zwei strahlenresistente Hamsterzelllinien V79 (Lunge) und CHO-K1 (Eierstock) eine weitaus größere RBW als die strahlensensitive, DSB-Reparatur-defiziente Mutante xrs5 (Weyrather et al. 1999).

Die RBW der WiDr-Monolayer von Hofman-Huether et al. (2004) liegen mit 1,3 (Plateau) bzw. 2,9 (Bragg-Peak) deutlich über den in dieser Arbeit ermittelten RBWs von 1,0 (Plateau) bzw. 1,9 (Bragg-Peak), obwohl sich die LETs so gut wie nicht voneinander unterschieden. Aus einer persönlichen Mitteilung ist jedoch bekannt, dass sich die Phänotypen der jeweils untersuchten WiDr-Zellen in beiden Labors unterschieden. Bezüglich der RBW der SiHa-Zellen wurden keine Literaturangaben gefunden.

4.3 Etoposid-Behandlung

4.3.1 Etoposid-Behandlung von Suspensionskulturen

Bei den Experimenten mit dem DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden Chemotherapeutikum Etoposid kamen ebenfalls Suspensionskulturen zum Einsatz. Die Behandlung mit Etoposid sollte nur für 30 min erfolgen. Bei dieser kurzen Inkubationszeit war nicht gewährleistet, dass die Zellen im Multilayer in allen Schichten gleich mit dem Etoposid in Berührung kamen. Um Diffusionseffekte auszuschließen, wurden Mono- und Multilayer sowie Sphäroide als Zellsuspensionen in Etoposid-haltigem Medium inkubiert. Die Zellvorbereitung entsprach der für die Untersuchungen der Zellsuspensionen mit Röntgenstrahlung.

Nach der Etoposid-Behandlung zeigten die Multilayer beider Zelllinien ein besseres Überleben als die Monolayer, ebenso das einmal durchgeführte Experiment mit den WiDr-Sphäroiden. Es konnte für die Etoposid-Behandlung eine multizelluläre Resistenz beider Zelllinien festgestellt werden. Dieses Verhalten ist invers zu dem beobachteten Sensitivierungseffekt nach Bestrahlung. Die Extrapolation der Regressionsgeraden führte zum 10%igen Zellüberleben. Diese Daten sind in Tabelle 37 aufgeführt. In dieser Arbeit wurde für die WiDr-Multilayer ein Resis-

tenzfaktor von 2,5 und für die SiHa-Multilayer von 3,1 ermittelt. Als Vergleich dienen Angaben aus Oloumi et al., welche die äußeren Zellen der 10-14 d alten Sphäroide verwendeten. Die Literaturdaten beschreiben für die WiDr-Sphäroide mit 1,1 so gut wie keine Kontaktresistenz und für die SiHa-Sphäroide einen etwas geringeren Resistenzfaktor von 2,6. Die WiDr-Sphäroide von Oloumi et al. zeigten sowohl nach Röntgenbestrahlung als auch nach Etoposid-Behandlung keine Kontaktresistenz im Gegensatz zu den SiHa-Sphäroiden, die nach Bestrahlung um den Faktor 1,3 und nach Etoposid um den Faktor 2,6 resistenter waren (Oloumi et al. 2002).

Tab. 37: Zusammenstellung der D_{10} -Werte und der daraus ermittelten Resistenzfaktoren nach Etoposid-Behandlung mit Literaturdaten

Zellen	Kultivierung	D_{10} ($\mu\text{g/ml}$) (diese Arbeit)	Resistenz- faktor	D_{10} ($\mu\text{g/ml}$) (Oloumi et al. 2002)	Resistenz- faktor
WiDr	Monolayer	44,7	1	$35 \pm 4,0$	1
	Multilayer Sphäroide	111,5 77,3	2,5 1,7	$38 \pm 5,5$	1,1
SiHa	Monolayer	11,2	1	$6,3 \pm 0,9$	1
	Multilayer Sphäroide	34,5	3,1	$16,7 \pm 0,5$	2,6

Interessanterweise untersuchten Oloumi et al. die Etoposidresistenz (ebenfalls 30 min bei 37 °C) an den äußeren Zellen von 10-14 Tage alten Sphäroiden, wohingegen sie für die Röntgenuntersuchungen alle Zellen von 1-2 Tage alten Sphäroiden verwendeten. Sie benutzten somit für die eine Untersuchung nur die proliferierenden Zellen älterer Sphäroide, während für die andere Untersuchung alle Zellen von sehr kleinen Sphäroiden zum Einsatz kamen.

In dieser Arbeit fanden die Untersuchungen zum Vergleich von Bestrahlung und Etoposid immer mit 5 Tage alte Kulturen statt. Dies schloss auch die Monolayer und gegebenenfalls die Sphäroide mit ein. So waren für alle Experimente identische Ausgangsbedingungen gegeben und ein direkter Vergleich möglich. Für beide Zelllinien wurde nach Bestrahlung eine multizelluläre Sensitivierung beobachtet. Nach Etoposid-Behandlung hingegen wurde für beide Zelllinien eine multizelluläre Resistenz gefunden.

4.3.2 Multi Drug Resistance

Das signifikant bessere Überleben der Multilayer nach Etoposid-Behandlung entgegen den Beobachtungen der Sensitivierung nach Bestrahlung implizierte die Frage, ob sich bei den Multilayern eine Multi Drug Resistance ausgebildet hat, da Etoposid Substrat des P-Glycoproteins ist.

Von Sphäroiden, auch von sehr kleinen Aggregaten, ist bekannt, dass sie gegenüber Chemotherapeutika resistenter im Vergleich zu den Monolayern sind. Eine Übersicht dazu findet man bei Durand und Olive (2001). Den Nachweis in dieser Arbeit lieferte die Untersuchung der funktionellen Aktivität des P-Glykoproteins unter Verwendung des Durchflußzytometers nach Inkubation der Zellen mit Daunorubicin und Verapamil (Krishan 2001). Bei beiden Zelllinien konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Mono- und Multilayer festgestellt werden. Der Wert der Positivkontrolle (LS513) entsprach dabei den Erfahrungswerten von Herrn PD Dr. Thews mit diesen Zellen, so dass ein Funktionieren des Tests gewährleistet war. Die erhöhte Resistenz der Multilayer war demnach nicht auf die Herausbildung der Multi Drug Resistance zurückzuführen.

4.3.3 Etoposid-Behandlung nach Wiederaussaat resuspendierter Multilayer

Zur näheren Untersuchung der Etoposidresistenz der SiHa-Multilayer diente die Auflösung des Multilayerverbandes nach normalem 5-tägigem Wachstum und die Einsaat der trypsinierten Zellen als Monolayer. Nach verschiedenen Zeiten der Wiedereinsaat erfolgte die Etoposid-Behandlung an frisch hergestellten Suspensionszellen. Die Überlebenskurven von 0 h und 24 h zeigten ein unverändertes Verhalten. Die Kurve nach 48 h näherte sich sehr der Überlebenskurve der Monolayer an. Die Zellen waren also weitaus sensitiver als nach kürzeren Zeiten. Umso überraschender war das Überleben 72 h nach Wiederaussaat, welches wieder den kürzeren Zeiten und somit den Multilayern entsprach.

Kwok und Sutherland beobachteten einen vollständigen Rückgang der Kontaktresistenz von CaSki-Zellen 15 h nach Dissoziation der Sphäroide (30-70 μm) mit einer Zellzyklusdauer von 24 h. Die Zellzyklusverteilungen zwischen den exponentiellen Monolayern und den kleinen Sphäroiden unterschieden sich nicht (Kwok und Sutherland 1991).

Ähnliche Untersuchungen führten Olive et al. mit V79-171b-Sphäroiden durch. Nach dem Trypsinieren der 11 Tage alten Sphäroide wurden nur die äußeren Zellen als Monolayer eingesät. Die Zellen verloren zeitabhängig ihre Resistenz und erreichten nach 4 Zellverdopplungen (48 h) die Sensitivität der Monolayer (Olive et al. 1993).

Die Verdopplungszeit der SiHa-Monolayer dieser Arbeit betrug 17,3 h. Nach einem Wachstum von 48 h nach Wiederaussaat (~2,8 Zellverdopplungen) entsprach das Überleben den Monolayern. Doch nach weiteren 24 h, also gesamt 72 h Wachstum als Monolayer, waren ebenfalls etwa 4 Zellverdopplungen abgelaufen, doch die Zellen wiesen wieder die Resistenz der Multilayer auf.

Bei Betrachtung der Kurven von Olive et al. ist bei 72 h ein geringer Trend hin zu einem leicht erhöhten Überleben ersichtlich. Interessant bei einem noch späteren Zeitpunkt nach Wiederaus-saat wäre, ob sich der Trend fortsetzen würde.

Da die Mono- und Multilayer sich hinsichtlich ihrer Verteilung im Zellzyklus unterschieden, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Unterschiede im Zellzyklus verantwortlich sein könnten für das verschiedene Überleben nach Bestrahlung und Etoposid. In der Literatur (Sinclair 1968, Hall 1978) zeigten Untersuchungen mit synchronisierten Zellen, dass das Überleben in Abhängigkeit der Zyklusverteilung in den verschiedenen Zyklusphasen variiert. So waren die G2/M-Zellen nach Röntgenbestrahlung sensitiver als die G1-Zellen und Zellen der frühen und späten S-Phase.

Weiterhin ist bekannt, dass Etoposid kovalent an die Topoisomerase II bindet. Dieses Enzym katalysiert die Entwindung der DNA-Helix während der Replikation, Transkription, aber auch während der Chromosomenkondensation (Lang et al. 1998, Robert und Larsen 1998). Demnach scheint Etoposid hauptsächlich in zyklierenden Zellen aktiv zu sein. Zur genaueren Untersuchung in den SiHa-Zellen dienten Synchronisationsversuche.

4.4 Synchronisation

Eine Synchronisation der Zellen gestaltete sich schwierig, da ein Vergleich zwischen Mono- und Multilayer erfolgen sollte. Wie aber die Wachstumskurven zeigten, glichen sich beide Kultivierungsarten hinsichtlich ihrer Zyklusverteilung gegen Ende der Untersuchung an. So wurden die Monolayerzellen 10mal dichter ausgesät und die Experimente wie üblich nach 5 Tagen durchgeführt. Die Verteilung im Zellzyklus der dichter ausgesäten Monolayer entsprach nicht exakt der Verteilung der Multilayer, jedoch war ein deutlicher Trend in Richtung der Multilayer zu beobachten.

Nach Schwerionenbestrahlung überlebten die dicht ausgesäten Monolayer schlechter als die dünneren Monolayer. Die Überlebenskurve der dichteren Monolayer lag nach Plateau-Bestrahlung zwischen den Mittelwerten der Mono- und Multilayerkurven. Nach Bestrahlung im Bragg-Peak lag die Überlebenskurve der dicht ausgesäten Monolayer im Bereich der Multilayer. Mit Annäherung des Zellzyklus der Monolayer an die Multilayer veränderte sich auch das Überleben in Richtung der radiosensitiveren Multilayer.

Bezüglich der Bestrahlung gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur. So zeigte Durand einen Unterschied in der Strahlenresistenz in Abhängigkeit der Zellen in ihrer Position im Sphä-

roid. Die inneren (ruhenden) Zellen des V79-Sphäroids waren sensitiver als die äußeren (proliferierenden) Zellen (Durand 1983).

Hlatky et al. beschrieben hingegen bei Sandwich-Kulturen mit 9L-Gliosarkomzellen eine höhere Resistenz der inneren Zellen. Auch zeigten die Monolayerzellen eine Veränderung der Resistenz in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer ohne Mediumwechsel. Bis Tag 5 zeigte sich keine Veränderung, ab Tag 6 jedoch eine deutliche Resistenz der länger kultivierten Zellen (Hlatky et al. 1986).

West et al. untersuchten die Strahlenresistenz von WiDr-Monolayern in Abhängigkeit der Wachstumszeit (West et al. 1988). Aus den angegebenen α - und β -Werten erfolgte die Erstellung der Überlebenskurven, die in Abbildung 81 zu sehen sind. Parallel dazu wurden die Überlebenskurven der WiDr-Monolayer (schwarz) und Multilayer (rot) dieser Arbeit mit aufgetragen, hervorgehoben durch die gestrichelten Linien. Die 5 Tage alten Monolayer liegen in ihrer Resistenz zwischen den Kurven der Tage 4 und 6 und die der Multilayer zwischen Tag 6 und 8.

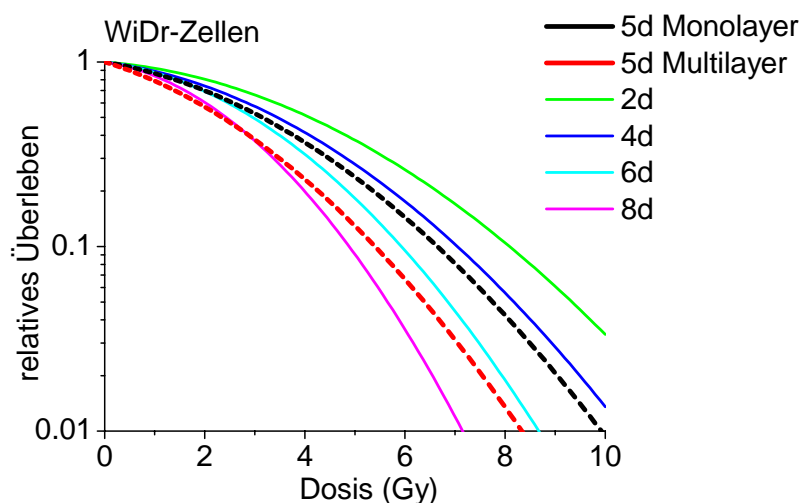


Abb. 81: Überlebenskurven von WiDr-Zellen in Abhängigkeit von der Dosis (Die Angaben zu den durchgezogenen Linien (2-8 d) stammen aus (West et al. 1988), die gestrichelten Linien aus dieser Arbeit.)

Parallel zu den Überlebenskurven sind in Tabelle 38 die entsprechenden Zellzyklusverteilungen aufgeführt. Mit zunehmender Kultivierungszeit waren eine Zunahme des G0/G1-Anteils sowie eine Abnahme der Anteile der S-Phase und G2/M-Phase zu beobachten.

Die Verteilung der Multilayer entspricht etwa der 8 Tage alten Monolayer von West et al., wohingegen die Monolayer dieser Arbeit einen weitaus höheren Anteil an S-Phase-Zellen aufwiesen als alle von West et al. ermittelten Verteilungen. Dies könnte mit ihrer 3-fach dichteren Aussaat der Zellen zusammenhängen. Die WiDr-Zellen wachsen bei dünner Aussaat kolonie-

artig. Es könnte sein, dass die Zellen trotz des hohen S-Anteils in der Mitte der Kolonien bereits ruhende Zellen (G0-Zellen) enthalten und deshalb die Strahlenresistenz abnimmt. Bei dichter ausgesäten Zellen beobachtet man ein Wachstum der Zellen in Gruppen, jedoch keine solche Koloniebildung, so dass von nur zyklischen Zellen ausgegangen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den hier untersuchten SiHa-Zellen für die Strahlensensitivierung der Multilayer die Zellzyklusverteilung verantwortlich ist. Welchen Anteil daran der verminderte Anteil der strahlenresistenten S-Phase im Vergleich zum erhöhten Anteil an ruhenden Zellen (G0) hat, bleibt ungeklärt.

Tab. 38: Zellzyklusverteilungen der WiDr-Zellen in Abhängigkeit der Wachstumsdauer

Wachstumszeit	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Quelle
2 d	50 ± 2	29 ± 2	21 ± 2	(West et al. 1988)
4 d	58 ± 1	26 ± 1	16 ± 1	
6 d	68 ± 2	21 ± 2	11 ± 1	
8 d	75 ± 1	16 ± 1	9 ± 1	
10 d	74 ± 3	14 ± 2	12 ± 1	
12 d	78 ± 3	12 ± 1	10 ± 1	
5 d Monolayer	41,3	50,1	8,7	vorliegende Arbeit
5 d Multilayer	77,4	17	5,5	

Zur Absicherung der gemachten Beobachtung nach Bestrahlung schlossen sich die gleichen Experimente mit Etoposid an. Nach Etoposid-Behandlung verhielten sich die dichter ausgesäten Zellen chemoresistenter als die dünner ausgesäten Zellen und näherten sich in ihrem Überleben den Multilayern an. Auch hier scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Zellzyklusverteilung und Etoposidresistenz vorzuliegen.

Sullivan et al. wiesen anhand von DNA-Strangbruchhäufigkeiten nach Etoposid-Behandlung eine erhöhte Resistenz von Plateauphasezellen (CHO) gegenüber exponentiellen Zellen nach. Es kamen Synchronisationsexperimente zum Einsatz, bei denen die Zellen ausgehend von der exponentiellen Wachstumsphase in der G1-Phase oder G2/M-Phase angereichert wurden. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen diesen Populationen. Somit bewirkten die G0-Zellen der Plateauzellen die erhöhte Resistenz (Sullivan et al. 1986).

Chapuis et al. untersuchten humane Karzinomzelllinien (A431, ME180 und Hep3) ebenfalls auf ihre Etoposidresistenz in verschiedenen Wachstumsphasen (Chapuis et al. 1992). Auch hier zeigten die Plateauphasezellen (10-tägige Kultivierung) ein viel besseres Überleben im Ver-

gleich zu den exponentiellen Kulturen. Die dazugehörigen Zellzyklusuntersuchungen sowie die der vorliegenden Arbeit sind in der Tabelle 39 zusammengefasst.

Die Zellzyklusverteilungen der exponentiellen Zellen von Chapuis et al. entsprechen in etwa denen der Monolayer dieser Arbeit und die Anteile der Plateauphasezellen denen der Multilayer dieser Arbeit. Chapuis et al. kommen aufgrund von Synchronisationsexperimenten und Markierung der proliferierenden Zellen zu dem Schluss, dass der Anteil an ruhenden Zellen entscheidend ist für die großen Differenzen zwischen den exponentiellen Zellen und den Plateauphasezellen (Chapuis et al. 1992).

Tab. 39: Zellzyklusverteilungen in Abhängigkeit des Wachstums

Zellen		G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Quelle
WiDr-Monolayer		41,3	50,1	8,7	vorliegende Arbeit
WiDr-Multilayer		77,4	17	5,5	
SiHa-Monolayer		50,4	34,7	14,9	
SiHa-Multilayer		81,1	12,7	6,2	
SiHa-Monolayer	dünne Eins.	55,7±6,4	34,2±1,4	10,2±7	
	dichte Eins.	67,4±1	23,8±1,1	8,8±0,5	
Hep3-Monolayer	exp. Ph.	58	28	14	(Chapuis et al. 1992)
	Plateau	71	18	11	
ME180-Monolayer	exp. Ph.	42	42	16	
	Plateau	56	35	9	
A431-Monolayer	exp. Ph.	51	37	12	
	Plateau	75	18	7	
WiDr-Monolayer	4 d	58 ± 1	26 ± 1	16 ± 1	(West et al. 1988)
	8 d	75 ± 1	16 ± 1	9 ± 1	

exp. Ph.: exponentielle Phase, Eins.: Einsaat

Die Synchronisationsexperimente mit den SiHa-Monolayern dieser Arbeit erreichten nicht die Zellzyklusverteilung der Multilayer. Die entsprechenden Verteilungskurven der dicht eingesäten Monolayer lagen etwa in der Mitte zwischen denen der Kontroll-Monolayer und der Multilayer. Trotzdem bewirkten die geringen Änderungen von beispielsweise 10 % in der S-Phase starke Effekte im Überleben. Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede im Überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Zellzyklusposition fanden mit weitgehend synchronisierten Zellen statt (Hall 1978). Es ist jedoch wichtig, die ruhenden Zellen mit in die Untersuchungen einzubeziehen. So bewirkt neben dem niedrigeren Anteil an S-Phasezellen auch der höhere Anteil an ruhenden Zellen in den Multilayern und den dichter eingesäten Monolayern zum einen

eine Radiosensitivierung nach Bestrahlung und im Fall der Etoposid-Behandlung eine Resistenz.

4.5 Zellzyklus-Analyse nach Bestrahlung

Nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung wiesen die Zellen eine gleichmäßige Zunahme des Zelldurchmessers auf. Als Beispiel dienen hier die SiHa-Monolayer, deren Durchmesser nach Röntgenbestrahlung von 18,5 auf 22 μm und nach Bragg-Peak-Bestrahlung bis auf 26,5 μm anstieg. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Zellzahl der Monolayer nach Röntgenbestrahlung noch einen geringen Zuwachs zeigte, dagegen nach Schwerionenbestrahlung konstant blieb. Bei den Multilayern zeigten sich nur geringe Unterschiede nach der Bestrahlung mit Röntgen und Schwerionen. Die Zellzahl blieb konstant bzw. nahm sogar leicht ab.

Zukowski ermittelte mit V79-379A-Sphäroiden ($200 \pm 30 \mu\text{m}$) nach einer Bestrahlung mit 227 MeV/u Kohlenstoffionen bei niedrigen Dosen eine Verlangsamung des Wachstums. Mit höheren Dosen war ein Stagnieren bzw. eine leichte Abnahme ($>8 \text{ Gy}$ 227 MeV/u Kohlenstoffionen bzw. $> 10 \text{ Gy}$ Röntgenbestrahlung) des Sphäroidvolumens zu beobachten. Ein erneutes exponentielles Wachstum der Sphäroide resultierte aus nachwachsenden Sphäroiden. Das Wachstum dieser „Rezidive“ verzögerte sich mit zunehmender Dosis. So war ein Volumenzuwachs nach 7,4 Gy (227 MeV/u Kohlenstoffionen) erst ab Tag 7 beobachtbar (Zukowski 1999). Die Abnahme des Sphäroidvolumens könnte durch eine verminderte Zellzahl zustande kommen. Alternativ käme auch ein Rückgang des Zellvolumens in Frage, doch stünde dies entgegen den hier gemachten Beobachtungen der Zellvergrößerung nach Bestrahlung.

Nach Bestrahlung stieg zeitabhängig der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase an. Gleichzeitig nahm der Anteil der Zellen in der G0/G1- und S-Phase ab. Die Zellen befanden sich somit in einem G2/M-Arrest. Der Anstieg des Zelldurchmessers ist teilweise dadurch erklärbar, dass die Zellen der G2/M-Phase größer sind als in den anderen Zellzyklusphasen. Durch den Arrest in dieser Zellzyklusphase vergrößert sich somit auch der Anteil an Zellen mit größerem Durchmesser. Für die Monolayer stieg der Durchmesser bis 48 h nach Bragg-Peak-Bestrahlung an, wohingegen nach Röntgenbestrahlung das Maximum bei 24 h erreicht war. Bei Betrachtung der Maxima der G2/M-Arreste, die nach Röntgen bei etwa 18 h und nach Schwerionen bei 24-36 h lagen, erklärt sich nicht der Anstieg über diesen Zeitraum hinaus bzw. der Übergang in ein Plateau. Nach der Theorie des Zusammenhanges von Durchmesser und Zellzyklusverteilung hätte nach Auflösung des Zellzyklusarrestes eine Abnahme der Durchmesser erfolgen müssen.

Die beobachtete starke Zunahme des Durchmessers könnte mit strahleninduzierten Störungen der Zellmembran einhergehen, die zum Anschwellen der Zellen führten.

Nach 8 Gy Röntgenbestrahlung gingen die SiHa-Monolayer in einen temporären G2/M-Block über, der 6 h nach der Bestrahlung begann. Etwa 30-36 h nach Bestrahlung waren die Zellen wieder komplett in den Zellzyklus eingetreten. Der Übergang der Multilayer in den G2/M-Arrest erfolgte 12 h nach der Bestrahlung, jedoch dauerte dieser bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes von 120 h nach Bestrahlung an. Bei beiden Kultivierungsarten war direkt vor Beginn des G2/M-Arrests ein Anstieg in der S-Phase zu beobachten, der für Multilayer jedoch deutlicher hervortrat. Zeitlich gesehen, fand das Ende des S- bzw. G2/M-Blocks der Monolayer zu der Zeit statt, bei der die Multilayer gerade den Anstieg in der S- und G2/M-Phase verzeichneten. Diese zeitliche Verschiebung des Beginns der Arreste könnte auf die unterschiedlichen Verdopplungszeiten von Mono- und Multilayer zurückzuführen sein.

Legt man die Verdopplungszeiten der SiHa-Zellen von 17,3 h für die Monolayer und 61,2 h für die Multilayer zugrunde, erkennt man für die Monolayer nach Röntgen, dass das Maximum des G2/M-Arrests nach etwa einer Verdopplungszeit (18 h) und die vollständige Rückkehr in den Zellzyklus nach zwei Verdopplungszeiten (36 h) erfolgte. Spricht man den Multilayern ein ähnliches Verhalten zu, hätte nach etwa 60 h das Maximum und nach etwa 120 h die vollständige Rückkehr in den Zellzyklus stattfinden müssen. Letzteres traf auf keinen Fall zu. Die Unterschiede zwischen Mono- und Multilayern beruhen wahrscheinlich nicht nur auf den unterschiedlich langen Verdopplungszeiten. Leider war eine längere Beobachtungszeit der Multilayer aus technischen Gründen nicht möglich, da sich der Multilayerverband durch absterbende Zellen auflöste.

Nach 8 Gy Schwerionenbestrahlung im Bragg-Peak begannen die Arreste in der S-Phase und G2/M-Phase der Monolayer zur gleichen Zeit wie nach Röntgen. Der G2/M-Arrest hielt jedoch länger an und betraf auch mehr Zellen. So stieg der G2/M-Anteil nach Röntgen von 55 % auf 82 % nach Bragg-Peak-Bestrahlung. Die Monolayerzellen waren zum Ende der Untersuchung, 48 h nach Bestrahlung, noch nicht wieder vollständig in den Zellzyklus zurückgekehrt. Der Arrest dauerte etwa 12-24 h länger als nach der Röntgenbestrahlung. Für die Multilayer schien kein Unterschied zwischen Röntgen- und Schwerionenbestrahlung bezüglich des G2/M-Blocks vorzuliegen. Die Erhebung der Messwerte ging aufgrund der Auflösung des Multilayerverbandes nicht über die beobachteten 120 h nach Bestrahlung hinaus. Aus diesem Grund kann keine Aussage über einen verlängerten Arrest nach Bragg-Peak-Bestrahlung gemacht werden. Die Daten zum S-Phasen-Arrest der Multilayer unterschieden sich zu den Röntgenangaben. Es

handelte sich um nur ein gesichertes Experiment, aber dieses zeigte eine zeitliche Verschiebung des Arrests. Das Peakmaximum lag etwa 12 h später als nach der Röntgenbestrahlung.

Die SiHa-Zellen haben das humane Papillomavirus vom Typ 16 (HPV-16) integriert. In 61,1 % der untersuchten Zervix-Biopsien deutscher Patienten lagen ebenfalls HPV-16-Infektionen vor (Durst et al. 1983). Das exprimierte E6-Protein bindet an das Tumorsuppressorprotein p53. Somit ist dieses nicht mehr funktional und wird degradiert (Scheffner et al. 1990). Normal wird nach Bestrahlung das p53 aktiviert, welches dann einen transienten Zellzyklusarrest in der G1-Phase auslöst, um die Schäden der DNA zu reparieren. Bei einem Ausbleiben der Reparatur induziert p53 in den betroffenen Zellen die Apoptose (Verheij und Bartelink 2000). Durch den funktionellen Verlust des p53 zeigen die Zellen daraufhin keinen G1-Arrest nach Bestrahlung mehr (Kuerbitz et al. 1992) und durchlaufen den Zellzyklus weiter bis zum G2-Arrest.

Lucke-Huhle et al. berichteten über einen zeitabhängigen G2/M-Arrest von V79-Zellen nach Schwerionenbestrahlung. Der Anteil der G2/M-Zellen stieg und die Verweildauer im Arrest verlängerte sich mit Zunahme des LET und der Dosis. Nach 8 Gy Röntgenbestrahlung waren etwa 65 %, nach 6 Gy Bragg-Peak-Bestrahlung bereits 95 % in der G2/M-Phase arretiert. Allerdings beobachteten sie bei den V79-Hamsterzellen keine Verzögerung in der S-Phase nach Bragg-Peak-Bestrahlung. Das G2/M-Maximum war nach Röntgen- und Bragg-Peak-Bestrahlung nach 8 h erreicht, hielt aber für Letztere ebenfalls länger an (Lucke-Huhle et al. 1979). Die SiHa-Monolayer zeigten einen G2/M-Anstieg bei 12 h und erreichten das Maximum nach 18 h (nach Röntgen) bzw. 24 h (nach Bragg-Peak) nach Bestrahlung. Diese Differenz könnte aus der kürzeren Verdopplungszeit der V79-Zellen von etwa 12 h resultieren.

Scholz et al. berichtete von weniger stark ausgeprägten Zellzyklus-Verzögerungen nach Röntgenbestrahlung von V79-Zellen im Vergleich zur Schwerionenbestrahlung (10 MeV/u Pb-Ionen: LET = 13500 keV/ μ m). Auch erreichten die Zellen nach Röntgenbestrahlung die Mitose innerhalb von 24 h nach Bestrahlung. Dies war bis 48 h nach Schwerionen nicht für alle Zellen der Fall (Scholz et al. 1989).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit steigendem LET das Ausmaß der Arretierung in der G2/M-Phase zunahm. Die Bestrahlung im Bragg-Peak stellt eine Hoch-LET-Strahlung dar. Sie verursacht somit mehr und komplexere Schäden in der DNA. Dass die Monolayer nach dieser Hoch-LET-Strahlung länger im Arrest verblieben als nach der Niedrig-LET-Röntgenstrahlung, steht im Einklang mit dem verstärkten Reparaturbedürfnis der Zellen.

4.6 Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung

Bei der Untersuchung der Apoptoseinduktion mit Hilfe des TUNEL-Assays 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung konnten große Unterschiede zwischen den Arten der Kultivierung und der Bestrahlung der SiHa-Zellen festgestellt werden. So wies ein Teil der Monolayerpopulation 48 h und 72 h nach Röntgenbestrahlung eindeutig apoptotische Zellen auf, was jedoch bis 72 h nach Bestrahlung mit Schwerionen nicht der Fall war. Die Multilayer zeigten weder nach Röntgen- noch nach Schwerionenbestrahlung apoptotische Zellen. Bei einem Vergleich der Zeiten des Auftretens der Apoptose mit den Zeiten der Zellzyklus-Arreste nach Bestrahlung beobachtet man bei den SiHa-Monolayern erst zu der Zeit apoptotische Zellen, nachdem die Zellen vollständig aus dem G2/M-Arrest zurück in den Zellzyklus eintraten. Mit exakten Zahlen ausgedrückt: die Zellen waren 36 h nach der Röntgenbestrahlung wieder vollständig in den Zellzyklus eingetreten. Nach 24 h, zum Zeitpunkt des Maximums des G2/M-Arrestes, konnten keine, nach 48 h jedoch apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Das entspricht einer Zeitverzögerung von 12 h ausgehend vom vollständigen Wiedereintritt in den Zellzyklus und dem Nachweis der Apoptose. Nach Schwerionenbestrahlung dauerte der G2/M-Arrest der Monolayer länger. Da die Messung des Zellzyklus für die Monolayer nur bis 48 h nach Bestrahlung erfolgte, ist der Zeitpunkt nicht bekannt, an dem die Zellen wieder vollständig in den Zyklus eintraten. Vermutlich lag er frühestens bei 60 h. Der letzte Zeitpunkt für die Messung der Apoptose lag bei 72 h. Bis dahin waren keine apoptotischen Zellen nachweisbar. Gesteht man den Zellen die gleiche Zeitspanne für den Apoptose-Nachweis nach Wiedereintritt in den Zellzyklus zu wie nach Röntgen, hätten frühestens nach 72 h apoptotische Zellen gemessen werden können. Die SiHa-Multilayer verweilten weitaus länger (bis 96 h) im G2/M-Arrest. Es konnten demnach bis 72 h nach beiden Bestrahlungsmodalitäten keine apoptotischen Zellen beobachtet werden.

Huh et al. untersuchten bei SiHa-Zellen ebenfalls die Apoptoseinduktion mit dem TUNEL-Assay und fanden 72 h nach 4 Gy γ -Bestrahlung keine apoptotischen Zellen (Huh et al. 2003). Staab et al. fanden eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion bei V79-Sphäroiden (Staab et al. 2004). So ist es durchaus möglich, dass nach 4 Gy keine, dafür nach 8 Gy apoptotische SiHa-Zellen nachweisbar sind.

Prinzipiell sind SiHa-Zellen zur Apoptose fähig. Dies zeigten Behandlungen der Zellen mit Arsenitoxid (Deng et al. 2000), Eisen-Chelatoren (Simonart et al. 2002) oder Paclitaxel (Liu et al. 2001).

Wie schon erwähnt, ist das p53 bei den SiHa-Zellen nicht funktionell. Doch es existieren auch p53-unabhängige Apoptosewege. Bracey et al. fanden nach γ -Bestrahlung zweier Zelllinien (kolorektales Adenom bzw. Karzinom) mit nicht funktionalem p53, den Verlust des G1-Arrest,

aber dafür das Vorhandensein des G2/M-Arrestes mit einem Maximum bei 12-18 h. Mit Abklingen des Arrests stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen (Bracey et al. 1995). Die p53-unabhängige Apoptose trat 48-72 h nach der Bestrahlung ein (Bracey et al. 1997). Diese Angaben passen zu den in dieser Arbeit ermittelten Daten. Ausgehend von Untersuchungen von Raderschall et al. mit dem DNA-Reparaturprotein Rad51 wurde festgestellt, dass es so gut wie keine apoptotischen Zellen gibt, die Rad51-positiv sind. Die Rad51-Foci im Zellkern stellen ein Intermediat dar, das nach Vollendung der Homologen Reparatur (HR) verschwindet. Sie gehen davon aus, dass Rad51 nach DNA-Schädigung den Zellzyklus und die Apoptose blockiert, um die Reparatur der DNA-Schäden zu ermöglichen (Raderschall et al. 2002).

Doch Koivusalo et al. beobachteten bei SiHa-Zellen nach 5 Gy Bestrahlung (4 MeV Photonen) zeitabhängig eine Abnahme der E6-mRNA und einen gleichzeitigen Anstieg der p53-Reporteraktivität mit einem Maximum zwischen 36 und 48 h. Nach 72 h waren die Ausgangswerte wieder erreicht (Koivusalo et al. 2002).

Eine andere Arbeitsgruppe zeigte an SiHa-Zellen eine dosiabhängige Zunahme der Apoptose 72 h nach Bestrahlung. Auch sie beschrieben eine p53-Expression 24 h nach einer Dosis von 6 Gy (Huang et al. 2004). Möglicherweise bewirkte diese transiente p53-Aktivität eine Induktion der Apoptose.

4.7 Einfluss der Collagen-Beschichtung

Bei der Kultivierung der Multilayer ermöglichte die Collagen I-Beschichtung der Millicell-Membran die Adhäsion der Zellen. Cordes et al. beschrieben bei zwei Zelllinien des Lungenkarzinoms ein erhöhtes Überleben nach 240 kV-Röntgenbestrahlung, wenn die Zellen auf Fibronectin oder Laminin wuchsen (Cordes et al. 2002). Weiterhin zeigten Stevenson und Lange unterschiedliche Reaktionen der Zellen nach Röntgenbestrahlung in einem ECM-Gel. IMR-90-Fibroblasten überlebten im Collagen-Gel besser als auf Plastik, während V79-Zellen umgekehrt reagierten (Stevenson und Lange 1997).

Zur Überprüfung des Einflusses des Collagens auf das Überleben nach Bestrahlung bzw. Etoposid-Behandlung erfolgte die Einsaat der SiHa- und WiDr-Monolayer in Collagen I-beschichteten Kulturflaschen. Nach der Röntgenbestrahlung bzw. Etoposidbehandlung der frisch angefertigten Suspensionskulturen zeigten die Monolayerzellen mit oder ohne Collagen I-Beschichtung keinen Unterschied im Überleben. Somit sollte die Einsaat der Multilayer auf Collagen I im Vergleich zu den Monolayern keinen Einfluss auf das Überleben zeigen. Der Versuch der Kultivierung der Multilayer ohne Collagen scheiterte, da die Zellen keine Adhäsion auf der Membran zeigten und sich somit keine Multilayer entwickeln konnten.

4.8 Untersuchungen zu Rad51

Resistenzen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika treten teilweise bei dreidimensional wachsenden Sphäroiden auf, deren Monolayerzellen diese Eigenschaften nicht besitzen. Ein möglicher Mechanismus könnte ein verändertes DNA-Reparaturverhalten der Sphäroide sein. Maacke et al. beschrieben nach Western Blot-Analysen eine 5-fach höhere Rad51-Expression in Sphäroiden verglichen mit den Monolayern von Pankreaszellen (Maacke et al. 2000). Rad51 ist ein Schlüsselenzym im Proteinkomplex der homologen Rekombination (HR), eines Reparaturweges von DNA-Doppelstrangbrüchen. Rad51-überexprimierende Säugerzellen zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (Vispe et al. 1998). Weiterhin korreliert die Überexpression mit dem histologischen Grading von Tumoren (Maacke et al. 2000). Hansen et al. wiesen eine positive Korrelation zwischen dem Rad51-Proteinlevel und der zellulären Resistenz gegenüber Etoposid bei SCLC-Zellen nach (Hansen et al. 2003).

Die Untersuchung der strahlensensitiveren, aber Etoposid-resistenteren Multilayer verglichen mit den Monolayern sollte Auskunft über die Rad51-Expression geben. Sowohl der PCR-Nachweis als auch die Western Blot-Analyse zeigten keine Unterschiede zwischen den Kultivierungsmodalitäten auf. Differenzen gab es zwischen den verwendeten Zelllinien. So wiesen die WiDr-Zellen eine sehr starke Expression des Rad51-Proteins im Vergleich zu den SiHa-Zellen auf. Die Rad51-Expression gab somit keinen Hinweis auf das verschiedene Überleben der Zellen in Hinsicht auf ihre Kultivierung. Doch die hohe Proteinexpression der WiDr-Zellen korreliert gut mit der stark ausgeprägten Schulterform der WiDr-Überlebenskurven nach Bestrahlung. Im Gegenzug passt der sehr niedrige Rad51-Level der SiHa-Zellen zur fast exponentiell verlaufenden Überlebenskurve. Denn das Verschwinden der Schulter geht einher mit der verminderten Reparaturkapazität der Zellen. So war auch mit den SiHa-Zellen nach fraktionierter Bestrahlung nur ein geringes Reparaturverhalten zu beobachten.

Weyrather et al. zeigten an der NHEJ-defizienten Zelllinie xrs5 eine rein exponentielle Überlebenskurve nach Röntgenbestrahlung. Die Wildtyp-Zelllinie CHO-K1 hingegen wies eine ausgeprägte Schulterform auf (Weyrather et al. 1999). Auch sinkt die Reparaturkapazität der Zellen mit steigendem LET. Als Beispiel dienen hier die WiDr-Multilayer, deren Überlebenskurve ausgehend von der linear quadratischen Form nach Plateau-Bestrahlung in eine rein exponentielle Form nach Bragg-Peak-Bestrahlung überging.

Im Gegensatz zur NHEJ-Reparatur, die in allen Zyklusphasen erfolgt, läuft die homologe Rekombination nur in der S-Phase und G2-Phase ab (Willers et al. 2004). Nach Bestrahlung arretierten die SiHa-Zellen in der G2/M-Phase, in der also bevorzugt die Reparatur unter Beteiligung des Rad51-Proteinkomplexes stattfindet. Ein niedriger Rad51-Proteingehalt spricht demnach für eine geringe DNA-Reparatur, wie im Fall der SiHa-Zellen an der fehlenden Schulter der Überlebenskurve ersichtlich ist.

4.9 Migration

Über das Migrationsverhalten von Zellen nach ionisierender Bestrahlung gibt es bisher nur sehr wenige und sich widersprechende Veröffentlichungen. Hauptsächlich beziehen sie sich auf Endothelzellen. Abdollahi et al. untersuchten in einem Kokultur-Assay die Interaktion von Prostatakarzinomzellen und Endothelzellen. Durch die Bestrahlung der Tumorzellen erfolgte die Sekretion von VEGF und bFGF, die wiederum die Invasion der Endothelzellen steigerten (Abdollahi et al. 2003). Nuebel et al. ermittelten ein gesteigertes Adhäsionsverhalten von Tumorzellen auf bestrahlten Endothelzellen aufgrund gesteigerter Expression von E-Selektin auf dem Endothel (Nuebel et al. 2004). Annabi et al. beobachteten eine stimulierte Migration und Gefäßbildung der Endothelzellen nach Bestrahlung (Annabi et al. 2003). Diese drei Beispiele betrachten die Invasion der Tumorzellen in das Blutgefäßsystem. Allerdings muss sich die Tumorzelle davor bereits aus dem Zellverband des Primärtumors gelöst haben und in das umliegende Wirtsgewebe eingewandert sein. Wie die Tumorzellen jedoch auf die ionisierende Bestrahlung reagieren, ist bisher weniger gut untersucht. Eine Arbeit beschrieb dosisabhängig eine verstärkte Migration und Invasion von Gliomzellen 24 h nach Bestrahlung sowie eine erhöhte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Wild-Bode et al. 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe ermittelte mit der Lungenkrebszelllinie A549 24 h nach Röntgenbestrahlung bei 5 und 10 Gy ein vermindertes Wanderungsverhalten in der Boydenkammer mit gleichzeitig erhöhter Expression von E-Cadherin (Akimoto et al. 1998).

Die verursachten Schäden durch die Bestrahlung könnten die Zellen an einer Migration oder gar Metastasierung hindern oder aber auch begünstigen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zum Wanderungsverhalten fanden in Boydenkammern statt. Anders als beispielsweise bei Zeitraffer-Aufnahmen, wo man jede Zellbewegung verfolgt, kamen hier nur die Zellen zur Auswertung, die sich aktiv durch kleine Poren bewegten. Es fand zunächst die Untersuchung des allgemeinen Wanderungsverhaltens der beiden verwendeten Tumorkulturen statt. Dabei stellte sich heraus, dass die WiDr-Zellen im Gegensatz zu den SiHa-Zellen überhaupt keine Migration durch die Filter der Boydenkammern zeigten, weshalb für die folgenden Experimente nur die SiHa-Zellen zur Verfügung standen. Die Zellen aus den Multilayern wanderten weitaus weniger als die Zellen der Monolayer und zeigten auch wesentlich seltener Zellteilungen auf der gewanderten Filterseite. Nach Gegenüberstellung der dünn und dicht kultivierten Monolayer erwiesen sich Zellen aus den dicht kultivierten Monolayern, die sich in der Zellzyklusverteilung den Multilayern annäherten, als ebenso wenig migrationsfreudig wie die Zellen aus den Multilayern. Da bei den Multilayern der Anteil an G0/G1-Zellen sehr hoch ist, scheinen die Zellen in dieser Zyklusphase weniger zu migrieren.

Eine Arbeit untersuchte das Wanderungsverhalten in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen unabhängig von der Bestrahlung. Dabei zeigte sich bei drei verschiedenen Zelllinien eine stark verminderte Zellgeschwindigkeit in der G₂-Phase (Walmod et al. 2004).

Bei bestrahlten Monolayern war nach frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung (3 h bzw. 5 h) kein Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen auszumachen. Erst nach 24 h Inkubation nach 6 Gy Röntgenbestrahlung war eine Differenz in der Zellvitalität zu beobachten. So waren einige Zellkerne deformiert und Zellabschnürungen zu erkennen. Rechnet man zu den 24 h nach Bestrahlung noch die Migrationszeit hinzu, kommt man auf etwa 40 h. Bei dem Apoptosenachweis zeigten sich nach 8 Gy Röntgenbestrahlung ab 48 h apoptotische Zellen. Da der Test nur alle 24 h erfolgte, ist es gut möglich, dass bereits 40 h nach der Röntgenbestrahlung Zellen apoptotisch waren. Falls es zu einer Veränderung in der Anzahl der gewanderten Zellen kam, war dies ohne komplettes Auszählen der Filter nicht festzustellen. Die hier ermittelten Unterschiede zwischen Mono- und Multilayern bzw. unterschiedlich dicht kultivierten Monolayern waren makroskopisch und mikroskopisch gravierend.

Als Fazit dieser Experimente lässt sich zusammenfassen:

Bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen ist unbedingt auf identische Kultivierungsbedingungen zu achten. Jede Veränderung der Zellzahl und damit der Zellzyklusverteilung während der Kultivierung wirkt sich scheinbar sehr stark auf das Wanderungsverhalten der Zellen, zumindest der hier untersuchten SiHa-Zellen, aus. Es reicht nicht aus, mit identischen Splitfaktoren während des Passagierens zu arbeiten, sondern man sollte definierte Zellkonzentrationen einsäen.

Bei den Bestrahlungsversuchen zeichnete sich ab, dass die Boydenkammer nicht das alleinige Untersuchungssystem sein sollte. Es wurden Schäden an den bestrahlten Zellen festgestellt. Aus den bereits oben beschriebenen Untersuchungen bewirkt die Bestrahlung ein Ansteigen der Zellgröße. Im Boyden-Assay kommen nur die migrierten Zellen zur Auswertung. In wieweit sich die Zellvergrößerung nach Bestrahlung auf die Passage der Zellen durch 8 µm Poren auswirkt, ist bisher noch nicht untersucht. Für quantitative Aussagen muss vorher definiert werden, wie mit geschädigten Zellen verfahren wird. Werden sie mit gezählt oder von der Zählung ausgeschlossen? Fraglich ist zudem, welche Zellpopulation migriert. Wandern stark geschädigte Zellen, die aber nicht mehr in der Lage sind, Kolonien zu bilden oder die weniger geschädigten Zellen, die ihre Schäden reparieren und klonogen werden? Erst wenn eine Charakterisierung des Wanderungsverhaltens definierter bestrahlter Zellen z.B. mit Videoaufnahmen erfolgt ist, könnte der Übergang auf die quantitative Auswertung mit Hilfe der Boydenkammern erfolgen.

4.10 Ausblick

Die erzielten Resultate zeigen Multilayer als reproduzierbares Modellsystem zur strahlenbiologischen Charakterisierung menschlicher Tumorzellen in einem gewebeähnlichen, dreidimensionalen Verband. Dies gilt insbesondere für die Bestrahlung mit Schwerionen unter definierten Bedingungen. Da sich ähnliche Multilayersysteme auch aus Fibroblasten und anderen nicht-transformierten Zellen herstellen lassen, könnten solche Modellsysteme auch zur Untersuchung der Schwerionenwirkung auf Normalgewebe eingesetzt werden. Besonders interessant erscheinen auch Hetero-Multilayer unter Kokultivierung von Tumorzellen und Normalzellen. Solche Kulturen sollten systematische Studien zur Strahlenwirkung auf die Tumor-Stroma-Wechselwirkung ermöglichen. Die vorliegenden Untersuchungen könnten somit die Grundlage zu einer ganzen Reihe weiterführender Studien mit unmittelbarer klinischer Relevanz für die Radioonkologie sein.

5 Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen waren die Etablierung von planaren Multilayern aus menschlichen Tumorzellen und die Testung dieses Zellsystems als Bestrahlungsmodell solider Tumoren. Zum Einsatz kamen vor allem SiHa-Zervixkarzinomzellen und WiDr-Zellen aus dem Kolonkarzinom. Zum Vergleich wurden Teile der Experimente mit multizellulären Sphäroiden durchgeführt, die in der Strahlenonkologie als Referenzmodell anzusehen sind. Neben der konventionellen Röntgenbestrahlung (250 kV) als Referenzstrahlung wurde auch das Überleben nach Schwerionenbestrahlung ($^{12}\text{C}^{6+}$) und Etoposid-Behandlung untersucht. Immunhistochemische Färbungen (HE) der SiHa- und WiDr-Zellen zeigten einen ähnlichen Aufbau der Multilayer wie die Sphäroide. Mit der Wachstumszeit bildeten sich drei Zonen heraus. Die Proliferation der Zellen nahm mit zunehmender Entfernung von beiden gut versorgten Oberflächenzonen symmetrisch ab. Die Zellen gingen in die Ruhephase (G0) über, und es entstand schließlich eine zentrale nekrotische Schicht. Das Multilayersystem stellt im Vergleich zu den Monolayern ein in vivo-nahes Tumormodell dar, da Diffusionsgradienten, dreidimensionale Zellwechselwirkungen sowie der Übergang der Zellen in die Ruhephase mit eingehen. Die Multilayer erwiesen sich als besonders geeignet für Bestrahlungsversuche mit Schwerionen im Raster-Scan-Modus, da sich die dreidimensionalen Zellschichten fixiert auf einer Collagen-beschichteten Membran in einer Ebene senkrecht zur Einstrahlrichtung befinden. Der Schwerionenstrahl kann so über das gesamte Bestrahlungsfeld geführt werden, ohne dass sich die räumliche Lage der Multilayer während der Bestrahlung ändert. Außerdem gelang durch die Verwendung speziell entwickelter Küvetten die genaue Positionierung der Zellen im sogenannten Bragg-Peak, dem „Energiebrennpunkt“ des Schwerionenstrahls. Eine solche Anordnung erlaubte eine exakte und reproduzierbare Dosimetrie.

Multilayer und Sphäroide aus beiden Zelllinien zeigten ein geringeres Überleben nach Bestrahlung als die entsprechenden Monolayer. Die hier beschriebene multizelluläre Sensitivierung steht allerdings im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen multizellulären Resistenz der Sphäroide, dem sogenannten Kontakteffekt. Die multizelluläre Sensitivierung in der vorliegenden Studie war reproduzierbar und trat sowohl nach Röntgen- als auch nach Schwerionenbestrahlung auf. Die Untersuchung der Expression des DNA-Reparaturenzyms Rad51 brachte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen zum Vorschein. Es zeigten sich lediglich Differenzen zwischen den verwendeten Zelllinien mit einer stark ausgeprägten Rad51-Expression der WiDr-Zellen.

Nach durchflußzytometrischen Messungen arretierten die bestrahlten SiHa-Zellen in der G2/M-Phase. Im Gegensatz zum transienten Block der Monolayer verweilten die Multilayer in einem permanenten Arrest. Im Vergleich zur Röntgenbestrahlung verlängerte sich die Arrestzeit der

Monolayer nach Bragg-Peak-Bestrahlung um 12-24 h. Auch waren mehr Zellen betroffen. Im Gegensatz dazu war kein Unterschied zwischen beiden Bestrahlungsmodalitäten bei den Multilayern bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes zu verzeichnen. Die Untersuchungen zur Apoptoseinduktion der SiHa-Zellen lassen den Schluss zu, dass erst nach vollständigem Abklingen des G2/M-Arrests apoptotische Zellen nachweisbar waren.

Parallel zur Bestrahlung wurde das Überleben nach Etoposid-Behandlung untersucht. Dieses Chemotherapeutikum induziert ebenfalls wie die ionisierende Strahlung DNA-Doppelstrangbrüche. Hier waren die Multilayer deutlich resistenter als die Monolayer, d.h. es lag die in der Literatur beschriebene multizelluläre Resistenz vor. Somit zeigten Multilayer interessanterweise nach Bestrahlung eine Sensitivierung und nach Etoposidbehandlung eine Resistenz. Letztere erklärte sich nicht durch die Herausbildung der „klassischen“ Multi Drug Resistance der Multilayerzellen, da die Messung der P-Glycoproteinaktivität keine Unterschiede zwischen Mono- und Multilayern ergab.

Die Unterschiede im Überleben der beiden Kultivierungsformen beruhen wahrscheinlich auf den Differenzen in der Zellzyklusverteilung. Die Monolayer wiesen mehr den Zellzyklus durchlaufende Zellen auf als die Multilayer. So besaßen die Monolayer mehr Zellen in der S-Phase, welche als die strahlenresistenteste Phase bei Röntgenstrahlung gilt. Im Gegensatz dazu schädigte Etoposid proliferierende Zellen mehr als Zellen in der G0-Phase. Der Anteil an nicht-proliferierenden Zellen, ersichtlich am hohen Anteil an G0/G1-Zellen und an der Immunfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67, ist in Multilayern höher als in Monolayern. Besonders deutlich wurde dieser Zusammenhang des Überlebens und der Zellzyklusverteilung durch Wiederaussaat- und Synchronisations-Experimente. Eine 10-fach dichtere Einsaat der Monolayer bewirkte eine Annäherung der Zellzyklusverteilung an die der Multilayer. Damit war einerseits ein geringeres Überleben nach Bestrahlung und andererseits ein besseres Überleben nach Etoposid-Behandlung verbunden.

Diese Befunde spiegeln zellzyklusabhängige Variationen in der Wirksamkeit von Schwerionen wieder. Zum anderen lassen die Daten Unterschiede in der Zellzyklusempfindlichkeit zwischen Schwerionen und Etoposid erkennen.

Die Differenzen im Überleben zwischen Mono- und Multilayern zeigten sich sowohl nach Röntgen- als auch nach Schwerionenbestrahlung. Das Überleben nach Plateau-Bestrahlung entsprach etwa der nach Röntgenbestrahlung mit RBW-Werten von 1,0-1,1 bzw. 1,0. Für beide Kultivierungsbedingungen erwies sich die Bragg-Peak-Bestrahlung mit RBW-Werten von 1,9-2,2 als effizienter. Die multizelluläre Sensitivierung der hier untersuchten Zelllinien SiHa und WiDr wirkt sich aus Sicht der Strahlentherapie positiv aus, da sie zu einer verbesserten Tumorkontrolle führen sollte.

6 Literaturverzeichnis

Abdollahi, A., Lipson, K. E., Han, X., Krempien, R., Trinh, T., Weber, K. J. et al. SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. *Cancer Res.* 63 (13), 3755-3763, 2003.

Abend, M. und van Beuningen, D. Significance of apoptotic processes in radiotherapy. Part I. *Strahlenther. Onkol.* 174 (3), 156-166, 1998.

Akimoto, T., Mitsuhashi, N., Saito, Y., Ebara, T. und Niibe, H. Effect of radiation on the expression of E-cadherin and alpha-catenin and invasive capacity in human lung cancer cell line in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 41 (5), 1171-1176, 1998.

Annabi, B., Lee, Y. T., Martel, C., Pilorget, A., Bahary, J. P. und Beliveau, R. Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol. Ther.* 2 (6), 642-649, 2003.

ATCC. American Type Culture Collection. *Internet Communication:*
<http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/descat1.html>. 2004.

Bischof, M., Huber, P., Stoffregen, C., Wannemacher, M. und Weber, K. J. Radiosensitization by pemetrexed of human colon carcinoma cells in different cell cycle phases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57 (1), 289-292, 2003.

Bohr, V. A., Phillips, D. H. und Hanawalt, P. C. Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.* 47 (24 Pt 1), 6426-6436, 1987.

Bracey, T. S., Miller, J. C., Preece, A. und Paraskeva, C. Gamma-radiation-induced apoptosis in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines can occur in the absence of wild type p53. *Oncogene* 10 (12), 2391-2396, 1995.

Bracey, T. S., Williams, A. C. und Paraskeva, C. Inhibition of radiation-induced G2 delay potentiates cell death by apoptosis and/or the induction of giant cells in colorectal tumor cells with disrupted p53 function. *Clin. Cancer Res.* 3 (8), 1371-1381, 1997.

- Chapuis, J. C., Keng, P. C. und Siemann, D. W. Activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26) in exponential and plateau phase human tumor cell cultures. *Anticancer Drugs* 3 (3), 245-252, 1992.
- Cordes, N., Blaese, M. A., Meineke, V. und van Beuningen, D. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 78 (5), 347-357, 2002.
- Cowan, D. S., Hicks, K. O. und Wilson, W. R. Multicellular membranes as an in vitro model for extravascular diffusion in tumours. *Br. J. Cancer Suppl* 27, S28-S31, 1996.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H. und Robinson, J. Monitoring of Cellular Resistance to Cancer Chemotherapy: Drug Retention and Efflux. *Cytometry* (Kapitel 40, 193-209), 3. , Part A, Academic Press, 2001.
- Deng, Y., Lin, C., Zheng, J., Fu, M., Liang, X., Chen, J. et al. Overexpression of Bcl-2 partly inhibits apoptosis of human cervical cancer SiHa cells induced by arsenic trioxide. *Chin Med. J. (Engl.)* 113 (1), 84-88, 2000.
- Deutsche Krebshilfe. *Internet Communication*: <http://www.krebshilfe.de/neu/>. 2004.
- Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. Krebsinformationsdienst. *Internet Communication*: <http://www.krebsinformation.de/>. 2004.
- Durand, R. E. Oxygen enhancement ratio in V79 spheroids. *Radiat. Res.* 96 (2), 322-334, 1983.
- Durand, R.E. und Olive, P.L. Resistance of Tumor Cells to Chemo- and Radiotherapy Modulated by the Three-Dimensional Architecture of Solid Tumors and Spheroids. *Cytometry* (Kapitel 41, 211-233), 3., Academic Press, 2001.
- Durand, R. E. und Sutherland, R. M. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp. Cell Res.* 71 (1), 75-80, 1972.
- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. und zur, H. H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80 (12), 3812-3815, 1983.

ECACC. European Collection of Cell Cultures. *Internet Communication*:

<http://www.ecacc.org.uk/>. 2004.

Erbar, P. Onkologie Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2000.

Freyer, J. P. Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids. *J. Cell Physiol* 176 (1), 138-149, 1998.

Freyer, J. Spheroids in radiobiology. In: Bjerkvig, R.: *Multicell Spheroids* (Kapitel , 217-275CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. und Stein, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133 (4), 1710-1715, 1984.

Goretzki, G. Medizinische Strahlenkunde: Physikalische-Technische Grundlagen. Urban & Schwarzenberg, 1987.

Gruninger, L., Cottin, E., Li, Y. X., Noel, A., Ozsahin, M. und Coucke, P. A. Sensitizing human cervical cancer cells In vitro to ionizing radiation with interferon beta or gamma. *Radiat. Res.* 152 (5), 493-498, 1999.

GSI. Wo schwere Ionen herkommen. *Internet Communication*:

<http://www.gsi.de/portrait/Broschueren/Wunderland/10.html>. 2003.

GSI. Grundriss Beschleunigeranlage der GSI. *Internet Communication*:

<http://www.gsi.de/documents/DOC-2004-Mar-196-1.pdf>. 2004.

Haberer, T., Becher, W., Schardt, D. und Kraft, G. Magnetic scanning system for heavy ion therapy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 330, 296-305, 1993.

Hall, E.J. Radiobiology for the radiologist. second edition, Harper & Row, 1978.

Hamilton, G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett.* 131 (1), 29-34, 1998.

- Hande, K. R. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1-3), 173-184, 1998.
- Hansen, L. T., Lundin, C., Spang-Thomsen, M., Petersen, L. N. und Helleday, T. The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 105 (4), 472-479, 2003.
- Hermann, T. und Baumann, M. Klinische Strahlenbiologie - kurz und bündig -. 1997.
- Hlatky, L., Alpen, E. L. und Yee, M. K. Differences in the X-ray sensitivity of cells in different regions of the sandwich, a diffusion-limited system for cell growth. *Radiat. Res.* 108 (1), 62-73, 1986.
- Hofman-Huether, H., Scholz, M., Rave-Frank, M. und Virsik-Kopp, P. Induction of reproductive cell death and chromosome aberrations in radioresistant tumour cells by carbon ions. *Int. J. Radiat. Biol.* 80 (6), 423-435, 2004.
- Hofman-Hüther, H. Wirkung schwerer Ionen auf strahlenresistente und strahlensensitive Tumorzellen. Dissertation der *Univerität Göttingen*, 2002.
- Holder, J. W., Elmore, E. und Barrett, J. C. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* 53 (15), 3475-3485, 1993.
- Huang, H., Huang, S. Y., Chen, T. T., Chen, J. C., Chiou, C. L. und Huang, T. M. Cisplatin restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV16 E6 containing SiHa cells. *J. Cell Biochem.* 91 (4), 756-765, 2004.
- Huh, J. J., Wolf, J. K., Fightmaster, D. L., Lotan, R. und Follen, M. Transduction of adenovirus-mediated wild-type p53 after radiotherapy in human cervical cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 89 (2), 243-250, 2003.
- Jain, R. K. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 271 (1), 42-49, 1994.
- Jenner, T. J., Cunniffe, S. M., Stevens, D. L. und O'Neill, P. Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation. *Radiat. Res.* 150 (5), 593-599, 1998.

Jenner, T. J., Fulford, J. und O'Neill, P. Contribution of base lesions to radiation-induced clustered DNA damage: implication for models of radiation response. *Radiat. Res.* 156 (5 Pt 2), 590-593, 2001.

Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H. und van Gent, D. C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 8 (12), 483-489, 1998.

Karger, C., Jaeckel, O., Heeg, P. und Hartmann, G. Clinical Dosimetry for Heavy Ion Therapy. *Zeitschrift für Medizinische Physik* 12 (3), 159-169, 2002.

Kartner, N. und Ling, V. Multidrug resistance in cancer. *Sci. Am.* 260 (3), 44-51, 1989.

Kauffmann, G., Moser, E. und Sauer, R. Radiologie. 2. erw. Auflage, Urban & Fischer, 2001.

Kawano, K., Iwamura, T., Yamanari, H., Seo, Y., Suganuma, T. und Chijiwa, K. Establishment and characterization of a novel human pancreatic cancer cell line (SUIT-4) metastasizing to lymph nodes and lungs in nude mice. *Oncology* 66 (6), 458-467, 2004.

Khanna, K. K. und Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27 (3), 247-254, 2001.

Kiefer, J. Biologische Strahlenwirkung. Springer, Heidelberg, 1981.

Koivusalo, R., Krausz, E., Ruotsalainen, P., Helenius, H. und Hietanen, S. Chemoradiation of cervical cancer cells: targeting human papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer Res.* 62 (24), 7364-7371, 2002.

Konerding, M. A., Fait, E. und Gaumann, A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br. J. Cancer* 84 (10), 1354-1362, 2001.

Kraft, G. Radiotherapy with Heavy Ions: Radiobiology, Clinical Indications and Experience at GSI, Darmstadt. *Estratto da TUMORI* 84 (2 -March-April 1998), 200-204, 1998.

Kraft, G. Tumorthrapy with ion beams. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 454, 1-10, 2000.

- Kraft, G, Kraft-Weyrather, W, Taucher-Scholz, G und Scholz, M. What kind of radiobiology should be done at a hadrontherapy centre? *Advances in Hadrontherapy, second international Symposium on Hadrontherapy, 1997. Elsevier 1997.*
Conference Proceeding
- Kraft, G. The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions. *Strahlenther. Onkol.* 166 (1), 10-13, 1990.
- Kraft, G., Scholz, M. und Bechthold, U. Tumor therapy and track structure. *Radiat. Environ. Biophys.* 38 (4), 229-237, 1999.
- Krishan, A. Monitoring of Cellular Resistance to Cancer Chemotherapy: Drug Retention and Efflux. *Cytometry* (Kapitel 40, 193-209), 3. Ausgabe, Academic Press, 2001.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. und Kastan, M. B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 (16), 7491-7495, 1992.
- Kunz, L.A.I. Charakterisierung ras-transformierter Tumorzellen in Monolayer- und Sphäroid-Kultur. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz, 1992.
- Kwok, T. T. und Sutherland, R. M. The influence of cell-cell contact on radiosensitivity of human squamous carcinoma cells. *Radiat. Res.* 126 (1), 52-57, 1991.
- Lang, A. J., Mirski, S. E., Cummings, H. J., Yu, Q., Gerlach, J. H. und Cole, S. P. Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene* 221 (2), 255-266, 1998.
- Liu, B., Fang, M., Lu, Y., Lu, Y., Mills, G. B. und Fan, Z. Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells. *Br. J. Cancer* 85 (2), 303-311, 2001.
- Lucke-Huhle, C., Blakely, E. A., Chang, P. Y. und Tobias, C. A. Drastic G2 arrest in mammalian cells after irradiation with heavy-ion beams. *Radiat. Res.* 79 (1), 97-112, 1979.
- Luo, C., Johnston, P. J., MacPhail, S. H., Banath, J. P., Oloumi, A. und Olive, P. L. Cell fusion studies to examine the mechanism for etoposide resistance in Chinese hamster V79 spheroids. *Exp. Cell Res.* 243 (2), 282-289, 1998.

Luo, C., MacPhail, S. H., Dougherty, G. J., Naus, C. C. und Olive, P. L. Radiation response of connexin43-transfected cells in relation to the "contact effect". *Exp. Cell Res.* 234 (2), 225-232, 1997.

Maacke, H., Jost, K., Opitz, S., Miska, S., Yuan, Y., Hasselbach, L. et al. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 19 (23), 2791-2795, 2000.

Mansbridge, J. N., Knuchel, R., Knapp, A. M. und Sutherland, R. M. Importance of tyrosine phosphatases in the effects of cell-cell contact and microenvironments on EGF-stimulated tyrosine phosphorylation. *J. Cell Physiol* 151 (3), 433-442, 1992.

Matsui, Y., Asano, T., Kenmochi, T., Iwakawa, M., Imai, T. und Ochiai, T. Effects of carbon-ion beams on human pancreatic cancer cell lines that differ in genetic status. *Am. J. Clin. Oncol.* 27 (1), 24-28, 2004.

Minchinton, A. I., Wendt, K. R., Clow, K. A. und Fryer, K. H. Multilayers of cells growing on a permeable support. An in vitro tumour model. *Acta Oncol.* 36 (1), 13-16, 1997.

Mueller-Klieser, W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 (2), 101-122, 1987.

Mueller-Klieser, W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 36 (2-3), 123-139, 2000.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. *Internet Communication:* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 2004.

Neuro Probe. Neuro Probe. *Internet Communication:* http://www.neuroprobe.com/products/in_ap48.html. 2004.

Newman, H. C., Prise, K. M. und Michael, B. D. The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (8), 1085-1093, 2000.

- Nubel, T., Dippold, W., Kaina, B. und Fritz, G. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis* 25 (8), 1335-1344, 2004.
- Ofuchi, T., Suzuki, M., Kase, Y., Ando, K., Isono, K. und Ochiai, T. Chromosome breakage and cell lethality in human hepatoma cells irradiated with X rays and carbon-ion beams. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 40 (2), 125-133, 1999.
- Olive, P. L., Banath, J. P. und Evans, H. H. Cell killing and DNA damage by etoposide in Chinese hamster V79 monolayers and spheroids: influence of growth kinetics, growth environment and DNA packaging. *Br. J. Cancer* 67 (3), 522-530, 1993.
- Olive, P. L. und Durand, R. E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* 13 (2), 121-138, 1994.
- Olive, P. L. und MacPhail, S. H. Radiation-induced DNA unwinding is influenced by cell shape and trypsin. *Radiat. Res.* 130 (2), 241-248, 1992.
- Oloumi, A., Lam, W., Banath, J. P. und Olive, P. L. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Biol.* 78 (6), 483-492, 2002.
- Raderschall, E., Bazarov, A., Cao, J., Lurz, R., Smith, A., Mann, W. et al. Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J. Cell Sci.* 115 (Pt 1), 153-164, 2002.
- Raff, T., van der, G. M., Endemann, D., Wiederholt, T. und Paul, M. Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques* 23 (3), 456-460, 1997.
- Reddy, N. M., Cieszka, K. A., Rozenblyum, S. und Lange, C. S. Is there a cell-to-cell contact effect on the X-ray dose-survival response of mammalian cells? *Scanning Microsc.* 8 (3), 621-628, 1994.
- Reich, H. Dosimetrie ionisierender Strahlung - Grundlagen und Anwendungen. B. G. Teubner, Stuttgart, 1990.

- Robert, J. und Larsen, A. K. Drug resistance to topoisomerase II inhibitors. *Biochimie* 80 (3), 247-254, 1998.
- Romeis, B. Mikroskopische Technik. 17. neubearb., Urban & Schwarzenberg, München, 1989.
- Sarkar, R. An Introduction to X-ray dosimetry. *Biophysik, GSI, Darmstadt*, 2003.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. und Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (6), 1129-1136, 1990.
- Scholz, M. Heavy ion tumour therapy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 161-163, 76-82, 2000.
- Scholz, M., Kraft-Weyrather, W., Ritter, S. und Kraft, G. Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *Adv. Space Res.* 9 (10), 91-96, 1989.
- Simonart, T., Boelaert, J. R., Mosselmans, R., Andrei, G., Noel, J. C., De Clercq, E. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* 85 (1), 95-102, 2002.
- Sinclair, W. K. Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat. Res.* 33 (3), 620-643, 1968.
- Staab, A., Zukowski, D., Walenta, S., Scholz, M. und Mueller-Klieser, W. Response of Chinese hamster v79 multicellular spheroids exposed to high-energy carbon ions. *Radiat. Res.* 161 (2), 219-227, 2004.
- Stevenson, A. F. und Lange, C. S. Extracellular matrix (ECM) and cytoskeletal modulation of cellular radiosensitivity. *Acta Oncol.* 36 (6), 599-606, 1997.
- Sullivan, D. M., Glisson, B. S., Hodges, P. K., Smallwood-Kentro, S. und Ross, W. E. Proliferation dependence of topoisomerase II mediated drug action. *Biochemistry* 25 (8), 2248-2256, 1986.
- Sutherland, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240 (4849), 177-184, 1988.

Terasimat, T. und Tolmach, L. J. Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle. *Biophys. J.* 3, 11-33, 1963.

Tobias, C. A., Blakely, E. A., Alpen, E. L., Castro, J. R., Ainsworth, E. J., Curtis, S. B. et al. Molecular and cellular radiobiology of heavy ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8 (12), 2109-2120, 1982.

Toxikologie der Universität Mainz. Facs-Prinzip. *Internet Communication*:
<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>. 2004.

Verheij, M. und Bartelink, H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301 (1), 133-142, 2000.

Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C. und Defais, M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* 26 (12), 2859-2864, 1998.

Walmod, P. S., Hartmann-Petersen, R., Prag, S., Lepekhn, E. L., Ropke, C., Berezin, V. et al. Cell-cycle-dependent regulation of cell motility and determination of the role of Rac1. *Exp. Cell Res.* 295 (2), 407-420, 2004.

West, C. M., Keng, P. C. und Sutherland, R. M. Growth phase related variation in the radiation sensitivity of human colon adenocarcinoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 14 (6), 1213-1219, 1988.

West, C. M. und Sutherland, R. M. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat. Res.* 112 (1), 105-115, 1987.

Weyrather, W. K., Ritter, S., Scholz, M. und Kraft, G. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (11), 1357-1364, 1999.

Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J. und Wick, W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 61 (6), 2744-2750, 2001.

Willers, H., Dahm-Daphi, J. und Powell, S. N. Repair of radiation damage to DNA. *Br. J. Cancer* 90 (7), 1297-1301, 2004.

Wilson, W. R., Pullen, S. M., Hogg, A., Helsby, N. A., Hicks, K. O. und Denny, W. A.
Quantitation of bystander effects in nitroreductase suicide gene therapy using three-dimensional cell cultures. *Cancer Res.* 62 (5), 1425-1432, 2002.

Zukowski, D. Charakterisierung der strahlenbiologischen Wirkungen beschleunigter Kohlenstoffionen auf multizelluläre V79 Sphäroide. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz, 1999.

7 Anhang

7.1 Anhang A – Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
Bisacrylamid	N, N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Diethyl-Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	copy DNA
DSB	Doppelstrangbruch
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FK	feuchte Kammer
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
LET	linearer Energietransfer
min	Minute
Mono	Monolayer
ML	Multilayer
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
NHEJ	Non Homologous End Joining (nicht homologe Endverknüpfung)
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	plating efficiency (Koloniebildungsfähigkeit)
PI	Propidiumiodid
PFA	Paraformaldehyd
RBW	relative biologische Wirksamkeit

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIS	Schwerionensynchrotron
Sph	Sphäroid
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
SSB	single strand break (Einzelstrangbruch)
TdT	Terminale Desoxy-Nukleotid-Transferase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling

7.2 Anhang B – Tabellen

Tab. 1: Auflistung der Wachstumsfläche mit den dazu gehörigen Volumenangaben

Wachstumsfläche	Trypsinmenge	Gesamtvolumen
12,5 cm ²	0,5 ml	3 ml
25 cm ²	1 ml	5 ml
75 cm ²	2 ml	10 ml

Tab. 2: Zelllinien-spezifische Bedingungen zur Zellablösung

Zelllinie	Hanks- EDTA-Puffer	Trypsineinwirkung
SiHa	1 x Spülen	2 min
WiDr	2 x Spülen	3 min

Tab. 3: Färbeprotokoll für die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)

Substanz	Zeit
Aqua dest.	kurz Eintauchen
Mayer's Hämalaun	45-60 sec
3 x Leitungswasser	Eintauchen bis keine blaue Schlieren mehr

Aqua dest.	kurz Eintauchen
Eosin	10 sec
3 x Aqua dest.	kurz Eintauchen
70 % Isopropanol	kurz Eintauchen
80 % Isopropanol	kurz Eintauchen
96 % Isopropanol	kurz Eintauchen
100 % Isopropanol	kurz Eintauchen
100 % Isopropanol	5 min
3 x Xylol	5 min
Entelan	Eindeckeln

Tab. 4: Ki-67-Färbung

Schritt	Substanz	Zeit
Waschen	TBS-Puffer	1 min
	0,05 % Saponin / TBS-Puffer Objekträger abklopfen und außerhalb der Fettstiftumrandung trocken wischen	1 min
Auftrag des Ki-67-AK	1:50-Verdünnung in Verdünnungspuffer	1 h, RT, FK
Waschen	TBS-Puffer	1 min
	0,05 % Saponin / TBS-Puffer Objekträger abklopfen und außerhalb der Fettstiftumrandung trocken wischen	1 min
Auftrag Sekundär-AK (Peroxidase-gekoppelt)	direkt aus Tropfflasche	30 min, RT, FK
Waschen	TBS-Puffer	1 min
	0,05 % Saponin / TBS-Puffer Objekträger abklopfen und außerhalb der Fettstiftumrandung trocken wischen	1 min
Auftrag des DAB ⁺	1 Tropfen in 500 µl Substratpuffer (max. 1 Woche bei 4 °C haltbar)	5-8 min, RT, FK
Waschen	TBS-Puffer	10 s
	Leitungswasser	10 s
	Aqua dest.	10 s
Gegenfärbung mit Hämatoxylin	Aqua dest.	kurz Eintauchen
	Mayer's Hämalaun	45-60 s
	3 x Leitungswasser	kurz Eintauchen
	Aqua dest.	kurz Eintauchen
	70 % Isopropanol	kurz Eintauchen
	80 % Isopropanol	kurz Eintauchen
	96 % Isopropanol	kurz Eintauchen
100 % Isopropanol	kurz Eintauchen	

	100 % Isopropanol 3 x Xylol Entelan	5 min 5 min Eindeckeln
--	---	------------------------------

Tab. 5: Filterangaben des Durchflußzytometers

Fluoreszenz	Bandpassfilter	Farbstoff-Beispiel
FL 1	525 nm (505-545 nm)	FITC
FL 2	575 nm (560-590 nm)	PE
FL 3	620 nm (605-635 nm)	PI

Tab. 6: TUNEL-Färbung für Durchflußzytometer

(Zentrifugation zwischen Waschschritten bei 1600 rpm)

Schritt	Substanz	Zeit
Überführung von 1×10^6 Zellen in Facs-Röhrchen (Proben + eine Positiv- und Negativkontrolle)		
3 x Waschen	PBS	
Fixierung	1 ml 2%ige PFA-Lösung	1 h, RT
Zentrifugation		1600 rpm, 8 min
1 x Waschen	2 ml PBS	
Permeabilisierung	1 ml 1%ige Natriumcitrat in 1%iger Triton-X100-Lösung	2 min, auf Eis
Zentrifugation		1600 rpm, RT
2 x Waschen	2 ml PBS	
DNase-Behandlung Positivkontrolle: Negativkontrolle und Proben:	100 µl DNase-Lösung 100 µl PBS	10 min, RT
2 x Waschen	2 ml PBS	
Tunel-Reaktion Negativkontrolle: Proben und Positivkontrolle:	50 µl Labelsolution 50 µl Tunel-Reaktionsmix	1 h, Brutschrank
2 x Waschen	2 ml PBS	
Aufnahme der Zellen	500 µl PBS	
Messung am Durchflußzytometer FITC-Parameter (488 /515-565 nm)		

Tab. 7: Reverse Transkriptase-Mix 1:

Substanz	Stammkonzentration	Reaktionsansatz (30 µl)
RNA	je nach Probe	1 µg
Random hexamers	10 pmol/µl	5 µl
H ₂ O _{DEPC}		ad 10 µl

Tab. 8: Reverse Transkriptase-Mix 2:

Substanz	Stammkonzentration	Reaktionsansatz (30 µl)
MgCl ₂	25 mM	6 µl
10x Puffer	10x	3 µl
RNasin	40 U/µl	1 µl
MuLV-RT	50 U/µl	3 µl
dNTPs	je 10 mM	3 µl
H ₂ O _{DEPC}		4 µl
		Σ 20 µl

Tab. 9: Primer für die PCR-Reaktionen

Nachweis	Amplifikat	Primer	Sequenz 5'-3'
rad51	421 bp	Rad51-F2	5' CAA ATG CAG ATA CTT CAG TGG 3'
		Rad51-R4	5' GTC AAT GGG AAG CTG GCA G 3'
β-Aktin*	626 bp	OPBA-F	5' CCT CGC CTT TGC CGA TCC 3'
		OPBA-R	5' GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC 3'

*(Raff et al. 1997)

Tab. 10: PCR-Mix

Substanz	Stammkonzentration	Reaktionsansatz (25 µl)
MgCl ₂	25 mM	2,5 µl
10x Puffer	10x	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Taq-Polymerase		0,5 µl
Aktin-Primer OPBA-F1 / -R1	10 pmol/µl	1 / 1 µl
Rad51-Primer F2 / R4	10 pmol/µl	1 / 1 µl
cDNA 1:10		1 µl
H ₂ O		ad 25 µl

Tab. 11: Cyclex-Programm für die Endpunkt-PCR

Temperatur	Zeit	
94 °C	3 min	
94 °C	30 s	} 34 Zyklen
60 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	
4 °C		bis zur Entnahme

Tab. 12: Cycler-Programm für die semiquantitative PCR

Temperatur	Zeit		
94 °C	5 min		
94 °C	30 s	} 19 Zyklen	
60 °C	1 min		
72 °C	30 s		
72 °C	7 min		
4 °C		bis zur Entnahme	
94 °C	3 min		} 5 Zyklen
94 °C	30 s	} 3 Zyklen	
60 °C	1 min		
72 °C	30 s		
72 °C	7 min		
4 °C		bis zur Entnahme	

Tab. 13: Rezeptur für das 10%ige SDS-Trenngel

Substanz	Menge
Aqua dest.	3,84 ml
1,5 M Tris / HCl pH 8,8	2 ml
10 % SDS	80 µl
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	2 ml
10 % APS	40 µl
Temed	4 µl

Tab. 14: Rezeptur für das 5%ige SDS-Sammelgel

Substanz	Menge
Aqua dest.	2,22 ml
1 M Tris / HCl pH 6,8	380 µl
10 % SDS	30 µl
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	380 µl
10 % APS	30 µl
Temed	3 µl

Tab. 15: Primär-Antikörper (Western Blot)

Antikörper	Spezies	Einsatz	Quelle
Anti-Rad51 (Ab-1)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Oncogene (PC130)
Anti-Tubulin (Klon B-5-1-2)	Maus IgG1, monoklonal	1:4000	Sigma (T5168)

Tab. 16: Sekundär-Antikörper (Western Blot)

Antikörper	Spezies	Einsatz	Quelle
Anti-Maus	Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	1:1000	Sigma (A9044)
Anti-Kaninchen	Esel, Peroxidase-gekoppelt	1:2000	Amersham (NA934)

Tab. 17: Antikörper der Immunhistologie

Antikörper	Spezies	Einsatz	Quelle
Anti-Ki67 (MIB-1)	Maus, monoklonal	1:50	Dako (M7240)
Envision Anti-Maus	Ziege, Peroxidase-gekoppelt	unverd.	Dako (K4000)

7.3 Anhang C – Puffer und Lösungen

Blockierlösung (Western Blot)

5 % Milchpulver in TBST

Collagen I-Stammlösung

50 mg Collagen I-Lyophilisat (Sigma C7661) mit 5 ml 60 % Ethanol und 50 µl 1 M HCl versetzen und mit Hilfe des Ultraschallstabes lösen. Diese Stammlösung enthält 10 mg/ml und wird bei -20 °C gelagert.

Collagen I-Gebrauchslösung

Versetzen von 1 ml Stammlösung (bei -20 °C zähflüssig, bei Raumtemperatur verflüssigen lassen) mit 5,66 ml 60 % Ethanol (entspricht 1,5 mg/ml)

Lagerung bei 4°C

Daunorubicin-Stammlösung

Lösen von 5 mg Daunorubicin (M = 563 g/mol) in 88,8 ml Aqua dest. (entspricht 0,1 mM)

Einsatz: 200 µl (0,1 mM) auf 5 ml Medium = 4 µM

Lagerung bei -20°C

DEPC-Wasser (H₂O_{DEPC})

Einsatz von DEPC als Nuclease-Inhibitor als 0,1 % Lösung

1 ml DEPC auf 1000 ml H₂O über Nacht Schütteln bzw. Rühren

Autoklavieren und dann verwenden

(DEPC zerfällt in wässriger Lösung zu Ethanol und CO₂)

Elektrophorese-Puffer für SDS-Gele

für 1000 ml 5 x		
25 mM	Tris	15,1 g
250 mM	Glycin	94 g
0,1 %	SDS	50 ml 10 % SDS

Entfärbelösung für Coomassie-gefärbte SDS-Gele

200 ml Methanol

35 ml Essigsäure

ad 500 ml Aqua dest.

Etoposid-Stammlösung

25 mg Etoposid in 1 ml DMSO lösen

Lagerung: dunkel bei RT

Gelatine-Stammlösung (10 x)

100 ml Aqua dest.

120 µl Eisessig

100 mg Gelatine 60 min bei 60 °C lösen (mit Thermometerkontrolle)

a' 10 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern

Gelatine-Gebrauchslösung

10 ml der Gelatine-Stammlösung in 90 ml Aqua dest. Verdünnen und 5 min Rühren

Hanks-EDTA-Puffer (ohne Mg²⁺/Ca²⁺)

		für 1000 ml	für 2000 ml
136,9 mM	NaCl	8 g	16 g
5,36 mM	KCl	0,4 g	0,8 g
0,28 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,05 g	0,1 g
0,4 mM	KH ₂ PO ₄	0,06 g	0,12 g
27,43 mM	HEPES	3,57 g	7,14 g

in Aqua dest. Lösen und pH von 7,2-7,4 Einstellen

Autoklavieren

vor Gebrauch Komplettieren pro 500 ml mit 4,75 g EDTA und 0,5 g Glucose

Hitzeinaktivierung des Cosmic Calf Serum

Auftauen bei 4 °C über Nacht, Rest Auftauen bei RT, Erwärmen auf 37 °C im Wasserbad mit hohem Füllstand und Referenzflasche mit Thermometer, Inaktivierung für 30 min bei 56°C, Abkühlen und Portionieren a' 50 ml-Röhrchen, Lagerung -20 °C

Ladepuffer für Agarose-Gele

0,25 % Bromphenolblau

40 % Saccharose

1:2 in TBE-Puffer Mischen

Methylenblau-Stammlösung (3 %)

3 g Methylenblau auf 100 ml Aqua dest., Filtrierung über Faltenfilter

Methylenblau-Färbelösung (0,3 %)

1:10-Verdünnung der Methylenblau-Stammlösung in Aqua dest.

2 % Paraformaldehyd-Lösung

2 g Paraformaldehyd (PFA) in 50 ml 1 x PBS pH 7,4 in einem 50ml-Röhrchen im Wasserbad bei etwa 70 °C Lösen

Aliquots bei -20°C lagern (entsprechen 4 %)

Für Einsatz mit gleichem Volumen PBS Verdünnen = 2 %

PBS (pH 7,2)

für 1000 ml 10 x

136,7 mM	NaCl	80 g
2,68 mM	KCl	2 g
1,47 mM	KH ₂ PO ₄	2 g
8,09 mM	Na ₂ HPO ₄	11,5 g

Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2

Verdünnung von 1 ml in 10 ml Aqua dest.

Lagerung: portioniert bei -20 °C

Propidium-Iodid-Färbelösung

	1 x
PBS mit 0,5 % Glucose	1 ml
RNase A (100 mg/ml)	2 mg = 20 µl
PI (1 mg/ml)	50 µl

Protease-Inhibitor Cocktail

Lösen des Lyophilisats in 10 ml Aqua dest.

Lagerung: portioniert bei -20°C

Propidium-Iodid-Stammlösung

1 mg/ml PI in Aqua dest. lösen

Lagerung: dunkel bei 4°C

RIPA-Puffer

20 ml 5 x PBS
 1 ml NP40 (Tergitol) (= 1 %)
 100 µl 10 x SDS (= 0,01 %)
 0,5 g Natriumdesoxycholat (= 0,5 %)
 ad 100 ml Aqua dest.

5 x PBS

NaH₂PO₄ 6,279 g
 Na₂HPO₄ 1,51 g
 NaCl 44,15 g
 pH 7,4
 ad 1000 ml Aqua dest.

RNase A-Lösung (DNase-frei)

100 mg Lyophilisat in 1 ml RNase-Puffer lösen

Lagerung: portioniert bei -20 °C (bis 2 Jahre haltbar)

RNase-Puffer (pH 7,4)

10 mM Tris-HCl

10 mM MgSO₄ x 7 H₂O

10 x SDS (10 % SDS) (w/v)

Einwaage unter Abzug + Mundschutz!

10 g SDS ad 100 ml Aqua dest.

für Acrylamidgele 2 Wochen haltbar, für Pufferzusatz länger verwendbar

SDS-Gel-Elektrophorese-Puffer

für 1000 ml 5 x		
25 mM	Tris	15,1 g
250 mM	Glycin	94 g
0,1 %	SDS	50 ml 10 % SDS

SDS-Ladepuffer

100 mM Tris / HCl (pH 6,8)

200 mM Dithiothreitol

4 % SDS

0,2 % Bromphenolblau

20 % Glycerol

5 x TBE-Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

54 g Tris

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

mit Aqua dest. ad 1000 ml

TBST

10 mM Tris / HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,05 % Tween 20

10 x TBS

Tris / HCl 12,114 g

1 x TBST

1:10-Verdünnung von 10 x TBS in Aqua dest.

+ 500 µl Tween 20 ad 1000 µl

NaCl 87,66 g
pH auf 8,0 ad 1000 ml

Transferpuffer (Western Blot)

für 1000 ml		
39 mM	Glycin	2,9 g
48 mM	Tris base	5,8 g
0,037 %	SDS	0,37 g bzw. 375 µl 10 % SDS

TUNEL-Permeabilisierungslösung (0,1 % Natriumcitrat / 0,1 % Triton X-100)

für 10 ml: 250 µl 4 % Natriumcitrat-Stammlösung
 1000 µl 1 % Triton X-100
 8,75 ml Aqua dest.

Verapamil-Stammlösung

122,75 mg Verapamil (M=491 g/mol) in 50 ml Methanol lösen (entspricht 5 mM)

Einsatz: 1:500 (10 µl auf 5 ml Medium) = 10 µM

Lagerung bei -20 °C

7.4 Anhang D - rad51-mRNA-Sequenz

rad51-mRNA-Sequenz (D14134: human mRNA for Rad51, complete cds)

```

1  ccgcgcgcgag  cggccagaga  ccgagcccta  aggagagtgc  ggcgcttccc  gaggcgtgca
61  gctgggaact  gcaactcatc  tgggttgtgc  gcagaaggct  ggggcaagcg  agtagagaag
121  tggagcgtaa  gccaggggcg  ttgggggccc  tgcgggtcgg  gcgcggtgca  cgccccggg
181  gtgaagtcgg  agcgcggggc  ctgctggaga  gaggagcgct  gcggaccgag  taatggcaat
241  gcagatgcag  cttgaagcaa  atgcagatac  ttcagtggaa  gaagaaagct  ttggcccaca
301  acccatttca  cggttagagc  agtgtggcat  aaatgccaac  gatgtgaaga  aattggaaga
361  agctggattc  catactgtgg  aggctgttgc  ctatgcgcca  aagaaggagc  taataaatat
421  taaggggaatt  agtgaagcca  aagctgataa  aattctggct  gaggcagcta  aattagttcc
481  aatgggtttc  accactgcaa  ctgaattcca  ccaaaggcgg  tcagagatca  tacagattac
541  tactggctcc  aaagagcttg  acaaaactact  tcaagggtga  attgagactg  gatctatcac
601  agaaatgttt  ggagaattcc  gaactgggaa  gaccagatc  tgtcatacgc  tagctgtcac
661  ctgccagctt  cccattgac  ggggtggagg  tgaaggaaag  gccatgtaca  ttgacactga
721  gggtagcttt  aggccagaac  ggctgctggc  agtggctgag  aggtatggtc  tctctggcag
781  tgatgtcctg  gataatgtag  catatgctcg  agcgttcaac  acagaccacc  agaccagct
841  cttttatcaa  gcatcagcca  tgatggtaga  atctaggtat  gcaactgcta  ttgtagacag
901  tgccaccgcc  ctttacagaa  cagactactc  gggtcgaggt  gagctttcag  ccaggcagat
961  gcacttgccc  aggtttctgc  ggatgcttct  gcgactcgct  gatgagtttg  gtgtagcagt
1021  ggtaatcact  aatcagggtg  tagctcaagt  ggatggagca  gcgatgtttg  ctgctgatcc
1081  caaaaaacct  attggaggaa  atatcatcgc  ccatgcatca  acaaccagat  tgtatctgag
1141  gaaaggaaga  ggggaaacca  gaatctgcaa  aatctacgac  tctcctgtc  ttctgaagc
1201  tgaagctatg  ttcgccatta  atgcagatgg  agtgggagat  gccaaagact  gaatcattgg
1261  gtttttctc  tgtaaaaaac  cttaagtgtc  gcagccta  gagagtgcac  tgctcctgg
1321  ggttctctac  aggcctcttc  ctgttgtgac  tgccaggata  aagcttccgg  gaaaacagct
1381  attatatcag  cttttctgat  ggtataaaca  ggagacaggt  cagtagtcac  aaactgatct
1441  aaaatgttta  ttccttctgt  agtgtattaa  tctctgtgtg  ttttctttg  ttttgagga
1501  ggggatgaa  gtatcttga  catggtgcct  taggaatgac  ttgggttaa  caagctgtct
1561  actggacaat  cttatgtttc  caagagaact  aaagctggag  agacctgacc  cttctctcac
1621  ttctaaatta  atggtaaaat  aaaatgcctc  agctatgtag  caaagggaa  gggctctcac
1681  agattctttt  tttctgtcag  taaaactctc  aagcaggttt  ttaagttgtc  tgtctgaatg
1741  atcttgtgta  agggtttgg  tatggagtct  tgtgccaac  ctactaggcc  attagccctt
1801  caccatctac  ctgcttggtc  tttcattgct  aagactaact  caagataatc  ctagagtctt
1861  aaagcatttc  aggccagtgt  ggtgtcttgc  gcctgtactc  ccagcacttt  gggaggccga
1921  ggcaggtgga  tcgcttgagc  caggagtttt  aagtccagct  tggccaagat  ggtgaaatcc
1981  catctctaca  aaaaatgcag  aacttaatct  ggacacactg  ttacacgtgc  ctgtagtccc
2041  agctactcta  tagcctgagg  tgggagaatc  acttaagcct  ggaaggtgga  agttgcagtg
2101  agtcgagatt  gcactgctgc  attccagcca  gggtgacaga  gtgagaccat  gtttcaaca
2161  agaaacattt  cagagggcaa  gtaaacagat  ttgattgtga  ggcttcta  aaagtagtta
2221  ttagtagtg

```

Vorwärtsprimer rad51-F2: 5' CAA ATG CAG ATA CTT CAG TGG 3' (258-278 bp)

Rückwärtsprimer rad51-R4: 5' GTC AAT GGG AAG CTG GCA G 3' (661-679 bp)

7.5 Anhang E – Materialien

Geräte

Autoklav

- groß: 5050 ELV (tuttnauer)
- klein (Schnellkochtopf)

Blot-Kammer: Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)

Brutschrank, CO₂ geregelt (Forma Scientific)

Durchflußzytometer Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter)

Elektrophoresekammer für Agarosegele

Elektrophoresekammer für SDS-Gele:

Mini-Protean II Electrophoresis Cell (BioRad)

Kryotom (Slee, Mainz)

Magnetrührer

- Variomax (für Bestrahlung)
- 6-Platten-Rührer

Microplate Reader 3550-UV (BioRad)

Mikroskope

- Zellkultur: Olympus IM (Olympus)
- Immunhistologie: Olympus BH-2, Leica DM IRB (Leica)

Mikrowelle

Photometer: Lambda Bio UV/Vis Spektrometer (Perkin Elmer)

pH-Meter CG822 (Schott Geräte)

Spannungsquelle

- Agarosegele: Elektrophoresis Power Supply EPS600 (Pharmacia Biotech)
- Power Supply Modell 1000/500 (BioRad)

Spülmaschine Mielabor G7783 Multitronic (Miele)

Sterilbank BSB 3A (Gelaire Flow Laboratories)

Thermocycler: Biometra T personal (Biometra)

Ultraschallstab

Vortex (Bender & Hobein AG)

Waage (Sartorius)

Wasserbad

Wärmeschrank (Heraeus)

Zentrifugen

- Megafuge 1.0R - Zellkultur-Zentrifuge (Heraeus)
- Biofuge 15 - Tischzentrifuge (Heraeus)

Zellzählgerät: Casy 1 Modell TT (Schärfe System)

Materialien und Chemikalien

Aceton (Roth: 9372.2)

Agarose

- GTQ Gentechnologie-Qualität (Roth: 6352.2)
- NEEO Ultra-Qualität für DNA / RNA-Elektrophorese (Roth: 2267.2)

Aluminiumfolie

ART-Filterspitzen für Zellkultur und PCR

- 10 µl: ART10 (VWR: 612J9625)

- 100 µl: ART100 E (VWR: 612J9658)
- 1000 µl: ART1000 E (VWR: 612J9665)

Autoklavierband (Fischer: 64535680)

Begasung: CO₂, O₂, N₂ (Westfalen AG, Münster)

Boydenkammer, 48 well micro chemotaxis chamber (Neuro Probe)

Bradford reagent (Sigma: B-6916)

BSA-Stammlösung 2 mg/ml (Sigma)

Butterflys Venofix 0,8 x 20 mm (Braun, Melsungen)

β-Mercaptoethanol (Sigma: M-7154)

CASYton (Schärfe System)

CASYclean (Schärfe System)

Cellophanpapiere für Geltrocknungsrahmen (Roth: K422.1)

Collagen I from rat tail, 50 mg (Sigma: C-7661)

Coomassie stain solution 1x (BioRad: 161-0436)

Cosmic calf serum (Greiner: 75802, Lot AJL11049, später vertrieben von BioWest: A0224, Lot S03115)

Coulter Glenz cleaning reagent (Beckman Coulter)

Coulter Isoton II Diluent (Beckman Coulter)

Daunorubicin: WP900 Hydrochlorid (Sigma: W-4013)

Desinfektion

- Brutschrank: Fermacidal D (DROL Laborgeräte und Zubehör, Reichertshausen)
- Hände: Sterillium Virugard (Roth: L313.2)
- Flow, Geräte: 70 % Isopropanol

DEPC (Sigma: D5758)

DMSO (Sigma: D-5879)

DNase I für TUNEL-Assay (Roche: 104132)

DNA-Marker

- puc19/MspI, 67-501 bp (Roth: T149.1)
- 100 bp ladder, 100-1500 bp (Promega: G2101)

ECL detection reagent (Amersham: RPN 2109)

Eich-Objektträger (Olympus)

Einbettmedium Tissue Tek O.C.T. (Sakura: 4583)

Einmal-Kanülen (Fischer: 64170116)

Einmal-Skalpell Cutfix (Roth: X002.1)

Einmal-Spritzen Tuberkulin (Fischer: 64170000)

Einschweißfolie: Sekura-Entsorgungsbeutel (Roth: E706.1)

Entellan: Schnelleindeckmittel für Mikroskopie (Merck: 1.07961)

Entwickler Ultrafin sw-Negativentwickler (Tetenal: 100154)

Eosin G (Merck: 1.159.35)

Eppendorf-Gefäße, safe-lock

- 0,5 ml (VWR: 2112140)
- 1,5 ml (VWR: 2112130)
- 2,0 ml (VWR: 2112120)

Ethanol (Roth: 9065.2)

Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml) (Roth: 2218.1)

Etoposid (Sigma: E-1383)

Facs-Röhrchen: 12 x 75 mm, 5 ml (VWR: 2123321)

Färbetröge groß und klein (VWR)

Fettstift: Dako-Pen (DAKO: S2002)

Filter für Boydenkammer (Polycarbonat-Membranen mit 8 µm Poren, 25 x 80 mm, PVP-frei), PFB 8 (Neuro Probe)

Fixierer Superfix Fixierkonzentrat (Tetenal: 100474)

Flow Check Fluorospheres (Beckman Coulter)

Formaldehyd: 37%ige Lösung, RNase-frei (Fluka/Sigma: 47608)

Formamid ACS (Fluka/Sigma: 47670)

Gelatine (Calbiochem: B43787)

Gel Blotting Paper (Whatman) 580 x 580 (VWR: 588F2232)

Gel-Extraktionskit (Qiagen: 28704)

L-Glutamin: 200 mM-Solution (Biochrom: K 0282 oder Sigma: G7513)

Gewebekulturflasche

- 12,5 cm² mit Filter (Falcon/BD: 35 3107)
- 25 cm² mit Filter (Greiner: 690175)
- 75 cm² mit Filter (Greiner: 658175)

Gewebekulturschalen (94 mm) mit Nocken (Greiner: 633171)

Hemacolor-Schnellfärbung von Blutaussstrichen, Färbeset für die Mikroskopie, enthält Fixier- und Färbelösungen sowie Puffer nach Weise (Merck: 1.11661)

Hyperfilm ECL 18 x 24 cm (Amersham: RPN 2103K)

Immobilon-P Transfer Membrane (PVDF) (Millopore)

Immuno-Brite (Beckman Coulter)

Isopropanol

Kryoröhrchen (Nalgene)

MgCl₂ für RT-PCR(Perkin Elmer)

Mayers Hämalaun für Mikroskopie (Merck: 1.09249)

Menzel-Deckgläschen 24 x 60 mm (VWR: 631-1339)

Methylenblau (Sigma: MB-1)

Milchpulver: Instant-Magermilchpulver (frema Reform)

- Millicell-CM, PICM 01250, 12 mm Durchmesser (Millipore)
- Mini-Geltrocknungsrahmen (Roth: K420.1)
- Minimal Essential Medium (Eagle) mit Earle's Salzen (Biochrom: F0325)
- MOPS free acid für RNA-Gele (Sigma: 69947)
- MuLV-Reverse Transkriptase 50U/ μ l (Roche: B01549 N808-0018)
- Mycoplasmentest
- ELISA Mycoplasma Detection Kit (Roche: 1296744)
 - VenorGeM PCR Assay for Rapid Mycoplasma Detection (minerva biolabs: VGM-025, Vertrieb über Biochrom)
- Nalgen Cryo 1°C Freezing Container (Nunc: 5100-0001)
- Natriumcitrat (Sigma: S-5770)
- Natriumhydroxid (Roth: 6771.2)
- Natriumpyruvat 100 mM-Lösung (Biochrom: L0473, 100 ml)
- nicht essentielle Aminosäuren (NEA): 100x-Konzentrat (Biochrom: K0293)
- Nucleotid-Mix (je 10 mM) (Promega: C1141)
- Objekträger Super Frost Plus (Roth : H867.1)
- O-Ringe (Silikon)
- Parafilm (VWR: 291F1213)
- Paraformaldehyd (Merck: 1.04005)
- Pasteurpipetten
- Plastik (Roth: 4894.1)
 - Glas (Merck: 612G1701)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma: P0781)
- Petrischalen (94 mm) mit Nocken, nicht adhäsiv (Greiner: 633180)
- Pipetten (steril)
- 2 ml (Falcon/BD: 356507)
 - 5 ml (Greiner: 606180)
 - 10 ml (Greiner: 607180)
 - 25 ml (Greiner: 760180)
- Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 (Sigma: P-5726)
- Ponceau S-Lösung (Sigma: P-7170)
- PP-Röhrchen (steril)
- 15 ml (Greiner: 188271)
 - 50 ml (Greiner: 227261)
- Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma: P-2714)
- Propidium-Iodid (Sigma: P4170)
- Proteinmarker (Amersham: RPN 756)
- Qiashredder-Säulen (Qiagen: 79654)

random hexamers (Molgen, Mainz)
Ribonuclease A (RNase A) DNase-frei (Roth: 7156.1)
RNasin (RNase-Inhibitor), 40 U/ μ l (Promega: N251A 11424101)
RNeasy Mini Kit (Qiagen: 74104)
Rotiphorese Gel 40 (19:1 Acrylamid:Bisacrylamid)(Roth: 3030.2)
Rührringe Typ LL (neolab: 2-2321)
Saponin (Sigma: S-2149)
SiHa-Zellen (ATCC Nr : HTB-35)
Spinnerflasche
Sterilfilter Minisart 0,2 μ m (Sartorius)
Tergitol, NP 40 (Sigma)
Tissue-Tek
Tracker Tape 10 x 15 cm (Amersham: RNP 2050)
Tris (Roth: 4855.2)
Triton X100 (Roth: 3051.2)
Trypsin (Sigma: T4424)
TUNEL-Assay FITC (Roche: 1684795)
UV-Küvette mikro (70 μ l) (Plastibrand: 759230)
Verapamil (Sigma: V-4629)
WiDr-Zellen (ECACC, Nr: 85111501)
Xylol (Isomere) (Roth: 9713.3)
Zellstoff in Lagen (VWR: 115Q2597)