

Einfluss einer Schwerionenbestrahlung auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kristina Götze
geb. am 14.05.1979 in Hannover

Mainz, 2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Tumorthherapie.....	9
1.1.1 Bestrahlung	10
1.1.1.1 Physikalische und biologische Eigenschaften ionisierender Strahlung.....	10
1.1.2 Klinische Anwendung von Teilchenstrahlung	16
1.1.2.1 Beschleunigeranlage der GSI	17
1.2 Metastasierung	21
1.2.1 Zellmigration.....	22
1.2.1.1 Integrine	23
1.2.1.2 Methoden zur Beurteilung der Zellmigration.....	27
1.2 Aufgabenstellung	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Zellkultur	31
2.1.1 Zellen.....	31
2.1.2 Kultivierung der Zellen.....	31
2.1.3 Automatisierte Zellzählung	32
2.1.4 Wachstumskurven.....	32
2.1.5 Kryokonservierung von Zellen.....	32
2.1.6 Auftauen von Zellen	33
2.1.7 Mykoplasmen-PCR	33
2.1.7.1 Vorbereitung der Proben	33
2.1.7.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	34
2.1.7.3 Agarosegelelektrophorese	34
2.1.8 Bestrahlung	35
2.1.8.1 Röntgenbestrahlung	35
2.1.8.2 Schwerionenbestrahlung.....	35
2.1.9 Zellüberleben nach Bestrahlung.....	36
2.1.9.1 Kolonienitätstest (PE).....	36
2.1.9.2 XTT.....	37
2.1.10 Zellmigration	37
2.1.10.1 Aussaat der Zellen	37
2.1.10.2 Vorbereitung der Filter.....	38
2.1.10.2.1 Kollagenbeschichtung	38
2.1.10.2.2 Gelatinebeschichtung.....	38
2.1.10.3 Beschickung der Boydenkammer.....	39

2.1.10.4	Fixierung und Färbung der Zellen	39
2.1.10.5	Auswertung	40
2.1.10.6	Reinigung der Boydenkammer	40
2.2	Proteinexpression	40
2.2.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	41
2.2.2	Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay	41
2.2.3	SDS-PAGE	42
2.2.4	Western Blot.....	42
2.2.4.1	Blotten	42
2.2.4.2	Blocking und Antikörperinkubation	43
2.2.4.3	Entwicklung	43
2.2.4.4	Strippen.....	44
2.3	Statistik	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Charakterisierung der Zelllinien	46
3.2	Migrationsmessungen mit Hilfe der Boydenkammer.....	52
3.2.1	Ermittlung der einzusetzenden Zellzahlen.....	52
3.2.2	Beschichtung der Boydenkammerfilter.....	53
3.3	Migrationsmessungen und Bestrahlung.....	55
3.3.1	Migrationsmessungen direkt nach Bestrahlung	55
3.3.2	Migrationsmessungen 24 Stunden nach Bestrahlung.....	59
3.4	Analysen der Proteinexpression	65
3.4.1	β_1 Integrinexpression	66
3.4.2	β_3 Integrinexpression	68
3.4.3	Akt-Expression.....	70
3.4.3.1	Akt1.....	70
3.4.3.2	Akt2.....	72
3.4.3.3	pAkt.....	74
3.5	Vergleich von Migration und Proteinexpression	77

4 Diskussion.....	84
4.1 Charakterisierung der Zelllinien	84
4.2 Migrationsversuche mit der Boydenkammer	87
4.3 Migrationsmessungen und Bestrahlung	90
4.3.1 Vergleich des Einflusses der Strahlenart	95
4.4 Proteinexpression	97
4.5 Vergleich von Migration und Proteinexpression	100
4.6 Ausblick.....	103
5 Zusammenfassung.....	104
6 Anhang	105
6.1 Abkürzungen.....	105
6.2 Puffer und Lösungen.....	107
6.2.1 Zellkultur	107
6.2.2 Boydenkammer	108
6.2.3 Western Blot	109
6.2.4 Sonstige Lösungen	111
6.3 Marker.....	111
6.4 Kits	111
6.5 Antikörper.....	111
6.6 Chemikalien	112
6.7 Material und Geräte	114
6.8 Programme	115
7 Referenzen	116

1 Einleitung

Nach aktuellen Schätzungen des Robert Koch-Instituts erkrankten in Deutschland im Jahr 2004 436.500 Patienten neu an Krebs (Robert Koch-Institut, 2008). Für denselben Zeitraum gehörten maligne Tumorerkrankungen mit 208.824 Todesfällen zu den fünf häufigsten Todesursachen in Deutschland. Dabei lag die Mortalitätsrate mit einem prozentualen Anteil von 29,0 % (Männer) bzw. 22,6 % (Frauen) hinter Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (39,8 % bzw. 49,7 %) an zweiter Stelle der Todesstatistik (Statistisches Bundesamt, 2005).

Häufig betroffene Organe und Entitäten unterscheiden sich dabei geschlechtsspezifisch. So erkrankten 2004 Männer vorwiegend an Entartungen der Prostata, des Darms oder der Lunge (25,4 % / 16,2 % / 14,3 % Anteil an allen Neuerkrankungen 2004). Bei Frauen sind Brust, Darm und Lunge (27,8 % / 17,5 % / 6,4 % Anteil an allen Neuerkrankungen 2004) besonders häufig betroffene Organe (Robert Koch-Institut, 2008).

Die Chancen auf Heilung einer Krebserkrankung sind immer auch abhängig vom betroffenen Gewebe und dem Zeitpunkt zu dem ein Tumor erkannt wurde. Um eine bessere Abschätzung über das Stadium der Erkrankung zu erlangen, werden Tumoren in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Diese spiegeln zum einen das Stadium des Wachstums, als auch die Bildung von Lymphknoten- und Fernmetastasen wider. Anhand dieser Einteilung kann ein behandelnder Arzt einen auf die Ausdehnung und die Klassifizierung zugeschnittenen Behandlungsplan entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit *in vitro* Kulturen eines Darm- und eines Hirntumors gearbeitet. Während Karzinome des Darms zu den häufigsten Krebserkrankungen zählen, sind Hirntumore wenig verbreitet. Unter der Bezeichnung Darmkrebs (kolorektal Karzinom) werden Erkrankungen des Dickdarms (Kolon), des Mastdarms (Rektum) und des Afters (Anus) zusammengefasst. Tumoren des Dünndarms sind hingegen sehr selten (Robert Koch-Institut, 2008). Eine Behandlung von kolorektal Karzinome erfolgt überwiegend operativ. Zudem werden Chemo- und/oder Strahlentherapie eingesetzt, um vor einer Operation die Tumormasse zu verkleinern, oder postoperativ noch vorhandenes Tumorgewebe zu zerstören (DKFZ, 2003). Das Fünf Jahres Überleben stellt mit einer Überlebensrate von 60 % aller Kolonkarzinompatienten eine gute Prognose bei frühzeitiger Erkennung dar.

Hirntumoren sind im Gegensatz zur Darmkrebserkrankungen sehr selten. Sie werden daher auch nicht in Übersichtsstatistiken erfasst. Unterschieden wird bei dieser Tumorerkrankung nach der Zellart aus dem der Tumor entsteht. Dazu gehören u.a. Glioblastome, Astrozytome und Oligodendrogliome (DKFZ, 2006). Als aggressivste Tumorart gelten Glioblastome. Sie zeigen ein sehr schnelles Wachstum und infiltrieren das umliegende Gewebe (Wick et al., 2002). Je nach Lage der Tumoren gehören Operation und Bestrahlung zu möglichen Thera-

pieansätzen. Allerdings zeigen vor allem Glioblastome eine hohe Radioresistenz und eine starke Tendenz zur Rezidivbildung durch Wanderung einzelner Tumorzellen (Bao et al., 2006). Daher ist eine erfolgreiche Therapie schwierig und Glioblastome haben mit einem mittleren Überleben von zwölf Monaten nach Diagnose eine schlechte Prognose (Lu et al., 2005).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden humane Zelllinien verwendet, die den vorgestellten Tumorentitäten entsprangen: die Gliomzelllinie U87 und die kolorektalen Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} kamen zum Einsatz.

1.1 Tumorthherapie

Zu den wichtigsten Möglichkeiten der Tumorthherapie gehören heutzutage immer noch die operative Entfernung des Tumors, sowie die Zerstörung der Krebszellen durch Chemotherapeutika und Strahlentherapie. Zudem gewinnen, die Behandlung bestimmter Tumoren durch zielgerichtete Therapien („targeted therapy“) eine immer größere Bedeutung.

Eine erfolgreiche operative Entfernung stellt immer noch die einfachste Möglichkeit zur Krebstherapie dar. Doch alle Tumorzellen zu entfernen, ist dabei nicht immer zu erreichen. Dies gilt vor allem bei Tumoren, die an schwerzugänglichen Stellen wachsen oder weit in das „Wirtsgewebe“ infiltriert sind. Daher ist dieser therapeutische Ansatz allein meistens nicht ausreichend um eine vollständige Heilung zu erzielen, sondern dient vielmehr dem Entfernen der Hauptlast des Tumorgewebes vor Einsatz einer zellulären Therapie. Dazu werden häufig sogenannte Zytostatika eingesetzt. Diese Medikamente richten sich hauptsächlich gegen Strukturen des Zellkerns, wo sie eine Apoptose der Zellen auslösen. Dabei sind die verwendeten Arzneimittel allerdings nicht tumorzellspezifisch, sondern greifen viel mehr alle sich häufig teilenden Zellen an. Daher ist bei dieser Art der Therapie mit vermehrten Nebenwirkungen zu rechnen. Eine neuartige Form der Chemotherapie stellt die „zielgerichtete Therapie“ dar. Auch hier erfolgt die Gabe verschiedenster meist chemischer Medikamente. Diese besitzen im Gegensatz zu Zytostatika allerdings eine höhere Tumorzellspezifität. So wird versucht, über sogenannte Tumormarker gezielt Tumorzellen in ihrem Wachstum anzugreifen und zu zerstören. Auch der Einsatz von Antikörpern gewinnt zunehmend an Bedeutung. Diese richten sich gegen Oberflächenmoleküle, die vermehrt auf Tumorzellen exprimiert werden und fördern so die körpereigene Immunabwehr gegen den Tumor. (Alle Informationen: DKFZ, 2007).

Neben Chirurgie und Chemotherapie ist die Strahlentherapie eine der wichtigsten Ansätze der onkologischen Behandlung von Tumoren. Dabei wird sie alleine oder in Kombination mit den beiden anderen genannten Verfahren eingesetzt. Der folgende Abschnitt soll die Wirkungsweise und den Einsatz der verwendeten Strahlenarten erläutern.

1.1.1 Bestrahlung

Bei der radiotherapeutischen Behandlung von Tumoren kommt energiereiche Strahlung zum Einsatz. Im Gegensatz zur chemotherapeutischen Behandlung mit Zytostatika ist diese eine lokale Therapievariante und betrifft meist nur den bestrahlten Körperbereich. Daher sind die zu erwarteten Risiken einer Nebenwirkung geringer und vorwiegend örtlich begrenzt. Nichts desto trotz wird durch eine Strahlentherapie fast immer auch das direkt angrenzende Normalgewebe in Mitleidenschaft gezogen. Ziel einer Strahlentherapie ist die Verringerung oder Vernichtung des Tumorumfanges. Dazu werden im klinischen Alltag sowohl energiereiche, elektromagnetische Strahlung als auch Teilchenstrahlung eingesetzt. Elektromagnetische Strahlung, auch Photonenstrahlung genannt, wird in Röntgen- und Gammastrahlung unterteilt. Diese unterscheiden sich in der Art ihrer Erzeugung und der Reichweite, aber kaum in ihrer zellulären Wirkung. Bei der Teilchenstrahlung unterscheidet man zwischen Strahlung ungeladener Teilchen (Neutronenstrahlung) und geladener Teilchen (Elektronen-, Protonen- oder Schwerionenstrahlung). Als „schwere Ionen“ werden in der Strahlentherapie alle Ionen bezeichnet, die schwerer als Wasserstoff sind. Sowohl Wasserstoff- als auch Schwerionen werden für Therapie Zwecke von Beschleunigern erzeugt und eingesetzt. Bei gleicher Energie unterscheiden sich die Teilchen durch ihre Reichweite und Strahlqualität. Der Einsatz der jeweiligen Strahlenart ist dabei sehr stark abhängig vom Ort des Tumorstadiums und von der Art des Tumors.

1.1.1.1 Physikalische und biologische Eigenschaften ionisierender Strahlung

Für die Strahlentherapie wird energiereiche Strahlung, sogenannte „ionisierende Strahlung“, eingesetzt. Diese erhält ihren Namen aus der Tatsache, dass sie beim Durchtritt durch Materie atomare Bestandteile der Moleküle anregt und diese ionisiert. Bei Bestrahlung von Tumorgewebe ist die durchtretene Materie hauptsächlich Wasser, aus dem Zellen zu etwa 80 % bestehen. Die schädliche Wirkung der ionisierenden Strahlung auf Zellen hat, besteht in der Wechselwirkung mit DNA, welche Strangbrüche in der DNA erzeugt. Wechselwirkungen können auf zwei verschiedene, physikalische Weisen auftreten. Zum einen können direkte Läsionen in der DNA-Struktur erzeugt werden, zum anderen kann die Erzeugung hochreaktiver Moleküle zu einer Reaktion mit der DNA und so zu ihrer Schädigung führen (s. Abbildung 1).

Eine direkte Wirkung erfolgt demnach, wenn das Herauslösen eines Elektrons einen direkten Schaden in der DNA-Struktur verursacht. Durch die Erzeugung von Hydroxyl-Radikalen oder weiteren Sauerstoffradikalen wird die DNA indirekt geschädigt. So werden durch Strahlung Radikale induziert, welche dann als sekundäre Reaktion mit der DNA interagieren und Schäden hervorrufen (Hall und Giaccia, 2005).

Treten nach einer Bestrahlung von Zellen nur einzelne DNA-Schäden auf, so können diese in kurzer Zeit von der Zelle repariert werden. Werden allerdings eine Vielzahl von Brüchen, insbesondere Doppelstrangbrüche in einer Zelle induziert, so können diese nicht mehr oder nur unzureichend repariert werden und die Zelle stirbt ab.

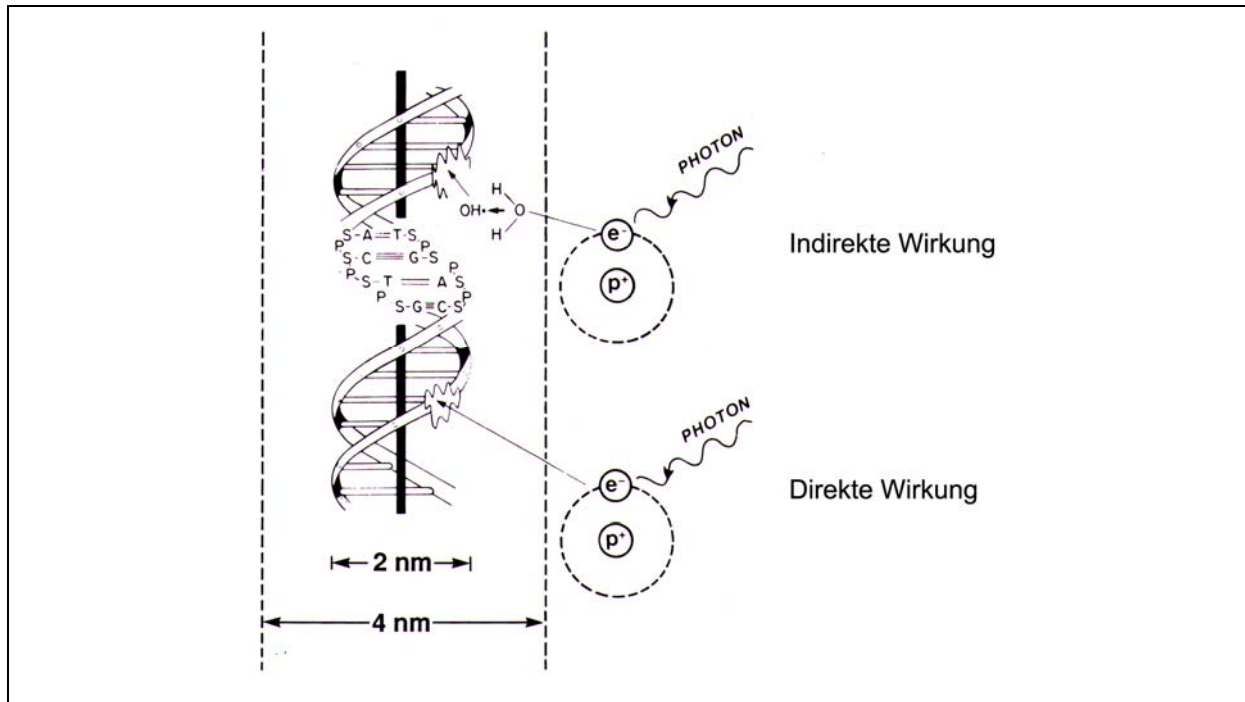


Abbildung 1: Strahlenschäden an DNA-Doppelsträngen (Hall und Giaccia, 2005).

Die Abbildung zeigt direkte und indirekte Wirkungen von Strahlung auf einen DNA-Doppelstrang. Diese wird durch Strahlung direkt über die Erzeugung freier Elektronen oder aber indirekt über durch Strahlung induzierte Radikale geschädigt.

Der Weg über den Anregungs- und Ionisationsereignisse durch Strahlung ausgelöst werden, ist abhängig von der Strahlenart. Photonenstrahlen können ihre Energie auf drei unterschiedliche Weisen abgeben. Beim photoelektrischen Effekt werden Elektronen aus einer inneren Elektronenschale eines Atoms herausgeschlagen, wobei die komplette Energie der Strahlung auf das Elektron übertragen wird. Bei der Ionisierung durch den Compton Effekt wird durch eine teilweise Übertragung der Strahlenergie auf ein Elektron, dieses aus der äußeren Atomhülle herausgeschlagen. Dabei verliert die Strahlung einen Teil der Energie und wird auf ihrem Weg durch die Materie abgelenkt. Paarbildung tritt bei Strahlung mit einer sehr hohen Energie auf. Hier werden durch Wechselwirkung mit einem Atomkern ein Elektron und ein Positron erzeugt. Auf diese beiden Teilchen wird bei ihrer Entstehung die komplette Energie des Photons übertragen. Allen drei Arten der Strahlen-Wechselwirkung mit Materie ist gemein, dass freie Elektronen erzeugt werden, die dann wiederum in der Lage sind mit anderen Atomen zu reagieren und neue Ionisationsereignisse auszulösen. Welche Wechselwirkung zwischen Materie und Strahlung auftritt ist abhängig von der Energie der Photo-

nen. Die für die Tumorthherapie eingesetzte Photonenstrahlung, bewegen sich in einem Energiebereich, in dem hauptsächlich der Compton-Effekt wirksam ist.

Teilchenstrahlung gibt die Energie durch inelastische Kollisionen mit anderen Atomen ab. Es finden sogenannte Coulomb-Wechselwirkungen mit der Elektronenhülle der Atome statt, was einen Energieverlust mit sich bringt. Dabei ist das Ausmaß der Wechselwirkungen von der Energie der Teilchen, von deren Ladung und deren Masse abhängig. Je schneller die Teilchen beschleunigt werden, das heißt, je mehr Energie sie zu Beginn besitzen, desto weniger Wechselwirkungen finden statt. Werden die Teilchen mit der Zeit und der überwundenen Strecke langsamer, so können vermehrte Wechselwirkungen mit Elektronen der Atomhüllen der durchdrungenen Materie stattfinden, bis die Teilchen fast vollständig abgebremst sind und in diesem Punkt nahezu ihre komplette Energie abgeben. Dieser definiert Punkt wird als „Bragg-Peak“ bezeichnet und ist in seiner Eindringtiefe und Ausdehnung abhängig von der Art der Teilchen und deren Geschwindigkeit. Selten findet zwischen den beschleunigten Teilchen und den Atomkernen eine direkte Wechselwirkung statt. In diesem Fall entstehen leichtere Fragmente und Neutronen, die zu einer geringen Energiedeposition auch hinter dem Bragg-Peak führen (Kraft, 1998).

Allgemein ist die Energie die durch Strahlung auf Materie übertragen wird im Begriff der Dosis definiert. Diese ist festgelegt als die Energie, die pro bestimmter Masse absorbiert wird (s. Formel 1). Die Einheit der Dosis ist das Gray (Gy).

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

Formel 1: Definition der Strahlendosis.

Die Dosis einer Strahlung ist definiert über die Energie, die pro kg Masse absorbiert wird. Ihre Einheit ist das Gray [Gy].

Im Gegensatz zur Photonenstrahlung ist die Teilchenstrahlung im engeren Sinne keine energiereiche Strahlung. Während Photonenstrahlung über energiereiche Wellen mit Materie interagiert, wird die Energie der Teilchenstrahlung in den jeweiligen Teilchen „gespeichert“ und wie oben beschrieben über atomare Wechselwirkungen weitergegeben. Die angegebenen Dosen entsprechend daher sogenannten Äquivalentdosen, bei der jeweils die gleiche Energie auf die Materie übertragen wird.

Verschiedene Strahlenarten geben ihre jeweilige Energie auf anderen Wegen ab und lösen so auch Ionisationsereignisse unterschiedlich aus. Daher werden Strahlen auf Grund ihrer ionisierenden Wirkungen auch in dünn und dicht ionisierende Strahlungen eingeteilt. Dies Einteilung beschreibt die Anhäufung von Ionisationsereignissen entlang einer Spur.

Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2 A. Während für die Ionisierung der bestrahlten Materie (schwarze Punkte) nach Bestrahlung mit Photonen (z.B. Röntgenstrahlung) statistisch verteilte Ionisationsereignisse gemessen werden, treten Ionisationen mit Teilchen (z.B. ^{12}C -Ionen) in sehr kurzen Abständen entlang einer definierten Spur auf. Dies zeigt auch Abbildung 2 B. Hier ist zum einen die Energiedeposition auf der Fläche eines Zellkerns von Röntgen- und Schwerionenstrahlung graphisch dargestellt und zum anderen die durch diese Strahlung in Zellkernen erzeugten DNA-Schäden gelb angefärbt (Kraft, 2005). So zeigt sich, dass die Energiedeposition von Photonenstrahlung über die Fläche wie z.B. innerhalb eines Zellkerns gleichmäßig verteilt auftritt. Schwerionenstrahlung hingegen deponiert die jeweilige Energie in Spitzen und in sehr definierten Punkten.

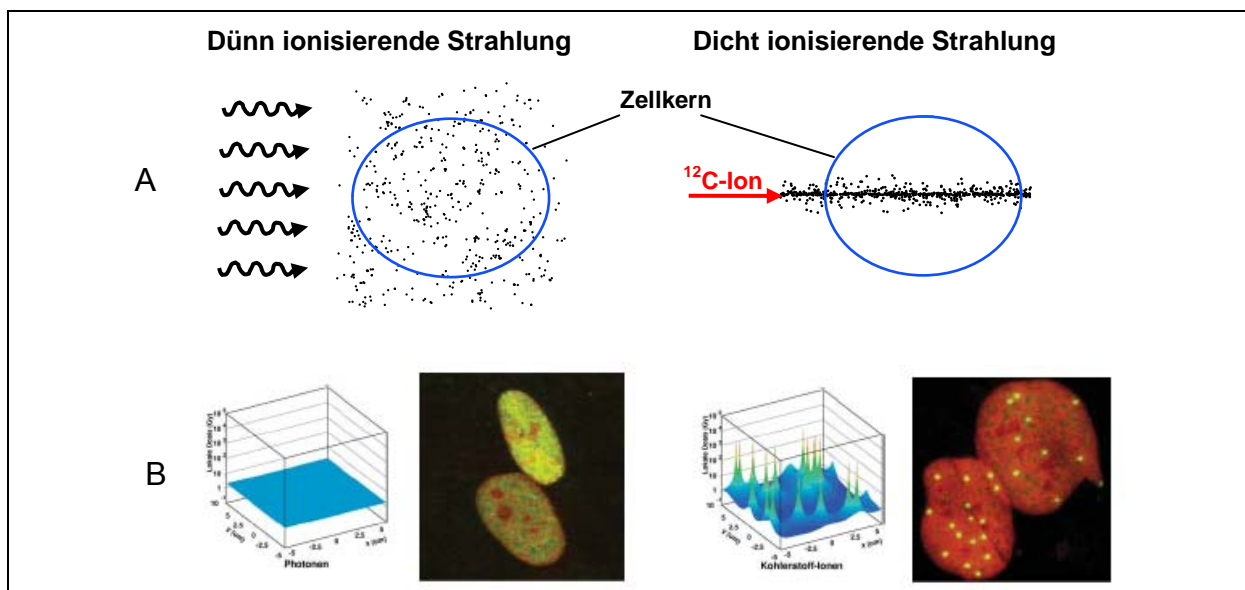


Abbildung 2: Vergleich dünn und dicht ionisierender Strahlung.

(A) Schematisch dargestellt sind Ionisationsereignisse (schwarze Punkte), wie sie nach Bestrahlung mit dünn oder dicht ionisierender Strahlung im Bereich von Zellkernen (blauer Kreis) auftreten können. (B) zeigt die lokale Energiedeposition auf der Fläche eines Zellkerns. Die erzeugten DNA-Schäden in Zellkernen nach Röntgen- oder ^{12}C -Ionenstrahlung sind in den unteren Bildern gelb gefärbt (Kraft, 2005).

Wenn man sich vor Augen führt, dass die Anzahl der Ionisationsereignisse (Abbildung 2A) nach ^{12}C -Ionenbestrahlung wesentlich dichter ist, lässt sich nachvollziehen, dass verschiedene Strahlenarten bei gleicher Dosis unterschiedlich ausgeprägte Wirkungen auf Zellen haben können. Während ein DNA-Strang nach dünn ionisierender Strahlung nur vereinzelte Schäden aufweist, sind Schäden in einer DNA nach dicht ionisierender Strahlung zwar räumlich begrenzter, aber wesentlich massiver und können daher schwerer repariert werden (Heilmann et al., 1996).

Es wurde daher der Begriff der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW, Formel 2) eingeführt. Mit Hilfe der RBW ist es möglich, die Strahlenwirkung unterschiedlicher Strahlenarten zu vergleichen. Sie ist definiert als der Quotient aus der Dosis einer Vergleichsstrahlung und

der Dosis der zu untersuchenden Strahlenart, bei der die gleiche biologische Wirkung erzielt wird. Üblicherweise wird als Vergleichsstrahlung Röntgenstrahlung und als biologischer Isoeffekt *in vitro* das 10%ige Überleben von Zellen verwendet.

$$RBW = \frac{D_{R\ddot{o}}}{D_{Test}}$$

Formel 2: Definition der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW).

Die relative biologische Wirksamkeit ist definiert als der Quotient aus der Dosis einer Vergleichsstrahlung (meist Röntgenstrahlung $D_{R\ddot{o}}$) und der Dosis der zu untersuchenden Strahlung (D_{Test}) bei der die gleiche biologische Wirkung, (z.B. 10 % Überleben) eintritt.

Photonen- und Teilchenstrahlung unterscheiden sich nicht nur in der Erzeugung von Ionisationsereignissen und in der biologischen Wirkung, sondern auch in der Abgabe der Energie über eine Wegstrecke. Abbildung 3 zeigt Tiefendosisprofile von Photonen- und Teilchenstrahlung.

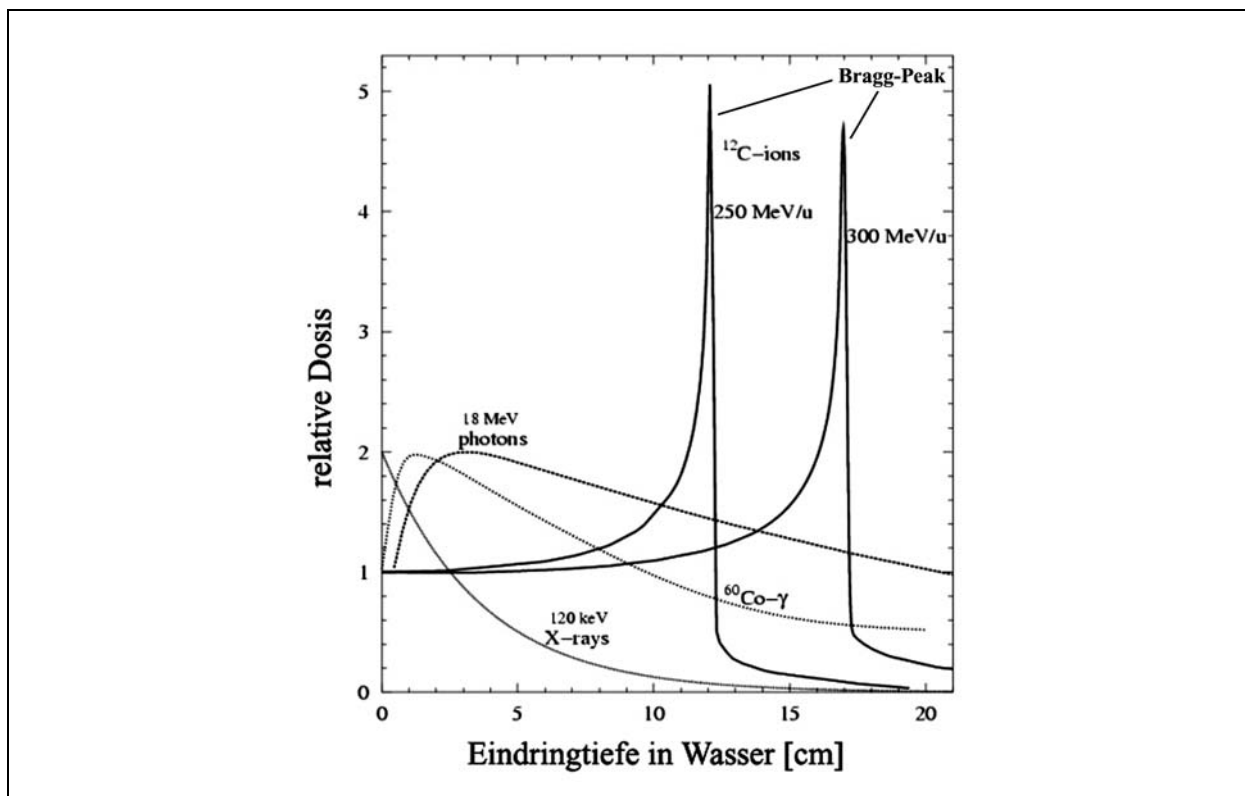


Abbildung 3: Vergleich der Eindringtiefe verschiedener Strahlenarten (Kraft, 2000).

Die Abbildung zeigt Dosisprofile unterschiedlicher Strahlenarten. Aufgetragen wurde die relative Dosis gegen die Eindringtiefe in Wasser. Gestrichelte Linien zeigen Dosisprofile von Photonenstrahlungen unterschiedlicher Energien. Durchgezogene Linien zeigen Dosisprofile von ^{12}C -Schwerionenstrahlungen mit verschiedenen Energien.

Dabei wurde die relative Dosis der Strahlung gegen die Eindringtiefe in Wasser aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Energie von Photonenstrahlung (gestrichelte Linien) nach einem anfänglichen Maximum mit zunehmender Eindringtiefe exponentiell abnimmt. Das anfängliche Maximum verschiebt sich mit steigender Energie leicht nach rechts. Beispiele der

Dosisprofile von Teilchenstrahlung (durchgezogene Linien) sind hier durch die Kurven zweier ¹²C-Ionenstrahlen mit unterschiedlicher Energie dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass diese Teilchen ein sogenanntes invertiertes Dosisprofil zeigen. Zu Eintrittsbeginn geben die Ionen nur wenig Energie an die Umgebung ab und erst nach einer relativen großen Eindringtiefe wird ihre Energie in einem schmalen Bereich frei. Diese Bragg-Peaks lassen sich durch Variation der Energie in ihrer Lokalisation in Strahlrichtung verändern.

Wie in Abbildung 3 ebenfalls ersichtlich wird, ist die abgegebene Energie der verschiedenen Strahlenarten über die Wegstrecke, die sie zurücklegen, unterschiedlich. Auch die Anzahl der Ionisationsereignisse, die von einer bestimmten Strahlenart über eine definierte Wegstrecke erzeugt werden kann, variieren. Die durchschnittliche Dichte des Energieverlustes und somit das Auftreten von Ionisationsereignissen kann für kurze Strecken über den linearen Energietransfer (LET) abgeschätzt werden. Dieser ist definiert als mittlerer Energieverlust ΔE über eine mittlere Strecke ΔS und wird in der Einheit keV/ μm angegeben (s. Formel 3) (Hall und Giaccia, 2005).

$$LET = \frac{\Delta E}{\Delta S} \left[\frac{keV}{\mu m} \right]$$

Formel 3: Definition des linearen Energietransfers (LET).

Der lineare Energietransfer (LET) ist definiert als der mittlere Energieverlust ΔE einer Strahlung über eine mittlere Strecke ΔS und wird angegeben in keV/ μm .

Aus dieser Definition lässt sich die Effektivität der Strahlenwirkung abschätzen. Strahlung mit einem geringen LET-Wert (z.B. Röntgenstrahlung), sogenannte Niedrig-LET-Strahlung, gibt die Energie homogen verteilt über ein Volumen ab und verliert daher über eine definierte Wegstrecke relativ wenig Energie. Dementsprechend findet auch nur eine geringe Anzahl an Ionisationsereignissen statt. Strahlenarten mit einem großen LET-Wert (z.B. ¹²C-Schwerionen), auch Hoch-LET-Strahlung genannt, erzeugen auf derselben Strecke wesentlich mehr Ionisationen. Tabelle 1 zeigt LET-Werte für Photonen- und Teilchenstrahlung unterschiedlicher Energien.

Tabelle 1: LET verschiedener Strahlenarten (Tannock et al., 2005).

Strahlenart		LET [keV/ μm]
Photonenstrahlung	⁶⁰ Co (γ -Strahlung; ~ 1,2 MeV)	0,3
	200 keV Röntgenstrahlung	2,5
Partikelstrahlung	Protonen (2 MeV)	17
	Kohlenstoff (100 MeV)	160

1.1.2 Klinische Anwendung von Teilchenstrahlung

Wie schon zu Beginn erwähnt, wird in der Strahlentherapie von Tumoren in der Hauptsache Photonenstrahlung, in neuerer Zeit vermehrt auch Teilchenstrahlung verwendet. Die Tumorthherapie mit Teilchen kommt weltweit allerdings nur in wenigen Zentren, und nur bei bestimmten Tumorarten zum Einsatz. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über weltweite Therapiezentren, die schwer zugängliche, tiefliegende Tumoren mit Teilchenstrahlung behandelten. So gab es 1998 weltweit nur elf Zentren mit einer Protonentherapie und sogar nur zwei Therapieanlagen die eine Behandlung mit Kohlenstoffionen durchführten (Debus, 1998).

Tabelle 2: Übersicht über weltweite Therapiezentren für tiefliegende Tumoren mit Protonen und schweren Ionen (Debus, 1998).

Institution	Teilchenart	Therapie seit	Patientenzahl
LBL Berkeley, USA	Protonen Helium Schwere Ionen, vor allem Neon	1954 – 1957 1957 – 1987 1975 – 1993	30 2054 433
GWI Uppsala, Schweden	Protonen	1957	220
HCL Cambridge, Boston, USA	Protonen	1961	7694
JINR Dubna, Russland	Protonen	1967	124
ITEP Moskau, Russland	Protonen	1969	3039
PINP St. Petersburg, Russland	Protonen	1975	1029
PMRC Tsukuba, Japan	Protonen	1983	576
LCUMC, Loma Linda, USA	Protonen	1990	3433
NAC Faure, Südafrika	Protonen	1993	263
UC Davis, USA	Protonen	1993	162
NIRS Chiba (HIMAC), Japan	Kohlenstoff	1994	389
PSI Villigen, Schweiz	Protonen	1996	11
GSI Darmstadt, Deutschland	Kohlenstoff	1997	20

Stand: 1998

1997 wurde in einem Pilotprojekt in der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und dem Forschungszentrum Rossendorf in Dresden mit der Behandlung von Tumorpatienten mit ^{12}C -Ionen begonnen. In den ersten zehn Jahren wurden dort mehr als 400 Patienten erfolgreich behandelt (Amaldi und Kraft, 2007). Aufgrund der durchgeführten Therapieversuche, wurde in Heidelberg mit dem Bau eines dedizierten ^{12}C -Schwerionen-

Therapiezentrum begonnen, welches 2008 in Betrieb genommen werden soll. Zudem werden auch in anderen europäischen Ländern Anlagen für eine klinische Anwendung zur Ionentherapie geplant und errichtet (Amaldi und Kraft, 2007).

1.1.2.1 Beschleunigeranlage der GSI

Die Beschleunigeranlage der GSI besteht aus drei Komponenten in denen Teilchen beschleunigt werden, sowie verschiedenen Experimentierplätzen. Der Linearbeschleuniger (UNILAC) dient sowohl als Vorbeschleuniger der Ionen für das angeschlossene Schwerionensynchrotron (SIS), als auch als Teilchenlieferant für Versuche mit Ionen niedriger Energien. Im SIS können die benötigten Ionen auf 90 % der Lichtgeschwindigkeit beschleunigt werden, bevor sie in den Experimentierspeicherring (ESR) gelangen. Von hier können Versuche in der Target Halle mit Ionen versorgt werden. Auch eine direkte Einschleusung des Strahls vom SIS in die Target Halle ist möglich. Dort befindet sich unter anderem der Patientenstrahlplatz. Eine schematische Übersicht über den Aufbau der Beschleunigeranlage liefert Abbildung 4.

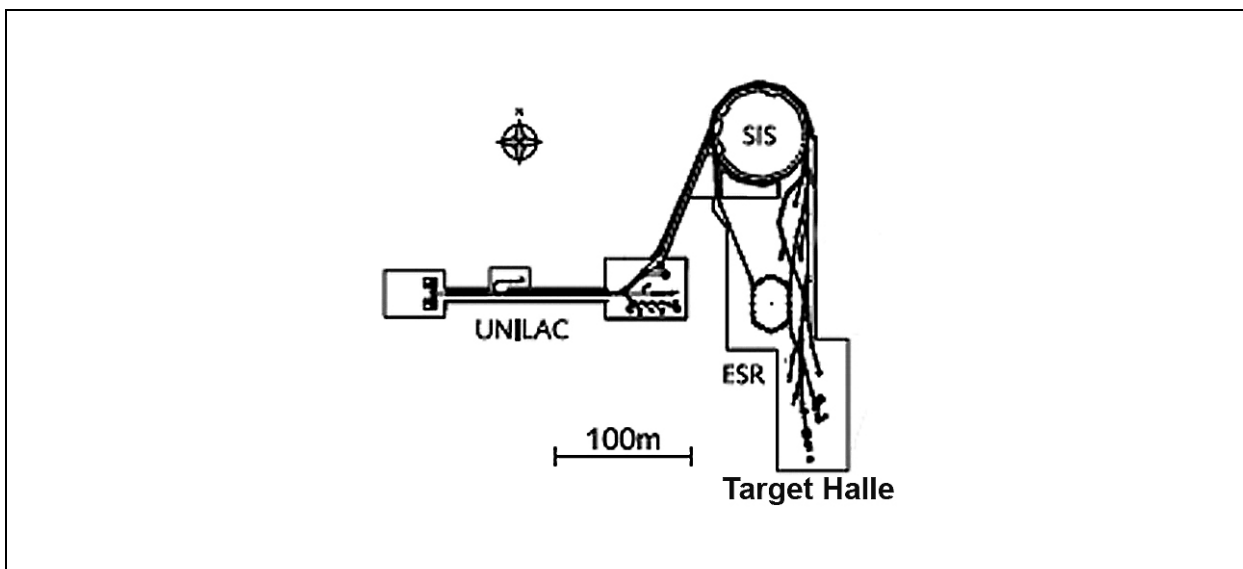


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Beschleunigeranlage in der GSI (GSI, 2001).

Gezeigt ist der schematische Aufbau der Beschleunigeranlage der GSI. Die Ionen werden über den Linearbeschleuniger (UNILAC) in das Schwerionensynchrotron (SIS) eingeschleust und dort auf 90 % der Lichtgeschwindigkeit beschleunigt. Von dort gelangen sie für Versuchsdurchführungen direkt oder über den Experimentierspeicherring (ESR) in die Target Halle.

Um die Atome des Strahls möglichst effizient beschleunigen zu können, müssen sie so gut wie möglich ionisiert werden. Das in der GSI für das therapeutische Bestrahlen von Tumoren verwendete Atom Kohlenstoff wird daher als sechsfach positiv geladenes Ion $^{12}\text{C}^{6+}$ beschleunigt. So erfolgt schon bei der Einschleusung der Atome aus der Ionenquelle in das UNILAC die erste Ionisation. Die eigentliche Beschleunigung erfolgt dann in mehreren Schritten, wobei weitere Ionisationen erfolgen. Bei der Überführung der Ionen vom UNILAC in das

SIS erfolgt durch Durchtritt der Atome durch eine dünne Kohlenstoffolie der letzte Ionisationsschritt der Atome. Das angeschlossene Synchrotron ist ein Vakuumring mit einem Umfang von 216 m. In diesem werden die Ionen über magnetische Felder auf einer Kreisbahn gehalten und auf ihre Endgeschwindigkeit beschleunigt (GSI, 2003).

Ionenstrahlung gibt seine Energie, die sie durch die Beschleunigung erhält, im Bragg-Peak ab. Der Durchmesser eines Bragg-Peaks ist allerdings nicht groß genug, um das komplette Tumervolumen abzudecken. Daher muss der Strahl so beeinflusst werden, dass ein komplettes Bestrahlen eines Tumervolumens möglich wird. Dies geschieht durch die Aufweitung des Bragg-Peaks zu einem sogenannten „spread out bragg peak“ (SOBP). Dabei wird durch Variation der Energie und Reichweite des Strahls und durch Addition der Einzeldosen eine gleichmäßige Dosisverteilung über die vollständige Tumortiefe erreicht. Dies ist in Abbildung 5 gezeigt.

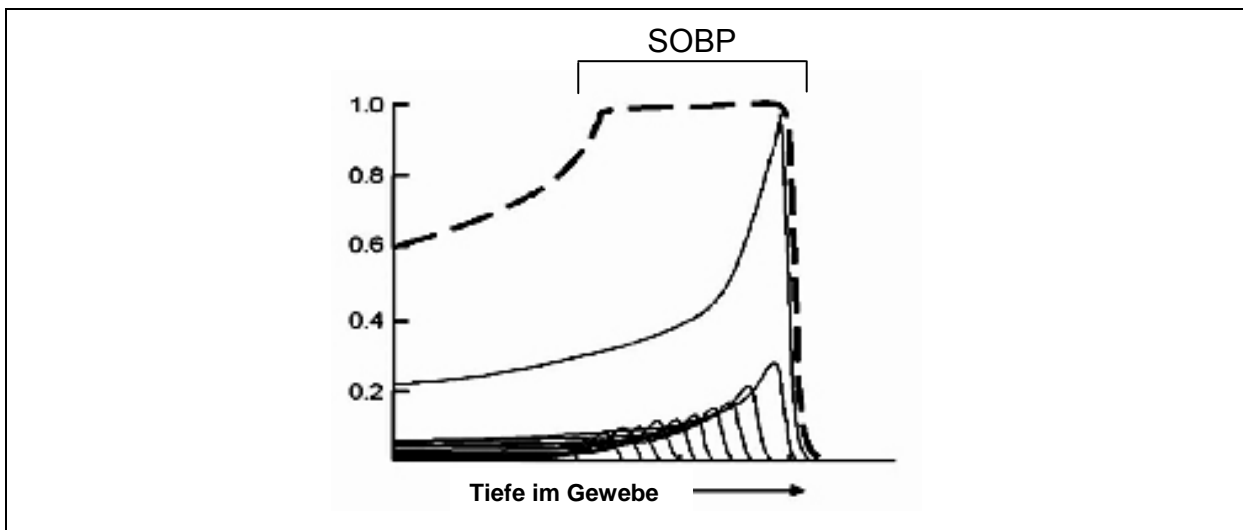


Abbildung 5: Erzeugung eines ausgeweiteten Bragg-Peaks (Schulz-Ertner et al., 2006).

Durch Veränderung der Energie und Reichweite eines Schwerionenstrahls kann für die komplette Tumortiefe eine gleichmäßige Dosisdeposition durch Erzeugung eines ausgeweiteten Bragg-Peaks (spread out bragg peak = SOBP) erreicht werden.

Um auch in X- und Y-Achsenrichtung, das heißt senkrecht zur Einstrahlrichtung, eine vollständige Bestrahlung des Tumors zu garantieren, wird in der GSI der Ionenstrahl zudem durch das sogenannte Rasterscan-Verfahren beeinflusst. Ablenkungen des Strahls durch Dipolmagnete ermöglichen eine Veränderung der Strahlposition entlang der X- und Y-Achsen. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung des Rasterscan-Verfahrens. Dort ist ein Tumor zu sehen, in dem jeder Punkt durch schichtweises Abrastern (blaue Punkte) bestrahlt werden kann.

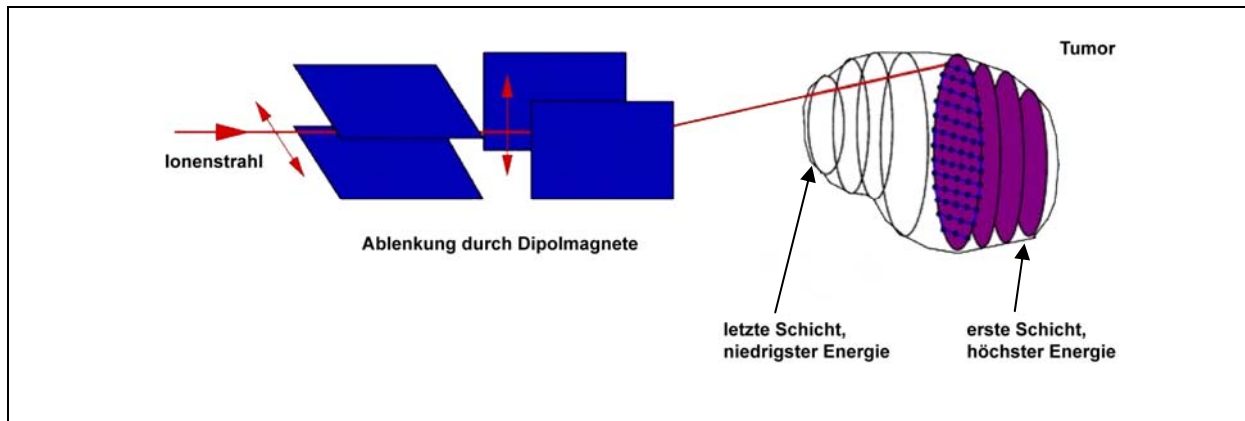


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Rasterscan-Verfahrens zur Tumorbestrahlung (Kraft, 2005).

Eine schematische Darstellung des in der GSI eingesetzten Rasterscan-Verfahrens zur zielgenauen und vollständigen Bestrahlung eines Tumors ist gezeigt. Der Ionenstrahl wird dabei mittels Dipolmagnete abgelenkt und schichtweise durch den Tumor geführt.

Der erfolgreiche Einsatz einer Radiotherapie ist grundsätzlich durch das umliegende Normalgewebe limitiert. So kann eine applizierte Strahlendosis nur immer so groß gewählt werden, dass das umliegende Gewebe nur so stark wie unbedingt notwendig belastet wird. Da aber das Dosisprofil der Röntgenstrahlung nach einem anfänglichen Maximum exponentiell abnimmt ist das Normalgewebe vor und hinter dem Tumor auch mitbelastet. Durch Verwendung mehrerer Bestrahlungsfelder, das heißt Bestrahlung des Tumors aus mehreren Richtungen, ist es möglich die effektive Dosis im Tumor zu steigern und das umliegende gesunde Gewebe so gering wie möglich zu belasten. In besonderer Form wird dieser Vorsatz bei der „Intensitätsmodulierten Radiotherapie“ (IMRT) angewendet. Hier wird nicht nur aus verschiedenen Richtungen bestrahlt, sondern auch die Intensität der Strahlung je nach Richtung variiert. So wird versucht das erzeugte Bestrahlungsfeld bestmöglich an das Tumolvolumen anzupassen. Schwerionen geben ihre Energie im Bragg-Peak ab. Dadurch ergibt sich für das davor und dahinter liegende Gewebe nur eine sehr geringe Belastung. Auch hier lassen sich die Reichweite und die Intensität des Strahls verändern und durch eine „Intensitätsmodulierte Partikeltherapie“ (IMPT) und die Verwendung mehrerer Strahlenfelder eine sehr gute Anpassung an das Tumolvolumen erreichen. Ein Vergleich von Behandlungsplänen durch IMRT und IMPT ist in Abbildung 7 gezeigt. Der zu bestrahlende Tumor ist weiß bzw. rot umrandet und die im Gewebe applizierte Dosis ist ansteigend farblich über blau, grün und gelb nach rot markiert. Es ist zu erkennen, dass sowohl für den Einsatz von neun Bestrahlungsfeldern IMRT als auch mit zwei Bestrahlungsfeldern IMPT eine gute Anpassung an das Tumolvolumen zu erreichen ist. Allerdings zeigt sich, dass das umliegende gesunde Gewebe bei einer IMRT-Bestrahlung deutlich mehr belastet wird, als während einer Behandlung mit Kohlenstoffionen.

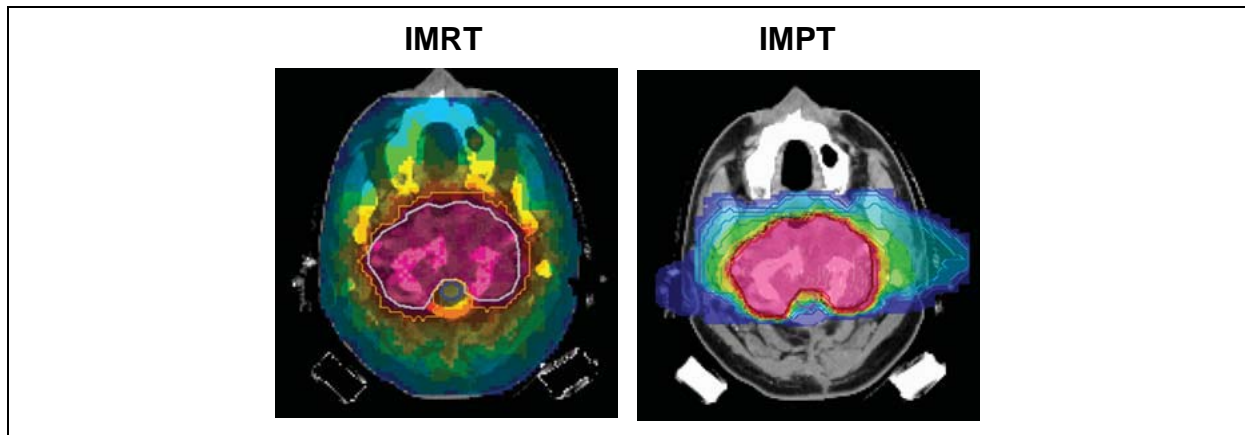


Abbildung 7: Vergleich der Anpassung der Bestrahlung an das Tumervolumen durch Röntgen- (IMRT) und ^{12}C -Strahlung (IMPT) (Amaldi und Kraft, 2007).

Die Abbildung zeigt Behandlungspläne für die Bestrahlung eines Gehirntumors mit Röntgen- (links IMRT) oder Kohlenstoffstrahlung (rechts IMPT). Die Farbverteilung im Schädelquerschnitt, gibt die Strahlenbelastung des Gewebes wider. Die Zunahme der Dosis wird von Blau über Grün und Gelb nach Rot dargestellt. Das Tumervolumen (weiße bzw. rote Linie) wird dabei durch IMRT (neun Bestrahlungsfelder) und durch IMPT (zwei Bestrahlungsfelder) gut abgedeckt, während das umliegende Normalgewebe unterschiedlich stark belastet wird.

Mit dem hier beschriebenen Verfahren, des Raster-scans und der Intensitätsanpassung an den Tumor mittels IMPT wurden in der GSI seit 1997 eine Vielzahl von Patienten mit Hirntumoren behandelt. Ergebnisse dieser Studien wurden 2007 von Schulz-Ertner et al. veröffentlicht und zeigten eine geringe Toxizität für die Patienten und eine hohe Effektivität der Tumorkontrolle (Schulz-Ertner et al., 2007b; 2007a).

Bisher wurde die Behandlung von Tumoren mittels Strahlentherapie ausgiebig erläutert. Bei der Behandlung einer Krebserkrankung muss aber auch immer das Stadium, in dem die Erkrankung erkannt wurde, berücksichtigt werden. Ein Kriterium für die Klassifizierung eines Tumors erfolgt dabei auch über das Vorhandensein von Metastasen im Körper. Die zellulären und molekularen Abläufe bei der Bildung von Metastasen sollen im Folgenden erläutert werden.

1.2 Metastasierung

Metastasierung ist ein Phänomen bei Tumorerkrankungen, welches die Therapiechancen stark beeinflusst. So sterben etwa 90 % aller Krebspatienten nicht am eigentlichen Primärtumor, sondern an den entstandenen Metastasen (Hanahan und Weinberg, 2000). Wird das Vorhandensein von Metastasen diagnostiziert, so ist eine erfolgreiche Therapie bedeutend schwieriger. Oft bilden sich nicht nur eine Tochtergeschwulst, sondern viele, die zum Teil auch über verschiedene Organe verteilt sein können. Ist ein solches Stadium erreicht, kann meist nur noch eine Chemotherapie Erfolg versprechen, da es selten möglich ist, alle Metastasen operativ oder durch Bestrahlung zu entfernen. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Entstehung von Metastasen und den molekularen Abläufen die dabei eine Rolle spielen.

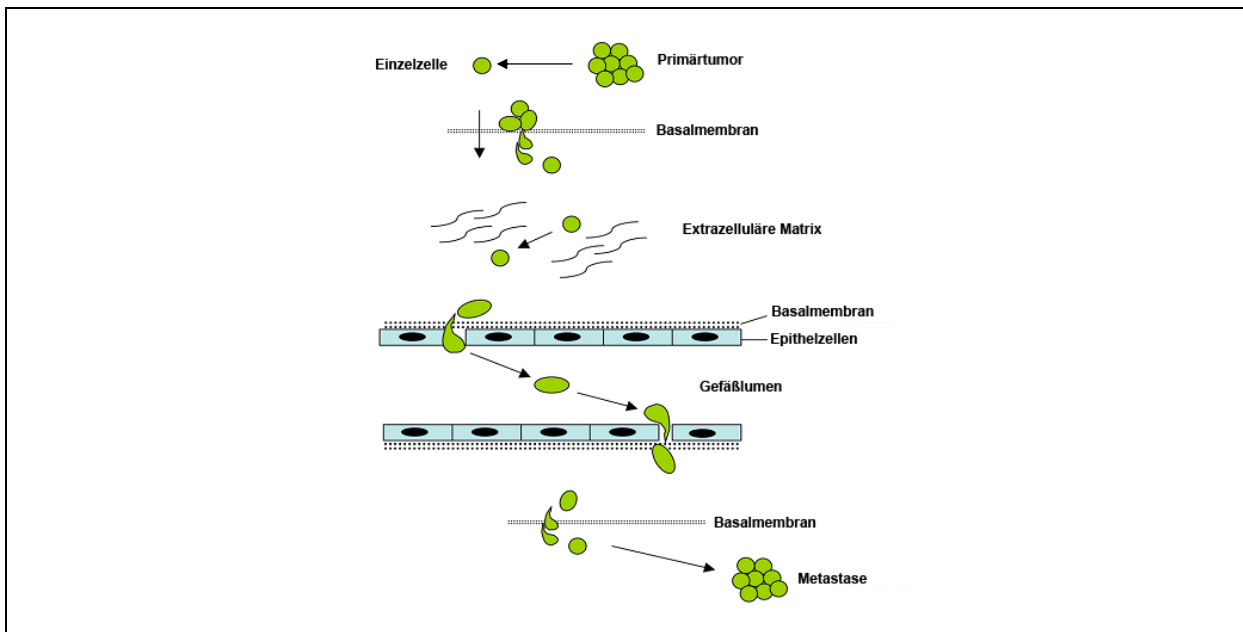


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bildung von Metastasen aus einem Primärtumor. Metastasen entstehen aus Zellen (grün dargestellt) die sich aus dem Verband des Primärtumors lösen, in Blut- und Lymphgefäße einwandern und über diese im Körper verteilt werden. In kleineren Kapillaren durchwandern die Tumorzellen erneut die Gefäßwand und bilden in den dahinterliegenden Organen Tochtergeschwülste.

Abbildung 8 zeigt schematisch die Metastasenentstehung. Aus dem Zellverband des Primärtumors lösen sich zu Beginn einzelne Zellen, welche dann in ein nahegelegenes Blut- oder Lymphgefäß einwandern. Über das Blut oder die Lymphe werden die Zellen durch den Körper „gespült“ bis sie in kleinen Kapillaren erneut die Gefäßwand durchdringen und in das dahinterliegende Gewebe einwandern. Durch vermehrte Zellteilung entsteht dann ein sekundärer Tumor, eine sogenannte Metastase. Die Fähigkeit der Tumorzellen zur Invasion und Metastasierung ermöglicht dem Krebszellen andere Organe zu besiedeln, in denen zu Beginn, eine wesentlich bessere Platz- und Nährstoffversorgung gegeben ist (Hanahan und Weinberg, 2000).

Der Prozess der Metastasierung ist sehr komplex und abhängig von der Fähigkeit der Zellen, die intakten Strukturen des Tumorgewebes zu verlassen und die physiologischen Barrieren der Basalmembran durch proteolytische Intra- und Extravasion zu umgehen (Ludwig, 2005). So erfolgt die Degradation der extrazellulären Matrix durch Ausschüttung von Proteasen, die so eine Öffnung für die wandernde Zelle in der extrazellulären Matrix liefern, welche die Zellen dann durchwandern. Daher spielt die Migration der Zellen entlang der extrazellulären Matrix ebenfalls eine wichtige Rolle und soll im nächsten Abschnitt besprochen werden.

1.2.1 Zellmigration

Die Zellmigration spielt nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen, sondern ist zudem in physiologischen Abläufen wie der Embryogenese, der Entzündungsantwort oder der Wundheilung wichtig (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Die Wanderung der Zellen läuft als „mehrstufiger“ zyklischer Prozess ab, dessen einzelne Schritte vielfach wiederholt werden.

Während der Migration behält die Zelle immer einen direkten Kontakt zu der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Diese besteht im Wesentlichen aus drei unterschiedlichen Komponenten: reißfesten Kollagenfasern unterschiedlicher Strukturen, Ankerproteinen wie Laminin und Fibronectin und raumfüllenden Proteoglykanen (Koolman und Röhm, 1998). Durch diese sie umgebende Struktur, die sowohl als Substrat als auch als Barriere wirkt, ist die Zelle genötigt, während der Wanderung ihre Form zu verändern (Friedl und Wolf, 2003).

Zu Beginn der Migration erfolgen eine Polarisation und Streckung der Zelle. Daraufhin werden Ausläufer, Pseudopodien oder auch Lamellipodien genannt, in Bewegungsrichtung ausgebildet. Diese haften sich über Adhäsionspunkte an die extrazelluläre Matrix an und erzeugen einen Zug der Zelle, der zur Verlagerung des Zellkörpers führt. Anschließend werden die Adhäsionspunkte am Ende der Zelle gelöst und neue Lamellipodien ausgebildet (Friedl und Wolf, 2003). Eine schematische Zeichnung in Abbildung 9 verdeutlicht die beschriebenen Schritte.

Die Bildung von Lamellipodien ist eine wichtige Voraussetzung für die Zellmigration, welche spontan entstehen oder durch Chemokine oder Wachstumsfaktoren induziert werden können (Friedl und Wolf, 2003). Die Zellausläufer enthalten Aktinfilamente und eine Vielzahl an Oberflächen- und Signalmolekülen, die eine dynamische Interaktion mit der Matrix ermöglichen und die Adhäsionspunkte der Zelle ausbilden. Die bei der Migration erzeugte Veränderung des Zellkörpers wird über strukturelle Änderungen der Aktinfilamente des Zytoskeletts erzeugt. Der Aufbau der Aktinfilamente wird, genau wie die ebenfalls unabdingbare Ausbildung der Adhäsionspunkte zwischen Matrix und Zelle, über Integrine beeinflusst. Deren Aufbau und Funktionsweise sollen im nächsten Abschnitt erläutert werden.

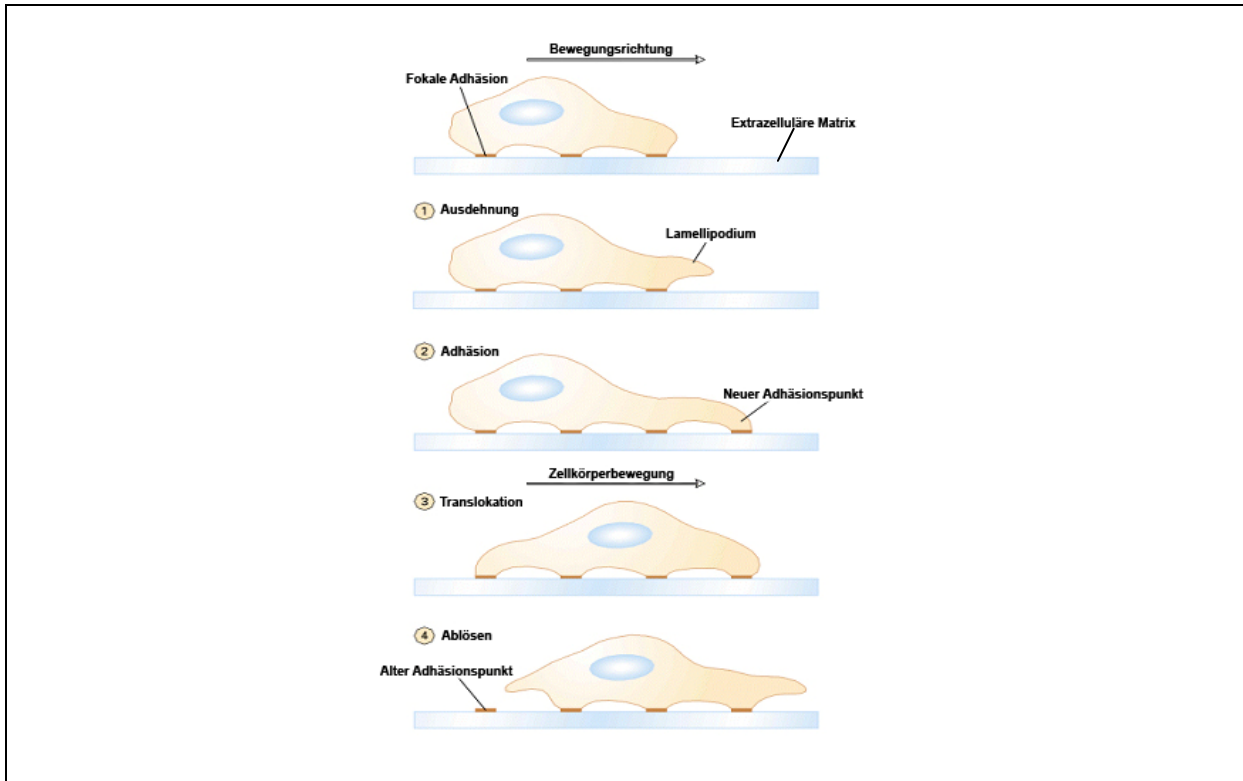


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zellmigration.

Die Zellmigration verläuft in vier sich wiederholenden Schritten ab. Zu Beginn erfolgt die Ausbildung von Lamellipodien in Richtung der Zellbewegung. Diese haften sich an die extrazelluläre Matrix an und bilden neue Adhäsionspunkte. Der Zellkörper wird dann in Bewegungsrichtung verschoben und die hintere Adhäsion der Zelle gelöst.

1.2.1.1 Integrine

Integrine bilden eine große Glykoproteinfamilie, die als heterodimere Oberflächenrezeptoren an Moleküle der extrazellulären Matrix binden. Die Transmembranproteine bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche nicht kovalent mit einander verbunden sind. Jede Untereinheit besitzt dabei eine große extrazelluläre Domäne, eine einzelne Transmembrandomäne und einen kurzen, nicht-katalytischen zytoplasmatischen Teil (Hood und Cheresch, 2002). Der schematische Aufbau eines Integrins ist in Abbildung 10 A gezeigt.

Bis heute sind 25 verschiedene Kombinationen aus den bisher bekannten 18 α - und acht β -Untereinheiten beschrieben. Integrine bilden Rezeptoren für Kollagen und Laminin, sowie für das Tripeptid RGD, welches in Fibronectin und Vitronectin vorkommt. Zudem gibt es Integrine, welche spezifisch Leukozyten binden (Hynes, 2002). Eine Übersicht über die Bindungsspezifitäten der verschiedenen Integrine zeigt Abbildung 10 B.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindungsspezifitäten der Integrine zum Teil auf die gleichen Liganden ausgerichtet sind. Allerdings bestimmt eine Kombination aus Expressions- und Aktivierungsmuster sowie die Verfügbarkeit der Liganden die Spezifität, mit der diese von den Integrinen gebunden werden (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Fibrinogen wird z.B. von den Integrinen $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ gebunden, wohingegen $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ Integri-

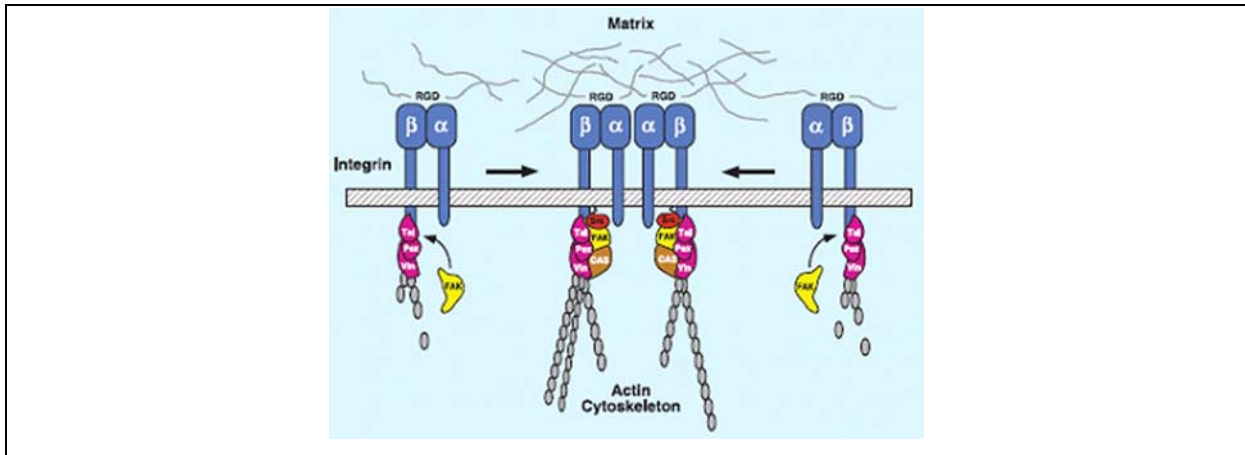


Abbildung 11: Interaktion von Integrinen und ECM – Ausbildung fokaler Adhäsionen (Giancotti und Ruoslahti, 1999).

Nach Bindung der spezifischen Liganden erfolgt ein Clustering der Integrine auf der Zelloberfläche. Dadurch wird die Assoziation mit Aktinfilamenten über die Proteine (pink) Talin (Tal), Paxillin (Pax) und Vinculin (Vin) gefördert, was in einem positiven Feed-Back Kreislauf ein weiteres Clustern der Integrine fördert. Zudem kommt es zu einer Bindung der Fokalen Adhäsionskinase FAK (gelb), über die weiter Signalwege initialisiert werden.

Neben der Aktivierung der Proteine, die die Integrine mit dem Aktinzytoskelett verbinden, kommt es auch zur Assoziation der Integrine mit der Fokalen Adhäsions Kinase FAK. Diese wird durch Autophosphorylierung aktiviert und leitet anschließend über verschiedenen Proteine die Signale in die Zelle weiter (Giancotti und Ruoslahti, 1999).

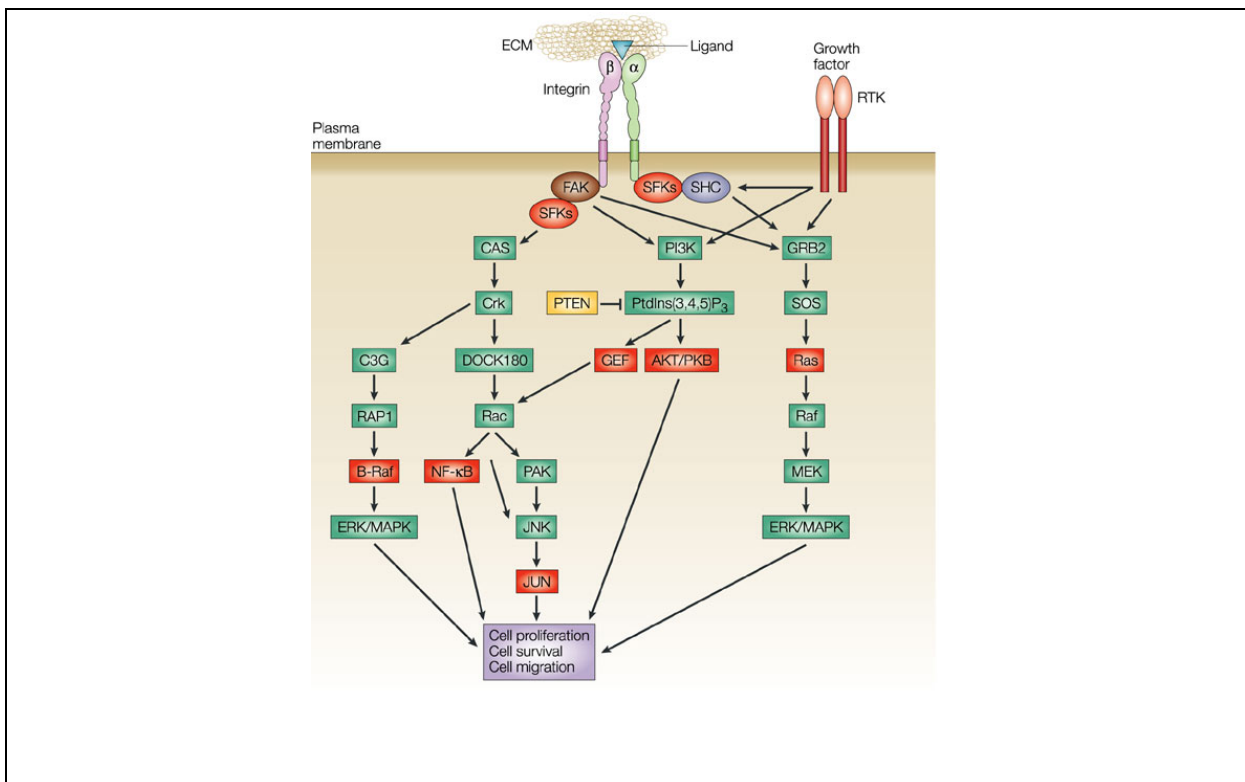


Abbildung 12: Integrin-Signalwege (Guo und Giancotti, 2004).

Gezeigt ist eine schematische Übersicht über die wichtigsten Signalwege, die durch Integrine beeinflusst werden. Durch eine Bindung von Integrinen an die extrazelluläre Matrix kommt es unter anderem zu Änderungen in der Proliferation, des Überlebens und der Migration der Zellen.

Eine Übersicht über die wichtigsten durch Integrine beeinflussten Signalwege sind in Abbildung 12 dargestellt. Über diese Signalwege kommt es zu Veränderungen der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Migration (Guo und Giancotti, 2004).

Ein zentrales Protein in diesen Signalkaskaden ist die Proteinkinase Akt. Dieses auch Proteinkinase B genannte Protein gehört zur Familie der Serin/Threoninkinasen und wurde 1991 von verschiedenen Arbeitsgruppen das erste Mal als 57 kD großes Protein beschrieben (Coffer und Woodgett, 1991; Jones et al., 1991). Heute sind drei verschiedenen Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 des Proteins mit einer hohen Homologie bekannt. Alle Isoformen werden ubiquitär in fast allen Zellarten und Gewebetypen exprimiert, auch wenn Akt3 ein etwas eingeschränktes Expressionsmuster zeigt (Toker und Yoeli-Lerner, 2006). Die Kinase spielt in vielen Signalwegen der Zelle eine entscheidende Rolle und hat daher Einfluss auf Transkription, Translation, Proliferation, Wachstum und Überleben (Osaki et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass Akt an der Ausschüttung von Metalloproteasen beteiligt ist, welche während der Invasion wichtig sind. Auch einen Einfluss auf die „Umstrukturierung“ des Aktinzytoskeletts konnte nachgewiesen werden (Toker und Yoeli-Lerner, 2006). Diese und andere Ergebnisse lassen auf eine wichtige Rolle von Akt bei der Migration schließen, welche zudem auch isoformspezifisch zu sein scheint (Stambolic und Woodgett, 2006). Die Aktivierung der Proteinkinase wird über die Bindung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphaten initiiert, welche zu Beginn der Signalkaskade von der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) gebildet werden. Durch diese Interaktion erfolgt eine Translokation von Akt an die innere Plasmamembran, wo sie von der Phosphoinositol-abhängigen Kinase 1 (PDK1) phosphoryliert wird. Die Proteinkinase Akt besitzt an den Aminosäuren Threonin308 (T308) und Serin473 (S473) zwei für eine vollständige Aktivierung wichtige Phosphorylierungsstellen. Zuerst wird die Aminosäure T308 phosphoryliert, wodurch Akt teilaktiviert wird; aber nur eine nachfolgende zusätzliche Phosphorylierung des Serinrestes führt zu einer maximalen Aktivität der Proteinkinase (Fresno Vara et al., 2004). Anschließend können durch Akt eine Vielzahl von Substraten phosphoryliert werden, um durch Signalweiterleitung auf die oben genannten Abläufe in der Zelle Einfluss zu nehmen.

Eine Hauptaufgabe während dieser Arbeit bestand in der Untersuchung von Änderungen in der Zellmigration. Daher soll im Folgenden Abschnitt erläutert werden welchen Möglichkeiten des Versuchsaufbaus bestehen und wie hier vorgegangen wurde.

1.2.1.2 Methoden zur Beurteilung der Zellmigration

Die Migration von Zellen lässt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf verschiedene Weise untersuchen. Versuche *in vivo* beruhen auf der Detektion von vorher markierten Zellen, die sich dann über *in vivo* imaging oder über eine intravitale Mikroskopie verfolgen lassen (Entschladen et al., 2005). *In vitro* Untersuchungen können als 2D Oberflächen-Assay, als Filter-Assay oder als 3D Matrix-Assay durchgeführt werden. Diese drei Varianten sind in Abbildung 13 schematisch gezeigt. Dabei gibt es für jede Variante der Zellmigrationsuntersuchungen Vor- und Nachteile, die bei der Versuchsplanung mit einbezogen werden sollten (Entschladen et al., 2005). Während dieser Arbeit wurde die Zellmigration mit einem Filter-Assay in einer sogenannten Boydenkammer untersucht.

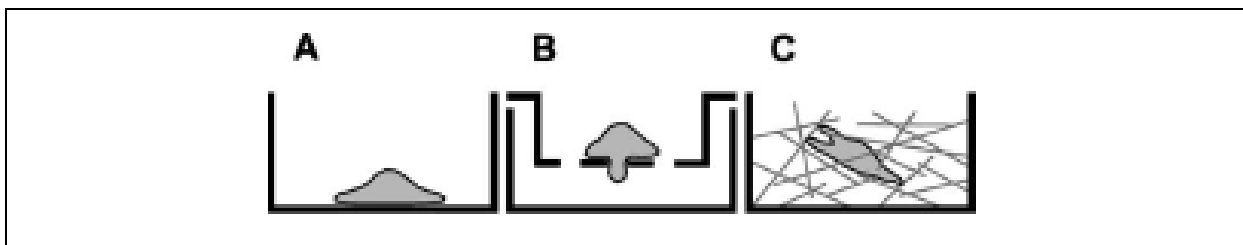


Abbildung 13: Möglichkeiten der Zellmigrationsuntersuchungen (Entschladen et al., 2005).
 (A) 2D Oberflächen-Assay auf beschichteten Petrischalen , (B) Filter-Assay, (C) 3D Matrix-Assay.

Der Aufbau einer Migrationskammer wurde 1962 von Stephen Boyden beschrieben und trägt seitdem auch den Namen „Boydenkammer“ (Boyden, 1962). Diese dient der Untersuchung der Zellmigration, indem Zellen durch Poren einer Polykarbonatmembran (weiterhin Filter genannt) wandern. Die Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, welche mit Zellmedium gefüllt und durch den Filter voneinander getrennt sind. Dieser besitzt Poren, welche kleiner sind als das durchschnittliche Zellvolumen (hier $8 \mu\text{m}$), durch welche die Zellen von einer Seite der Kammer auf die andere gelangen können. Ausgewertet werden nach beendeter Inkubationszeit, die Anzahl der Zellen, die vom oberen Kompartiment die Unterseite des Filters erreicht haben. Je nach Versuchsaufbau, kann so die Migration, Invasion oder auch die Wirksamkeit chemotaktischer Stoffe untersucht werden.

Abbildung 14 zeigt zum einen die Einzelteile einer Boydenkammer mit Unterseite, Oberseite, Dichtung und Schrauben, sowie die zusammengebaute Kammer (A). Diese besteht dann aus 48 Vertiefungen die alle als eigene Reaktionskammer fungieren. So ist es möglich eine Vielzahl von Ansätzen parallel bzw. für wenige Ansätze Mehrfachbestimmungen durchzuführen. In Abbildung 14 A nicht gezeigt ist der ebenfalls benötigte Filter. Dieser ist in Abbildung 14 B im dargestellten schematischen Aufbau eines Wells gezeigt und befindet sich zwischen den beiden Kompartimenten (schwarz-weiße Linie). Er wird in dem hier gewählten Aufbau mit Kollagen (gelb dargestellt) und Gelatine (rot dargestellt) beschichtet. Die Kollagenbeschichtung auf der Oberseite des Filters dient zum einen der Anheftung der Zellen an den

Filter, stellt zum anderen aber auch eine Barriere dar, welche die Zellen nur durch enzymatische Proteolyse durchdringen können. Die Unterseite des Filters wird mit Gelatine beschichtet. Dadurch werden die Zellen auf dem Filter festgehalten, so dass sie nicht in das untere Flüssigkeitsreservoir übertreten. So wird eine vollständige Detektion aller gewanderten Zellen ermöglicht.

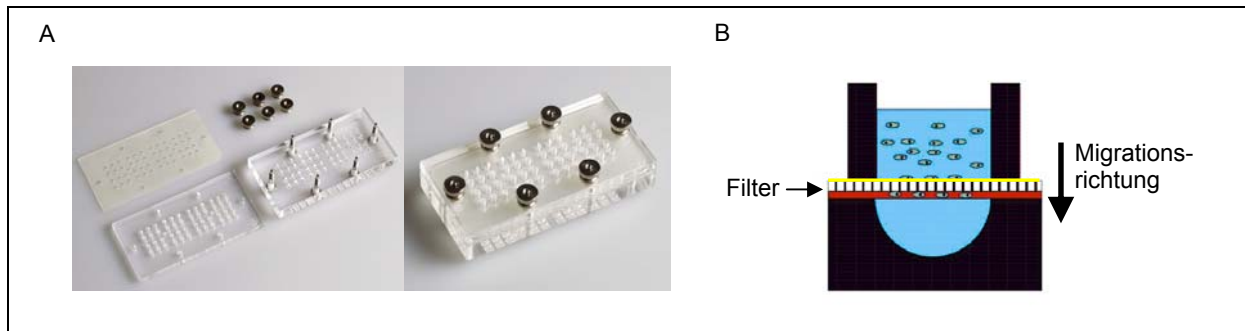


Abbildung 14: Fotografische Darstellung einer Boydenkammer (NeuroProbe Inc., 2003) und schematischer Aufbau eines Wells.

(A) zeigt die Einzelteile der Boydenkammer mit Unterteil mit 48 Vertiefungen, Oberteil mit der gleichen Anzahl Bohrungen und Dichtung und Schrauben auseinander und zusammengebaut. (B) zeigt im Querschnitt den schematischen Aufbau eines Wells. Dieses ist komplett mit Medium gefüllt (hellbau) und durch dem beschichteten Filter in zwei Kompartimente geteilt (Beschichtung: gelb = Kollagen, rot = Gelatine).

In dem hier gewählten Aufbau konnte sowohl die Migration als auch die Invasion von Zellen untersucht werden. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass das auf den Filter aufgebrachte Kollagen erst von den Zellen proteolysiert werden muss, bevor sie auf die andere Seite gelangen. Da diese Proteolyse ein Teil der Invasionseigenschaften von Zellen *in vivo* ausmacht, ist dieser Aspekt der Zellfunktion hier miterfasst. Im Weiteren wird der Einfachheit halber aber nur noch von Migration die Rede sein. Der Migrationsassay der Boydenkammer wurde vor allem deshalb gewählt, da es mit dieser Methode möglich ist, sehr gut standardisierte und dennoch vielseitige Protokolle zu entwerfen, mit denen eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen ist.

1.2 Aufgabenstellung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Migrationsverhaltens von Tumorzellen nach Bestrahlung. Dazu sollten verschiedene Tumorzelllinien untersucht und das Verhalten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Schwerionen miteinander verglichen werden.

In der onkologischen Radiotherapie kann eine Vielzahl von Primärtumoren heute sehr gut behandelt werden. Dies liegt vor allem an stark verbesserten Diagnose- und Früherkennungsmethoden, die zum Teil eine bessere Prognose versprechen. (Robert Koch-Institut, 2008). Aus diesem Grund rückt die Bildung von Metastasen für eine wirksame Therapie immer mehr in den Vordergrund. Es stellt sich daher die Frage, in wie weit eine Tumorthherapie eine Metastasierung des Primärtumors fördert. Der Möglichkeit einer radiotherapie induzierten Bildung von Metastasen sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden.

Die Behandlung von Tumoren mit Röntgenstrahlung stellt ein sehr gängiges Verfahren für eine Therapie dar. Für diese konventionelle Methode konnten anderen Arbeitsgruppen schon Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Bestrahlung von Tumorzellen und einem erhöhten migratorischen Potential der Zellen dokumentieren. So wies die Arbeitsgruppe um Wild-Bode eine erhöhte Migration und Invasion von bestrahlten Gliomzellen *in vitro* nach (Wild-Bode et al., 2001). Auch *in vivo* konnten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Bestrahlung und Metastasenbildung gefunden werden. Rofstad et al. veröffentlichten Ergebnisse die zeigten, dass eine sublethale Bestrahlung von Melanom-Xenografts zu einer erhöhten Bildung von Lungenmetastasen führte (Rofstad et al., 2004).

Neben der Migration von Zellen wird auch die Integrinexpression nach Röntgenbestrahlung verändert. Cordes et al. konnten in verschiedenen Gliomzelllinien eine erhöhte Expression von β_1 und β_3 Integrinen feststellen (Cordes et al., 2003). Meineke et al. detektierten zudem eine zeitabhängige Zunahme der Integrine α_1 , α_2 , α_6 und β_1 nach Bestrahlung. Zusätzlich konnte hier eine dosisabhängige Zunahme von β_1 Integrinen nachgewiesen werden (Meineke et al., 2002).

Einen Einfluss der Proteinkinase Akt auf die Migration von Tumorzellen wurde ebenfalls von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt. Dabei wird den bekannten Akt-Isoformen unterschiedliche Aufgaben in der Signaltransduktion zugeschrieben (Stambolic und Woodgett, 2006). Im Hinblick auf eine veränderte Akt-Expression nach Bestrahlung ist allerdings wenig bekannt. In diesem Zusammenhang wurde zum großen Teil nur die Aktivierung von Akt untersucht und eine vermehrte Phosphorylierung der Proteinkinase nach Bestrahlung festgestellt (Park et al., 2006).

Die Behandlung von Tumoren mit Schwerionen ist ein neueres Verfahren, das bisher nur für einige wenige Tumorarten eingesetzt wird (Schulz-Ertner et al., 2006). Für den Einfluss die-

ser Bestrahlungsart auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen ist daher bisher wenig bekannt. Ogata et al. konnten 2005 zeigen, dass es nach Bestrahlung von verschiedenen Tumorzelllinien mit ^{12}C -Ionen zu einer verringerten Migration nach Bestrahlung kommt (Ogata et al., 2005). Informationen über eine strahlenvermittelte Beeinflussung der Integrin- oder Akt-Expression sind bisher nicht bekannt, so dass im Moment kaum Aussagen über das Migrationsverhalten von Tumorzellen nach Schwerionenbestrahlung getroffen werden können. Diese Lücke sollte mit Hilfe dieser Arbeit zumindest teilweise geschlossen werden.

Folgende Aufgaben waren zu bearbeiten:

- Standardisierung der Migrationsuntersuchungen für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse
- Erfassung der Migration von Tumorzellen *in vitro* nach Schwerionenbestrahlung im Bragg-Peak im Vergleich zur herkömmlichen Röntgenstrahlung
- Strahlenwirkung auf die Migration in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung
- Detektion strahlungsinduzierter pro- oder antimigratorischer Proteine
- Dokumentation eines potentiellen Zusammenhangs zwischen Migrationseffekten und strahlenbiologischen Endpunkten, z.B. klonogene Überlebensrate

2 Material und Methoden

Die Zusammensetzung aller hier aufgeführten Puffer und Lösungen findet sich, ebenso wie die Firmen der verwendeten Geräte und Chemikalien im Anhang.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zellen

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden drei verschiedenen humane Tumorzelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um die Glioblastomzelllinie U87MG (ATCC Nr.: HTB-14) und um die kolorektale Karzinomzelllinie HCT116 (ATCC Nr.: CCL-247), sowie ein Derivat in dem beide Allele des Gens p21 ausgeschaltet wurden (= HCT116 p21^{-/-}; Waldman et al., 1995).

Die Zelllinie U87MG (ab hier nur noch U87 genannt) wurde Ende 1960 aus einem primären Glioblastom/Astrozytom einer 44jährigen Patientin etabliert. Zum Zeitpunkt der Entnahme wurde das Tumorstadium als Grad III klassifiziert. Die Zellen wurden freundlicher Weise von W. Wick zur Verfügung gestellt.

Aus einem primären Kolonkarzinom eines männlichen Erwachsenen wurde 1981 die epitheliale Tumorzelllinie HCT116 etabliert (Brattain et al., 1981). Aus dieser konnte 1995 die Zelllinie HCT116 p21^{-/-} erzeugt werden. Dazu wurden beide Allele des Gens p21 durch homologe Rekombination durch ein Geneticin-Resistenzgen ersetzt (Waldman et al., 1995). Durch eine zeitweise Zugabe des entsprechenden Antibiotikums konnten diese Zellen selektiert werden (s. 2.1.2). Beide Kolonkarzinomzelllinien wurden freundlicher Weise von B. Vogelstein zur Verfügung gestellt.

Alle drei untersuchten Zelllinien wuchsen adhärent in Zellkulturgefäßen.

2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die humanen Tumorzelllinien wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurden die Zellen so ausgesät, dass sie montags und freitags als konfluenter Zellrasen passagiert werden konnten. Mittwochs erfolgte zusätzlich ein Medienwechsel. Für die Migrationsversuche wurden die Zellen mit definierter Zellzahl ausgesät. Ansonsten erfolgte eine Verdünnung der Zellen von 1:3 bis 1:5 (U87) bzw. 1:10 bis 1:20 (HCT116 und HCT116 p21^{-/-}).

Das Passagieren der Zellen begann mit dem Entfernen des Mediums aus den Kulturflaschen und dem Spülen des Zellrasens mit HANK's Lösung, um Medienreste zu entfernen und die für die Adhäsion der Zellen wichtigen Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen durch das im HANK's enthaltene EDTA zu komplexieren. Nach Abschütten der HANK'sschen Lösung, erfolgten die Zugabe

von Trypsin und die Inkubation der Zellen für 1:30 Minuten bei Raumtemperatur. Die so abgelösten Zellen wurden dann durch Zugabe von frischem Medium resuspendiert und anschließend je nach Konfluenz der Zellen verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Die genauen Mengenangaben, abhängig von der Größe der verwendeten Zellkulturgefäße finden sich im Anhang (s. 6.2.1).

Aufgrund des ausgeschalteten p21 Gens der Zelllinie HCT116 p21^{-/-} mussten diese Zellen alle sechs bis acht Wochen selektiert werden. Dazu wurde für zehn Tage das Antibiotikum Geneticin (G418) in einer Endkonzentration von 400 µg/ml zum Medium gegeben. Durch den rekombinanten Austausch des Gens für p21 gegen die entsprechende Antibiotikaresistenz konnte sichergestellt werden, dass nur Zellen kultiviert wurden in denen kein p21-Gen vorhanden war.

2.1.3 Automatisierte Zellzählung

Für die Aussaat definierter Zellzahlen in neue Kulturflaschen oder der Bestimmung der Zellkonzentration für Migrationsversuche, wurden die Zellen, wie unter 2.1.2 beschrieben, abgelöst. 100 µl (HCT116 und HCT116 p21^{-/-}) bzw. 200 µl (U87) der so erhaltenen Zellsuspension wurden dann mit 10 ml isotonischer Casytonlösung gemischt, um anschließend in einem Zellzählgerät (Casy[®] 1 TT, Schärfe System) die Zellkonzentration und die Verteilung der Zelldurchmesser zu ermitteln.

2.1.4 Wachstumskurven

Um zu bestimmen, in welchen Abständen sich die verwendete Zellpopulation in der Zellkultur verdoppelt, wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu erfolgte die Aussaat definierter Zellzahlen in 24-Well Platten mit anschließender Bestimmung der Zellzahlen (s. 2.1.3) in vier Wells in definierten Zeitintervallen über einen Zeitraum von etwa 14 Tagen. Anschließend wurden die ermittelten Zellzahlen gegen die Wachstumsdauer in Stunden halblogarithmisch aufgetragen. Über eine lineare Regression durch die Messpunkte im Bereich des linear exponentiellen Wachstums ließ sich dann die Verdopplungszeit berechnen.

2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung der Zellen erfolgte das Einfrieren in flüssigen Stickstoff bei -192 °C. Die abgelösten Zellen (s. 2.1.2) wurden dafür in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (1600 rpm, 6 Minuten, 4 °C; Megafuge 1.0R, Heraeus). Das so erhaltene Zellpellet wurde erneut in Medium aufgenommen, welches 10 % DMSO enthielt. Je nach Konfluenz erfolgte das Aufteilen der Suspension in 3-6 Aliquots à 1 ml pro Kryo-Röhrchen in einem speziellen Einfrierbehälter in dem die Zellen mit 1 °C pro Minute bis -70 °C eingefroren wurden. Dies langsame Herunterkühlen und die Zugabe des DMSO verhinderte die Wasser-

kristallbildung, die die Zellen beim Auftauen zerstören würde. Eine Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff erfolgte am nächsten Tag.

2.1.6 Auftauen von Zellen

Der Vorgang des Auftauens sollte im Gegensatz zum Einfrieren (s. 2.1.5) schnell von Statten gehen. Dazu wurden 10 ml des entsprechenden Mediums in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die tief gefrorenen Zellen nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37 °C schnell hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 1600 rpm, 6 Minuten und 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus). Nach Aufnahme des Pellets in frischem Medium und dessen Überführung in eine Zellkulturflasche, wurde zur vollständigen Entfernung des DMSO aus der Kultur am folgenden Tag ein Medienwechsel vorgenommen.

2.1.7 Mykoplasmen-PCR

Eine Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen lässt sich im Gegensatz zu anderen Bakterienkontaminationen nicht durch augenscheinliche Veränderungen feststellen. Vielmehr leben diese Bakterien sowohl intra- als auch extrazellulär, wodurch sie den Metabolismus, die Proteinsynthese und die Proliferation der Zellen beeinflussen. Um die Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleisten zu können, muss eine Kontamination mit Mykoplasmen in der Zellkultur ausgeschlossen werden.

Dazu erfolgte in regelmäßigen Abständen von vier bis sechs Monaten Mykoplasmentests mit Hilfe eines kommerziellen PCR-Tests in den verwendeten Zellkulturen. Dieser beruht auf dem Nachweis einer 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Dabei hat das amplifizierte, potentiell vorhandene DNA-Segment eine Größe von 270 bp und könnte gegebenenfalls in einem Agarosegel sichtbar gemacht werden.

2.1.7.1 Vorbereitung der Proben

Hier erfolgte der Nachweis der Mykoplasmen-DNA aus dem Medienüberstand von zwei bis drei Tage alten Kulturen, in denen die Zellen konfluent gewachsen waren. Das heißt bevor Zellen passagiert wurden, wurde 1 ml Medium entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank gelagert. Dort war es bis zu zwei Wochen haltbar.

100 µl des Überstands wurden dann in ein 0,2 ml großes Reaktionsgefäß überführt und im Thermocycler für 5 Minuten bei 99,9 °C erhitzt. Dies diente der Denaturierung von im Überstand vorhandener Proteine, die bei der späteren PCR gestört hätten. Diese wurden anschließend durch eine kurze Zentrifugation (5 Sekunden) bei 13000 rpm (Biofuge 15, Heraeus) abzentrifugiert.

2.1.7.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Der unter 2.1.7.1 hergestellte Überstand wurde dann in die eigentliche PCR eingesetzt. Neben den zu untersuchenden Proben wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Ebenso enthielt der verwendete Test eine interne Kontrolle, die es ermöglichte den erfolgreichen Ablauf der PCR sicherzustellen. Das Pipettierschema und der Ablauf der PCR sind in Tabelle 3 bzw. Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Pipettierschema der Mykoplasmen-PCR.

	Volumen [µl]
Aqua dest.	15
10x Puffer	2,5
dNTPs / Primer	2,5
MgCl₂	2,5
Interne Kontrolle	1,0
Taq Polymerase	0,5
Probe	1,0

Die angegebenen Mengen entsprechen dem Volumen für eine Probe.

Tabelle 4: Ablauf der Mykoplasmen-PCR.

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	2	1
55	2	
72	2	
94	0,5	34
55	1	
72	1	
72	4	1
4	--	

2.1.7.3 Agarosegelelektrophorese

Die Detektion der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte nach Beendigung der PCR (s. 2.1.7.2) durch Auftragung der Proben auf einem 1,5%igen Agarosegel. Dazu wurden 0,75 g Agarose in 50 ml 0,5x TBE Puffer in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen mit 2,5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agarose wurde dann in die vorbereitete Gelkammer gegeben und aushärten gelassen. Das Beladen des Gels mit den PCR-Proben fand im Anschluss durch versetzen von 10 µl Probe mit 2 µl 5x Ladepuffer und Auftragung in die Taschen statt. Zur Größenabschätzung wurde ein 100 bp Marker mitgeführt. Bei 160 V

für 20 Minuten erfolgte die Elektrophorese an die sich das Sichtbarmachen und Fotografieren der Banden unter UV-Licht anschloss.

2.1.8 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen fand in der GSI in Darmstadt statt. Dafür wurden die Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und im Auto nach Darmstadt transportiert. Für einen schonenden Transport der Zellen wurden die Kulturflaschen am Tag des Experiments komplett mit entsprechendem Medium aufgefüllt und in einer Styroporbox nach Darmstadt transportiert. An die Bestrahlung der Zellen schlossen sich der Rücktransport nach Mainz und die Durchführung der eigentlichen Versuche an. Während der Bestrahlung wurden die Zellen bei Raumtemperatur gehalten, lediglich bei langen Wartezeiten während der Schwerionenbestrahlung erfolgte eine zwischenzeitliche Lagerung der Zellen im Brutschrank. Transport und Bestrahlung der Zellen dauerten zwischen drei - fünf Stunden.

2.1.8.1 Röntgenbestrahlung

Für die Röntgenbestrahlung der Zellen kam die Röntgenröhre Isovolt DS1 (Seifert) zum Einsatz, und zwar mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einem Kathodenstrom von 16 mA. Durch einen Filter aus Beryllium, Aluminium und Kupfer (Dicke der Schichten: 7 mm / 1 mm / 1 mm) wurde die weiche Röntgenstrahlung absorbiert.

Der Aufbau der Röhre sah vor, dass die Zellkulturflaschen waagrecht bestrahlt wurden. Dabei entschied der Abstand der Flaschen vom Fokus der Röhre über die Intensität der Strahlung während des Versuchs. Hier wurde mit einem Abstand von etwa 41,5 cm gearbeitet (21,5 cm Abstand Röntgenröhre zu Filter + 20 cm Abstand Filter zu Boden der Zellkulturflasche), so dass alle Zellen mit etwa 2 Gy/Minuten bestrahlt wurden. Die Bestimmung der Dosis erfolgte mit dem Dosimeter SN4. Dieses befand sich während des Versuchs direkt unterhalb der Wachstumsfläche der Kulturflaschen, wodurch eine genaue Dosimetrie gewährleistet war. Die Zellen wurden mit 1 Gy, 3 Gy oder 10 Gy bestrahlt.

2.1.8.2 Schwerionenbestrahlung

Ebenfalls an der GSI fand die Bestrahlung der Zellen mit ¹²C⁶⁺-Ionen statt. Dies geschah in den Nachtschichten der Patientenstrahlzeit, am Patientenstrahlplatz (Cave M) des Schwerionensynchrotrons (SIS). Dort wurden die Zellen mit einer Strahlenergie von 270 MeV/u in der Mitte eines 1 cm ausgedehnten Bragg-Peaks (mittlerer LET von 100 keV/μm) bestrahlt.

Der waagrecht austretende Strahl der Beschleunigeranlage erforderte das Aufstellen der Zellkulturflaschen. Um ein Austrocknen der Zellen während der Bestrahlung zu verhindern mussten die Flaschen daher vollständig mit Medium gefüllt sein. Da dies aber auch schon für den Transport erforderlich war, waren keine weiteren Vorkehrungen nötig. Für die Bestrahlung wurden die Flaschen daher mit der Wuchsfläche senkrecht zur Strahlrichtung auf Holz-

klötze auf ein Förderband gestellt. Zum Abbremsen des Strahls wurde vor den Austrittskanal des Schwerionenstrahls eine 1 cm dicke Plexiglasplatte angebracht. Dahinter wurden sechs Flaschen gleichzeitig anhand eines Laserstrahlensystems so ausgerichtet, dass sich die Bewuchsfläche in der Mitte des ausgedehnten Bragg-Peaks befand. Vom Kontrollraum aus konnte dann sowohl der Schwerionenstrahl, als auch das Förderband gesteuert werden. Bestrahlt wurden die Zellen mit Strahlenergie die Äquivalentdosen von 1 Gy, 3 Gy bzw. 10 Gy entsprachen.

2.1.9 Zellüberleben nach Bestrahlung

Um die Effektivität einer Strahlenbehandlung *in vitro* zu testen, kann sowohl das klonogene Überleben der Zellen als auch deren Zellvitalität gemessen werden. Hier wurde zum einen das klonogene Überleben sechs Tage nach Bestrahlung mittels Klonogenitätstest („plating efficiency“ PE) als auch die Zellvitalität mittels XTT-Test nach der gleichen Zeit ermittelt. Für beide Untersuchungen wurden die Zellen wie unter 2.1.2 beschrieben abgelöst und nach 2.1.3 gezählt. Anschließend wurden die Zellen, wie im Folgenden erläutert, ausgesät und behandelt.

2.1.9.1 Kolongenitätstest (PE)

Bei der Bestimmung der „plating efficiency“ (PE) wurde die Anzahl sogenannter klonogener Zellen ermittelt. Dies sind Zellen die auch nach einer Behandlung mit Röntgen- oder Schwerionenstrahlung in der Lage sind, sich mehr als sechs Mal zu teilen. Dazu wurden die Zellen sehr dünn ausgesät und für die Dauer von sechs Zellteilungen im Brutschrank inkubiert. So entstanden aus lebenden, einzeln anhaftenden Zellen durch Zellteilung Einzelzellkolonien. Von diesen Zellen wurde angenommen, dass sie auch *in vivo* in der Lage wären nach einer ähnlichen therapeutischen Behandlung zu überleben.

Für die Bestimmung wurden die Zellen in Dreifachbestimmungen mit 20 Zellen/cm² und 50 Zellen/cm² in 6-Well Platten ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Nach sechs Tagen wurde das Medium der Zellen entfernt, und die Kolonien durch Zugabe von 2 ml einer 0,1 % Methyleneblaulösung für 30 Minuten gefärbt.

An das Einscannen der 6-Well Platten schloss sich die computergestützt Bestimmung der Anzahl gebildeter Kolonien in jedem Well mit Hilfe der Programme Photoshop CS2 und Excel. Aus der Anzahl gebildeter Kolonien in Bezug zur eingesäten Zellzahl ergab sich die PE. Die Überlebensrate bzw. das „relative Überleben“ errechnete sich aus dem Verhältnis der PE von behandelten zu unbehandelten Zellen.

2.1.9.2 XTT

Der hier durchgeführte XTT-Test ermöglicht es, die zelluläre Aktivität anhand der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität zu messen. Dabei wird den Zellen ein Tetrazolring-Molekül (XTT) zugesetzt, welches von den mitochondrialen Dehydrogenasen in ein Orange farbenes Endprodukt gespalten wird. Die dadurch erzeugte Farbänderung der Lösung lässt sich im Mikroplate-Reader messen. Hier wurde der Test sowohl als Toxizitätstest 16 Stunden nach Aussaat der Zellen, als auch als Ersatz für den unter 2.1.9.1 beschriebenen Klonogenitätstest genutzt.

Für die Untersuchung der Zellvitalität wurden die Zellen in Dreifachbestimmung in 96-Well Platten mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen/Well ausgesät und ebenfalls für sechs Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernen des Mediums und Zugabe von $150\ \mu\text{l}$ sterilem PBS wurden pro Well $30\ \mu\text{l}$ in PBS angesetztes XTT zugegeben. Die Messung der Zellvitalität im Mikroplate-Reader bei $450\ \text{nm}$ und $655\ \text{nm}$ erfolgte nach einer Inkubationszeit von zwei – drei Stunden. Dabei diene der Messwert bei $450\ \text{nm}$ als Korrekturwert für die Eigenabsorption der Platte. Dieser wurde von dem bei $655\ \text{nm}$ ermitteltem Messwert abgezogen. Bei der hier verwendeten relativen Auswertung der Ergebnisse wurde die Extinktion der unbehandelten Probe als $100\ \%$ gesetzt.

2.1.10 Zellmigration

Mit Hilfe der Boydenkammer wurde die Beeinflussung der Zellmigration durch Bestrahlung ermittelt. In diesen speziellen Kammern kann der Anteil wandernder Zellen in einer zu untersuchenden Zellsuspension bestimmt werden. Dabei erfolgte die Migration der Zellen durch einen Polykarbonatfilter der zuvor mit Kollagen auf der Oberseite und mit Gelatine auf der Unterseite beschichtet wurde. Somit gelang eine Annäherung an *in vivo* Bedingungen durch Imitation der extrazellulären Matrix. Eine genauere Beschreibung des Aufbaus findet sich unter 1.2.1.2.

2.1.10.1 Aussaat der Zellen

Für jede verwendete Zelllinie wurden vor Beginn der eigentlichen Versuche der optimale Zeitpunkt und die optimale Zellzahl für die Aussaat bestimmt. Für U87 Zellen erwies sich eine Aussaat von 1×10^4 Zellen/ cm^2 vier Tage vor Versuchsbeginn als optimale Ausgangsbedingung. Für HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen war dies eine Aussaat von 4×10^4 Zellen/ cm^2 drei Tagen vor Versuchsbeginn. Dem entsprechend wurden die Zellen abgelöst, gezählt und in $25\ \text{cm}^2$ Zellkulturflaschen ausgesät. Für jeden Ansatz wurden mindestens acht kleine Flaschen ausgesät, um die Migration der Zellen sowohl direkt nach Bestrahlung (0 Stunden), als auch 24 Stunden nach Bestrahlung zu erfassen.

2.1.10.2 Vorbereitung der Filter

Für die Untersuchung der Migrationseigenschaften der Tumorzellen wurden die entsprechenden Boydenkammerfilter mit Kollagen und Gelatine beschichtet. Der Filter bestand aus zwei unterschiedlichen Seiten und enthielt Poren mit einem Durchmesser von 8 μm . Die glatte Startseite, die mit Kollagen beschichtet wurde, diente der Imitation der extrazellulären Matrix und hinderte die Zellen daran, ohne Proteolyse der Kollagenschicht durch die Poren der Membran zu wandern. Die angeraute Ankunftsseite wurde mit Gelatine beschichtet, was den gewanderten Zellen zum besseren Anhaften an der Filterunterseite verhalf und ein Abfallen der Zellen in die unteren Vertiefungen der Boydenkammer verhinderte. So gelang es, die Bedingungen der Zellmigration *in vivo* nah zu gestalten und die Anzahl gewanderter Zellen möglichst genau zu bestimmen.

2.1.10.2.1 Kollagenbeschichtung

Zur Beschichtung wurden für die eingesetzten Zelllinien unterschiedliche Kollagenarten verwendet. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass durch die Kollagenart der Anteil gewanderter Zellen unter Kontrollbedingungen bei etwa 15 % lag. Für U87 Zellen wurde humanes Kollagen IV aus der Plazenta verwendet, während für beide HCT116 Zelllinien Kollagen I aus dem Schwanz der Ratte zum Einsatz kam. Beide verwendeten Kollagenlösungen wurden mit einer Endkonzentration von 1,5 mg/ml eingesetzt. Bei einer gleichmäßigen Verteilung auf dem Filter entsprach das einer Beschichtung von 9,75 μg Kollagen pro cm^2 .

Vor Beginn der eigentlichen Beschichtung musste der Filter markiert werden, um eine spätere Orientierung während des Experiments zu erleichtern. Daher wurde die linke untere Ecke jedes Filters abgeschnitten (bei Orientierung der Startseite nach oben). Anschließend erfolgte die Beschichtung der Startseite mit 130 μl Kollagenlösung. Diese wurde erst topfenweise auf den Filter aufgebracht, durch Zusammenklappen des Filters gleichmäßig auf der gesamten Fläche verteilt und bei Raumtemperatur auf Zellstoff getrocknet.

2.1.10.2.2 Gelatinebeschichtung

Für die Beschichtung der Ankunftsseite kam eine 1x Gelatinelösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml zum Einsatz. 200 ml dieser Lösung reichten in einer großen Petrischale zur gleichzeitigen Beschichtung von bis zu fünf Filtern. Diese wurden vorsichtig auf die Flüssigkeit aufgelegt, so dass die Startseite nicht benetzt wurde. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation im Brutschrank. Es schloss sich eine ebenso lange Inkubation der Filter bei Raumtemperatur und das Entfernen der nicht am Filter anhaftenden Gelatine durch vorsichtiges Auflegen der Filter auf PBS und Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur an. Der letzte Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde die gelatine-

beschichtete Seite des Filters kurz auf Aqua dest. und dann mit der frisch beschichteten Seite nach oben auf Zellstoff zum Trocknen gelegt.

2.1.10.3 Beschickung der Boydenkammer

Zur Beschickung der Boydenkammer wurden die Zellen wie unter 2.1.2 beschrieben abgelöst und nach 2.1.3 gezählt. Anschließend erfolgte für jede Zelllinie die Einstellung der Zellzahl, die zuvor als optimale Ausgangsbedingung für die Migrationsversuche bestimmt wurde. Dies war bei HCT116 und HCT116 p21-/- Zellen $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml und für U87 Zellen $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Dazu wurde Zellkulturmedium verwendet, dem 1 % Pen/Strep hinzugefügt wurde. Die eingestellte Zellzahl wurde anschließend durch eine erneute Messung überprüft. Zur anschließenden Beschickung der Boydenkammer erfolgte zunächst die Zugabe von je 30 μ l Medium mit 1 % Pen/Strep in jede Vertiefung des unteren Boydenkammerteils. Auf diesen Teil der Kammer wurden dann der vorbereitete Filter, eine Gummidichtung und die obere Deckplatte der Kammer gelegt und festgeschraubt. In die oberen Vertiefungen wurden anschließend je 50 μ l der vorbereiteten Zellsuspension gegeben. Es schloss sich eine Inkubation der fertig zusammengesetzten Boydenkammer für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank an.

2.1.10.4 Fixierung und Färbung der Zellen

Nach Beendigung des Migrationsversuchs wurde die Boydenkammer wieder zerlegt, wie unter 2.1.10.6 beschrieben gereinigt und vom Filter die Zellen entfernt, die auf der Startseite zurückgeblieben waren. Dazu wurde der Filter zwischen zwei Klemmen gespannt und die Zellen auf der Startseite mit einem in PBS getauchten Wattestäbchen abgewischt. Der Filter wurde dann mit der Ankunftsseite nach oben auf Zellstoff gelegt und für mindestens 30 Minuten getrocknet. Die Fixierung der gewanderten Zellen auf der Ankunftsseite des Filters erfolgte durch Eintauchen für 30 Sekunden in Methanol und anschließendes Trocknen des Filters auf Zellstoff. Die so fixierten Zellen wurden dann mit Hilfe einer Hämacytinfärbung auf dem Filter angefärbt. Diese Färbung ist kommerziell erhältlich und besteht aus zwei Färbelösungen und der anschließenden Entfärbung in „Puffer nach Weise“. Durch siebenmaliges Eintauchen des Filters in die rote Färbelösung (Hämacyt 2) erfolgte die Anfärbung der gesamten Zelle. Anschließendes dreimaliges Eintauchen in die blaue Färbelösung (Hämacyt 3), färbte die Zellkerne dunkel. Diese ließen sich so vom Zellkörper unterscheiden, welches die spätere Auswertung ermöglichte. Zweimaliges Waschen des gefärbten Filters in „Puffer nach Weise“ entfernte jegliche überschüssige Farblösungen. Anschließend wurde der Filter bei Raumtemperatur getrocknet und eingedeckt. Dafür wurden die Filter in der Mitte getrennt und auf zwei saubere Objektträger gelegt, ein Tropfen Immersionsöl auf den Filter gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Mit einer Pinzette wurden alle Luftblasen unter dem

Deckglas entfernt, das anschließend mit Nagellack umrandet wurde. So konnten die Filter langfristig gelagert und unter einem Mikroskop abfotografiert werden.

2.1.10.5 Auswertung

Die Auswertung der Zellmigration erfolgte computergestützt. Jede einzelne Vertiefung des Filters wurde abfotografiert und einzeln ausgewertet. Die Fotografien wurden bei einer 2,5x Objektiv-Vergrößerung am Mikroskop erstellt. Zur Auswertung kamen die Programme Adobe Photoshop 6, Image J und Excel zum Einsatz, so dass zum Schluss die genaue Anzahl gewanderter Zellen/Vertiefung ermittelt werden konnte. Durch Mehrfachbestimmungen jedes Ansatzes pro Filter ergaben sich Mittelwerte, aus denen zusammen mit der in die Boydenkammer eingesetzten Zellzahl der Prozentsatz gewanderter Zellen errechnet werden konnte.

2.1.10.6 Reinigung der Boydenkammer

Je nach Verwendung erfolgte die Reinigung der Boydenkammern folgendermaßen: Direkt nach Beendigung der Versuche wurden die einzelnen Kammerteile in Aqua dest. eingelegt und anschließend für mindestens 10 Minuten unter fließendes Wasser gestellt. Daraufhin wurde das Wasser abgegossen, die Boydenkammer zwei Mal für eine Stunde in Aqua dest. eingelegt und dann bei Raumtemperatur getrocknet.

Bei regelmäßiger Benutzung erfolgte zusätzlich alle sechs bis acht Wochen eine enzymatische Reinigung der Boydenkammern. Dazu wurde aus dem kommerziell erhältlichen Pulver Tergazym eine 1%ige Enzymlösung hergestellt, in welche die Kammerteile für zwei Stunden eingelegt wurden. Hierauf erfolgte die zuvor beschriebene Reinigung mit Aqua dest..

2.2 Proteinexpression

Die migrationsrelevanten Integrine β_1 und β_3 sowie die Proteinkinasen Akt1 und Akt2 sollten nachgewiesen werden. Dies geschah mittels Western Blot aus Proteinlysaten die aus bestrahlten und nicht bestrahlten Kontrollzellen hergestellt wurden. Wie auch für die Untersuchung der Migration (s. 2.1.10) wurden die Proben direkt (0 Stunden) und 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit Röntgenstrahlung oder Schwerionen verwendet. Zum Teil konnten dazu Zellen eingesetzt werden, die auch für Migrationsversuche genutzt wurden (HCT116 und HCT116 p21^{-/-}). Bei U87 Zellen war dies nicht möglich, so dass separate Flaschen für die Herstellung der Proteinlysate vor Bestrahlung angesetzt wurden, um eine ausreichende Ausbeute an Proteinen zu erhalten.

Für die spätere Auswertung der Proteinexpression nach Bestrahlung wurde neben den oben genannten Proteinen immer auch das Protein Aktin als „Haushaltsprotein“ nachgewiesen. Diese Expression ermöglichte eine relative Auswertung, die zum einen die veränderte Expression der zu untersuchenden Proteine nach Bestrahlung mit der Aktin-Expression in Be-

zug setzte, als auch einen Vergleich zwischen unbehandelten und bestrahlten Zellen ermöglichte.

2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 1600 rpm für 6 Minuten (Megafuge 1.0R, Heraeus). Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 1x PBS wurde dieses komplett vom Zellpellet entfernt und die Zellen in kaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Menge des Lysepuffer variierte je nach Größe des Pellets zwischen 150 µl und 300 µl. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C, 4000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert, woran sich die Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß anschloss. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -70 °C.

2.2.2 Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde der kolorimetrische Bradford-Assay angewandt. Hierbei wird die Proteinmenge durch kovalente Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an die Proteine photometrisch bei 595 nm in einem Mikroplate-Reader bestimmt. Eine parallele Messung einer BSA-Standardreihe diente der Erstellung einer Standardgeraden. Hierdurch wurde die Berechnung der Proteinmenge in den unbekanntenen Proben ermöglicht.

Für die BSA-Standardreihe wurden aus einer BSA-Stammlösung mit 2000 µg/ml BSA Lösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1500 µg/ml, 1200 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml. Als Leerwert diente Aqua dest.. Die zu untersuchenden Proben wurden je nach Zelllinie 1:10 (HCT116 und HCT116 p21-/-) oder 1:3 (U87) mit Aqua dest. verdünnt.

Vor der eigentlichen Messung wurde die verwendete Platte leer bei 595 nm gemessen. Dadurch konnte die Eigenabsorption der Platte von den späteren Messwerten abgezogen werden. Zur Messung wurden je 5 µl Standardlösung oder Probe in je drei Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl Bradford-Assay-Reagenz und eine 15minütige Inkubation der Platte im Dunkeln. Dann wurde die Platte erneut bei 595 nm gemessen.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben wurde die Absorption der Standardlösungen gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Aus einer linearen Regression durch die gemessenen Absorptionswerte ergab sich eine Geradengleichung, aus der sich die Proteinkonzentrationen der Proben errechnen ließen.

2.2.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der unter 2.2.1 hergestellten Proteingemische diente die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das in allen hier verwendeten Komponenten enthaltene SDS ummantelt die aufzutrennenden Proteine und maskiert so deren Eigenladung. Dadurch können Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wurden Trenngele mit 10 % und Sammelgele mit 5 % Acrylamidanteil verwendet (genaue Zusammensetzung: s. 6.2.3). 10 - 20 µg Protein (abhängig von der Konzentration der Proben) wurden zur Vorbereitung in 0,2 ml Reaktionsgefäßen mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt. Mögliche Volumenunterschiede zwischen Proben, die auf ein Gel aufgetragen werden sollten, wurden durch Zugabe von Aqua dest. ausgeglichen. Die vorbereiteten Proben wurden dann im Thermocycler für fünf Minuten bei 99,9 °C denaturiert und anschließend auf das Gel geladen. Der Ladepuffer war mit Bromphenolblau versetzt, so dass die Lauffront der Proteine durch den Farbstoff sichtbar wurde. Zur besseren Abschätzung der Proteingrößen wurden je Gel 5 µl eines vorgefärbten Proteinmarkers mitgeführt. Die Elektrophorese lief bei 150 V bis zum Herauslaufen der blauen Lauffront aus der Kammer. Anschließend wurde das Gel in einem Western Blot (s. 2.2.4) weiter verwendet.

2.2.4 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine diente hier die Methode des Semidry Western Blots. Dabei werden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, was einen spezifischen Nachweis ermöglicht. Dieser erfolgte immunchemisch mittels eines Peroxidase-gekoppelter Antikörpers und anschließender Chemilumineszenz-Detektion auf einem Film. Die einzelnen Schritte des Verfahrens sind im Folgenden detailliert beschrieben.

2.2.4.1 Blotten

Die aufgetrennten Proteine wurden zur späteren Detektion spezifischer Eiweiße auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde pro Gel je eine Membran und sechs dünne Whatman-Filterpapiere auf die Größe eines Gels zugeschnitten (5 x 9 cm). Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgten die Entnahme des Gels aus der Apparatur, und die Abtrennung des Sammelgels. Zur Orientierung wurde zudem die linke untere Ecke des Gels abgeschnitten. Es schloss sich nun das Äquilibrieren des Gels für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer an. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde währenddessen mit Bleistift beschriftet und zehn Sekunden in Methanol getaucht. Dies ermöglichte eine spätere Anhaftung der Proteine in der wässrigen Umgebung auf der eigentlich hydrophoben Membran. Methanolreste wurden durch 5minütiges Waschen der Membran in Aqua dest. entfernt. Anschließend erfolgte auch hier das Äquilibrieren in Transferpuffer für mindestens zehn Minuten.

Zur Übertragung der Proteine auf die Membran wurde der Blot schichtweise und luftblasenfrei auf der Anode des Geräts aufgebaut. Dazu wurden zunächst drei in Transferpuffer getauchte Filterpapiere auf die Anode gelegt, auf die dann die Membran und das Gel gelegt wurden. Den Abschluss bildete eine erneute Lage aus drei in Transferpuffer getauchten Filterpapieren und die Kathode, die das Gerät verschloss. Der Transfer der Proteine erfolgte für 50 Minuten bei 0,8 mA/cm².

2.2.4.2 Blocking und Antikörperinkubation

Nach Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran mussten noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abgeblockt werden. Dies geschah mit einer 1:10 in TBST verdünnten Roti[®]-Block-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen folgte die Inkubation der Membran mit einem für das zu detektierende Protein spezifischen Primärantikörper. Dieser wurde in 3 ml Roti[®]-Block-Lösung verdünnt, worauf diese auf die Membran gegeben und für 16-20 Stunden im Kühlschrank inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt, gefolgt von drei Waschschritten in TBST für je fünf Minuten. Daran schloss sich die zweistündige Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Der mit einer Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet. Die Verdünnungen der einzelnen Primär- und Sekundärantikörper sind dem Anhang zu entnehmen (s. 6.2.3). Vor der sich anschließenden chemischen Entwicklung (s. 2.2.4.3) wurde die Membran noch dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen.

2.2.4.3 Entwicklung

Für die Detektion der Proteinbanden auf einem Film kam ein ECL-Reagenz (ECL = Enhanced Chemiluminescence) der Firma Amersham (GE Healthcare; später Nalgene, Santa Cruz Biotech.) zum Einsatz. Diese bestand aus zwei Lösungen die im Verhältnis 1:1 gemischt (für eine Membran jeweils 1 ml je Lösung) und für zwei Minuten auf der Membran inkubiert wurden. Dabei wird neben der Umsetzung des H₂O₂ aus der ECL-Lösung das ebenfalls vorhandene Luminol angeregt. Dieses gibt bei seiner Rückführung in den Grundzustand Licht ab, welches mit einem photographischen Film detektiert werden kann. Dazu wurde die Membran nach der Inkubation mit der ECL-Lösung in Klarsichtfolie gewickelt und in der Dunkelkammer mit einem Film in Kontakt gebracht. Die Dauer der Belichtung des Films richtete sich nach dem zu detektierenden Protein. Die durchschnittlichen Belichtungszeiten für die einzelnen Proteine sind im Anhang (s. 6.2.3) aufgeführt. Anschließend wurde der Film per Hand entwickelt. Dafür wurden Entwickler und Fixierlösung 1:10 in Aqua dest. verdünnt wobei eine wöchentliche Erneuerung des Entwicklers erforderlich war. Der Fixierer war bis zu vier Wochen verwendbar. Die Qualität der Entwicklerlösung wurde vor Beginn der eigentlichen Entwicklung getestet. Nach beendeter Belichtung des Films erfolgte die Entwicklung durch zehn bis

60sekündiges Eintauchen des Films in die Entwicklerlösung (je nach Qualität des Entwicklers). Anschließendes Waschen in Aqua dest., Eintauchen bis zum vollständigen Verschwinden des Films in der Fixierlösung und ein erneutes Waschen in Aqua dest. beendeten die Detektion der Proteinbanden auf dem Film.

Die Membran wurde für weitere Nachweise in TBS gewaschen und dann bei -20 °C gelagert. Der getrocknete Film wurde beschriftet, die Markerbanden von der Membran auf den Film übertragen und der Film eingescannt. Dann konnte die computergestützte Auswertung der Expression der verschiedenen Proteine erfolgen. Dazu kamen die Programme Photoshop 6 bzw. CS2, ImageJ und Excel zum Einsatz.

2.2.4.4 Strippen

Für den Nachweis der Proteinkinasen Akt1 und Akt2 konnte, im Gegensatz zu den Integrinen, das Haushaltsprotein Aktin nicht parallel durch Halbieren der Membran, detektiert werden. Daher mussten in diesem Fall die Proteine nacheinander nachgewiesen werden. Dazu wurde die eingefrorene Membran aufgetaut, kurz in TBS gewaschen und dann die gebundenen Antikörper durch Inkubation der Membran mit einem Glycin-HCl-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur abgewaschen. Anschließend mussten unspezifische Bindungsstellen auf der Membran erneut geblockt werden. Es wurde wie ab 2.2.4.2 beschrieben weiter verfahren.

2.3 Statistik

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und deren statistische Absicherung wurde versucht, alle Experimente mindestens drei Mal zu wiederholen. Zudem wurde, wenn möglich, Mehrfachbestimmungen einer Probe durchgeführt. Ein limitierender Faktor stellten allerdings die Anzahl der Strahlzeiten für die Schwerionenbestrahlung dar.

Für die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse der Migrationsuntersuchungen sind relative Mittelwerte gezeigt die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten erhalten wurden (Ausnahme: U87 Zellen direkt nach Schwerionenbestrahlung). Dabei wurden für die Ergebnisse eines jeden Versuchs unbestrahlte Zellen als 100 % gesetzt und die Änderungen in der Migration bestrahlter Zellen relativ dazu ausgewertet. Jeder Mittelwert ergab sich dabei aus mindestens fünf ausgewerteten Wells eines Boydenkammerversuchs. Für die Überprüfung der statistischen Signifikanz der beobachteten Änderungen, wurde ein t-test mit $p < 0,05$ durchgeführt. Für die Beurteilung der statistisch signifikanten Änderungen der Einzelversuche, wurden ebenfalls ein t-test mit $p < 0,05$ durchgeführt. Hier wurde der relative Anteil der gewanderten Zellen als Mittelwert aller ausgewerteter Wells einer Dosis zur Berechnung herangezogen.

Sowohl für die durchgeführten Bestrahlungsversuche zur Ermittlung der Expression verschiedener Proteine, als auch für die Bestimmung des Überlebens nach Bestrahlung erfolgte

eine relative Auswertung der Ergebnisse. Dazu wurden auch hier die Ergebnisse unbestrahlter Zellen als 100 % gesetzt und die Veränderungen relativ dazu ermittelt. In den Graphen dargestellt sind Mittelwerte aus den entsprechenden Mehrfachbestimmungen (zum Teil mit Standardabweichungen oder SEM).

Für die Ermittlung des Überlebens nach Bestrahlung wurden zudem pro Versuchen Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen berechnet und dann alle Versuche gemittelt und relativ ausgewertet.

Für die Bestimmung der Expressionsmuster nach Bestrahlung wurden alle Proben nur einmal eingesetzt. Zudem ergaben sich, auf Grund teilweise sehr geringer Probenmengen, Probleme mit der Durchführung von Dreifachbestimmungen. Daher sind diese Werte zum Teil eher als Trend, denn als statistisch abgesichert zu sehen.

Eine statistische Auswertung wurde sowohl für die Bestimmung des Überlebens und die Proteinexpression nicht durchgeführt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Migrationsverhalten von Tumorzellen nach konventioneller Röntgenbestrahlung und nach Behandlung mit einem ^{12}C -Schwerionenstrahl untersucht. Dabei kamen die humane Gliomzelllinie U87 und die humane kolorektale Karzinomzelllinie HCT116 so wie deren p21-defiziente Sublinie HCT116 p21-/- zum Einsatz.

Neben der Charakterisierung der Zelllinien und der zelllinienspezifischen Etablierung der Migrationsversuche in Boydenkammern wurde vor allem die Migration direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung unter standardisierten Bedingungen untersucht. Zudem sollte geklärt werden, welche Moleküle an möglichen zelllinien- und strahlenspezifischen Unterschieden in der Migration beteiligt sein könnten. Daher wurden Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot für die Proteine β_1 und β_3 Integrin, sowie für die Isoformen Akt1 und Akt2 der Proteinkinase B/Akt durchgeführt.

Zu Beginn soll auf die zelllinienspezifischen Unterschiede, die möglicherweise einen Einfluss auf die Boydenkammerversuche hatten, eingegangen und die Zelllinien charakterisiert werden. Anschließend werden, die nach Bestrahlung erhaltenen Ergebnisse der Migration und Proteinexpression vorgestellt. In allen gezeigten Graphen wurden zur besseren Unterscheidung der Zelllinien verschiedene Symbole verwendet: (■) HCT116, (●) HCT116 p21-/- und (▲) U87.

Um sicher zu gehen, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht durch eine Mykoplasmenkontamination der Zellen beeinflusst wurden, erfolgte in regelmäßigen Abständen von drei bis vier Monaten die Durchführung eines Mykoplasmentests auf PCR-Basis. Für die hier verwendeten Zelllinien wurden zu keinem Zeitpunkt Mykoplasmen detektiert.

3.1 Charakterisierung der Zelllinien

Aufgrund der unterschiedlichen Entitäten, aus denen die verwendeten Zellen isoliert wurden, zeigten sich während der Kultivierung typische morphologische Unterschiede. Außerdem wurden Wachstumsunterschiede beobachtet. Abbildung 15 zeigt mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien HCT116 und U87 zu Beginn eines Boydenkammerversuchs. Für diesen wurden die Zellen drei (HCT116) bzw. vier Tage (U87) vor Versuchsbeginn in definierter Zellzahl (1×10^4 Zellen/cm² für U87 bzw. 4×10^4 Zellen/cm² für HCT116) ausgesät und unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 10x Vergrößerung fotografiert. Anschließend startete der Migrationsversuch.

Es zeigten sich deutliche morphologische Unterschiede: Während die kolorektalen Karzinomzellen HCT116 (A) als kompakte, spindelförmige, eng aneinander liegende Zellen wuchsen, zeigte die Gliomzelllinie U87 (B) ein Wachstum, das durch viele Ausläufer und ein ver-

einzeltes Anhaften der Zellen gekennzeichnet war. U87 Zellen waren zudem, im Gegensatz zu HCT116 Zellen, nicht in der Lage einen konfluenten Zellrasen zu bilden. In beiden Abbildungen sind runde Zellen zu erkennen, welche sich in der Teilungsphase befanden. HCT116 p21^{-/-} Zellen sind nicht gezeigt, da sich diese in ihrer Morphologie nicht von der parentalen Zelllinie HCT116 unterscheiden.

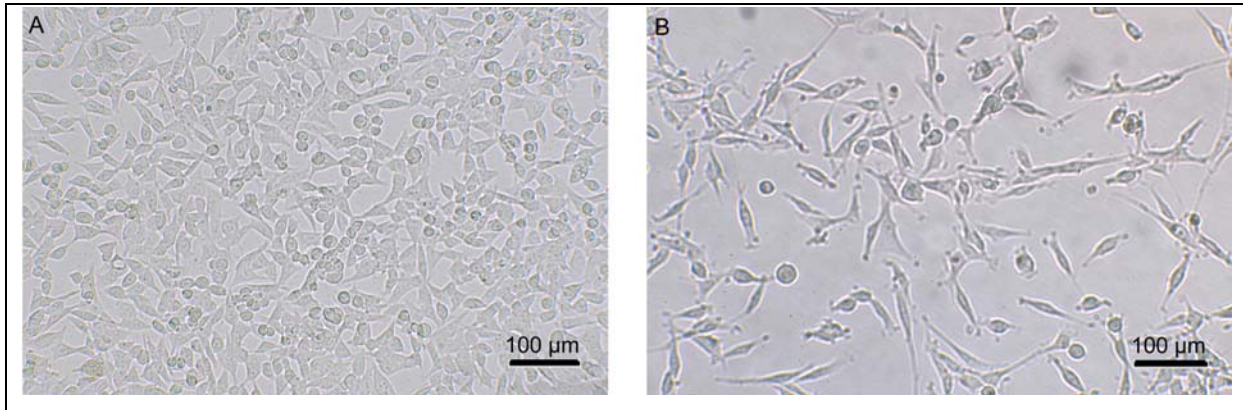


Abbildung 15: Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien HCT116 und U87.

Gezeigt sind Aufnahmen der Zelllinien HCT116 (A) und U87 (B). Diese wurden drei (HCT116) bzw. vier (U87) Tage nach Aussaat definierter Zellzahlen unter einem Phasenkontrastmikroskop mit 10x Vergrößerung fotografiert.

Zur Selektion p21-defizienter Zellen wurde der Linie HCT116 p21^{-/-} in regelmäßigen Abständen das Antibiotikum Genitacin zum Medium dieser Zelllinien hinzugefügt (s. 2.1.2). Zu Beginn der Arbeit wurde auf Proteinebene die p21-Defizienz überprüft. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 16 dargestellt.

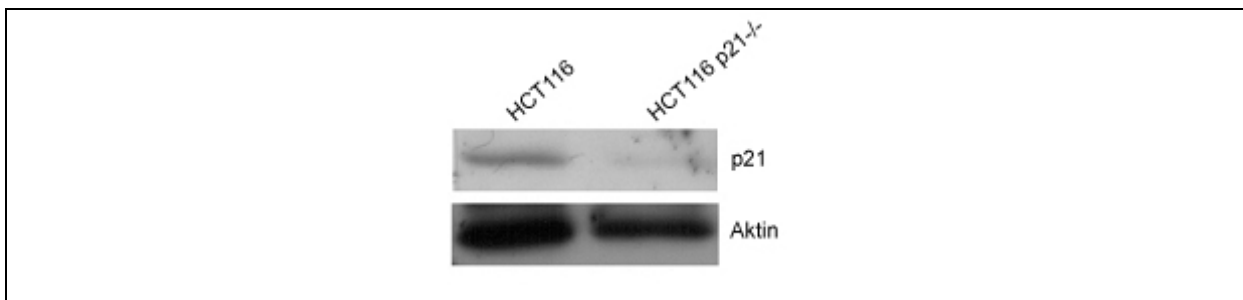


Abbildung 16: Vergleich der p21 Proteinexpression in HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen.

Gezeigt sind Western Blot Ergebnisse aus Lysaten der Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} zum Nachweis des Proteins p21. Aktin diente als Haushaltprotein. Im Gegensatz zu der parentalen Linie wiesen HCT116 p21^{-/-} Zellen nur eine sehr schwache p21 Proteinbande auf.

Dabei zeigte sich, dass HCT116 p21^{-/-} deutlich weniger p21 exprimieren, als die Wildtyp Zelllinie HCT116. Trotz einer deutlich sichtbaren Bande des Haushaltproteins Aktin, wurde nur eine sehr dünne p21-Bande in Lysaten von HCT116 p21^{-/-} Zellen detektiert. Ein komplettes Fehlen des Proteins konnte hier allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies entsprach Ergebnissen aus der Literatur, bei denen in Western Blot Untersuchungen auch sehr kleine Restmengen p21 nachgewiesen wurde (Mueller et al., 2000). Getestet wurde hier zudem, ob

die Bande durch Bestrahlung indizierbar war, welches nicht der Fall war (persönliche Kommunikation).

Um eine genauere Kenntnis über das Wachstum der unterschiedlichen Zelllinien zu erlangen, wurde dieses über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen untersucht. Dazu wurden die Zellen sehr dünn in einer bekannten Dichte ausgesät (s. 2.1.4) und durch Zellzählung zu definierten Zeitpunkten die Vermehrung der Zellen dokumentiert. Durch eine graphische Auftragung der ermittelten Zellzahlen (Zellen/ml) gegen die Zeit (h) konnte das Wachstumsverhalten dargestellt werden (Abbildung 17). Aus der halblogarithmischen Auftragung ließ sich aus der Steigung im Bereich des exponentiellen Wachstums die Verdopplungszeit der Zellen während dieser Wachstumsphase berechnen.

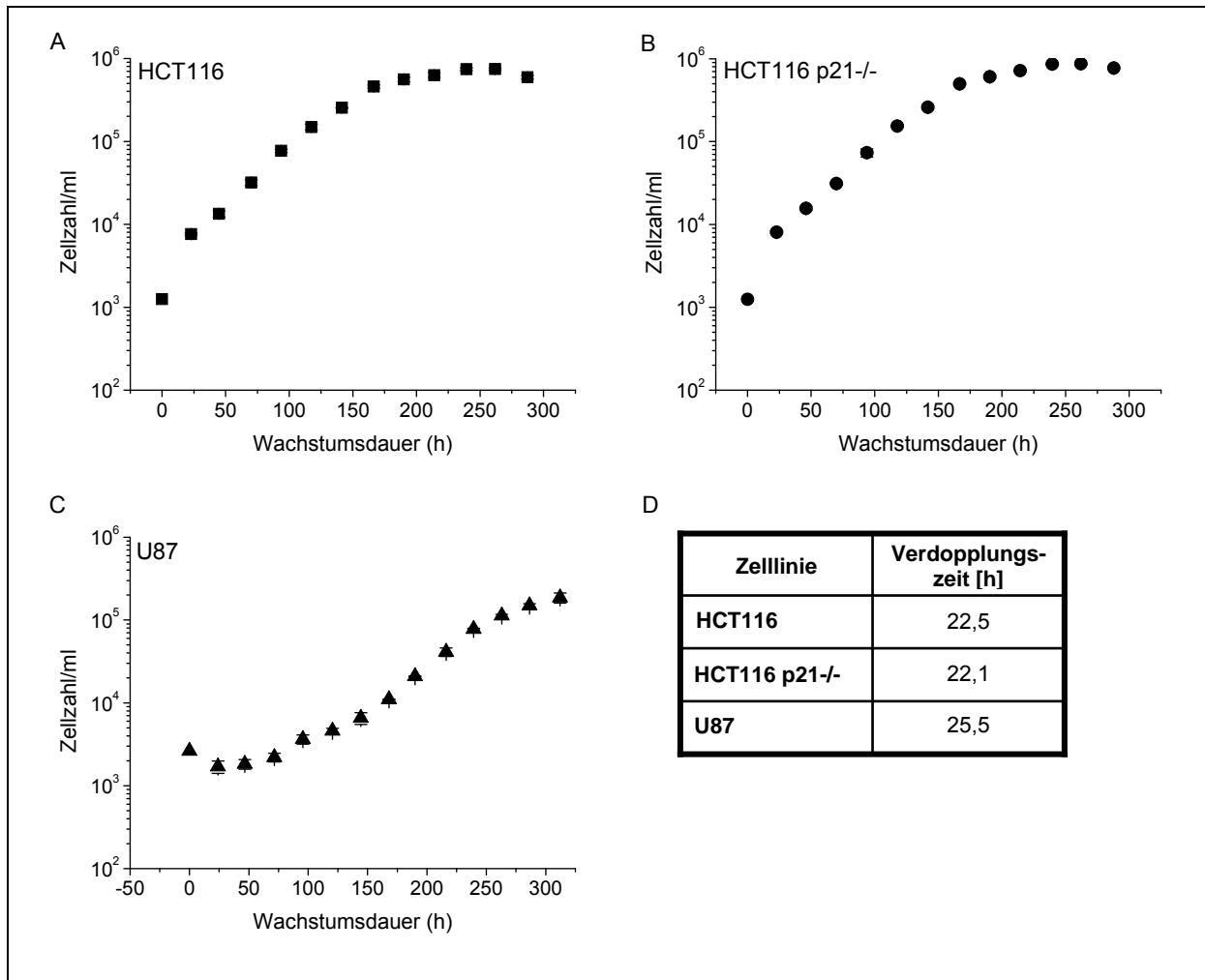


Abbildung 17: Wachstumskurven und Verdopplungszeiten.

Die Abbildung zeigt repräsentative Wachstumskurven der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C). Aufgetragen wurden die Zellzahl/ml gegen die Wachstumsdauer in Stunden (h). In der Tabelle (D) sind die in dem Bereich des exponentiellen Anstiegs der Graphen berechneten Verdopplungszeiten in Stunden der drei Zelllinien dargestellt.

Abbildung 17 zeigt drei typische Wachstumskurven der hier verwendeten Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21^{-/-} (B) und U87 (C), sowie deren Verdopplungszeiten (D).

Für beide Kolonkarzinomzelllinien konnte eine etwa gleichlange Verdopplungszeit von 22,5 h (HCT116) bzw. 22,1 h (HCT116 p21^{-/-}) ermittelt werden. Diese stimmen in etwa mit den aus der Literatur bekannten Zeiten überein: so wurde schon von Brattain et al. (1981) während der Etablierung der Zelllinie Verdopplungszeiten von 21,2 h bis 24,2 h ermittelt. Die Zelllinie U87 zeigte eine längere Verdopplungszeit von 25,5 h. Andere Arbeitsgruppen haben Verdopplungszeiten von 26 h (Guha et al., 2000b) bzw. 27,5 h (Fellner et al., 2002) bestimmt die in etwa im hier ermittelten Zeitraum liegen. Allerdings wurden auch schon Werte von 37 h oder mehr gemessen (Denoyer et al., 2005).

Neben dem Wachstumsverhalten der unbehandelten Zellen, wurde auch ihr Verhalten nach Bestrahlung getestet. Dazu wurde das klonogene Überleben der Zellen nach Röntgen- oder Schwerionenbestrahlung in unterschiedlichen Dosen bestimmt.

Abbildung 18 zeigt Überlebenskurven der Zelllinien HCT116 (A) und HCT116 p21^{-/-} (B). Für das Überleben beider Zelllinien nach Röntgenbestrahlung (schwarze Linie) war die für diese Strahlenart typische Schulterkurve zu erkennen. Sie zeigte einen dosisabhängigen Verlauf mit einer Überlebensrate von etwa 2 % für HCT116 und 1 % für HCT116 p21^{-/-} nach einer Dosis von 10 Gy. Das Überleben nach Schwerionenstrahlung nahm bei beiden Zelllinien bis 3 Gy relativ linear ab. Nach dieser Dosis überlebten zwischen 2-8 % der Zellen. Höhere Dosen konnten diesen Prozentsatz nur noch geringfügig vermindern.

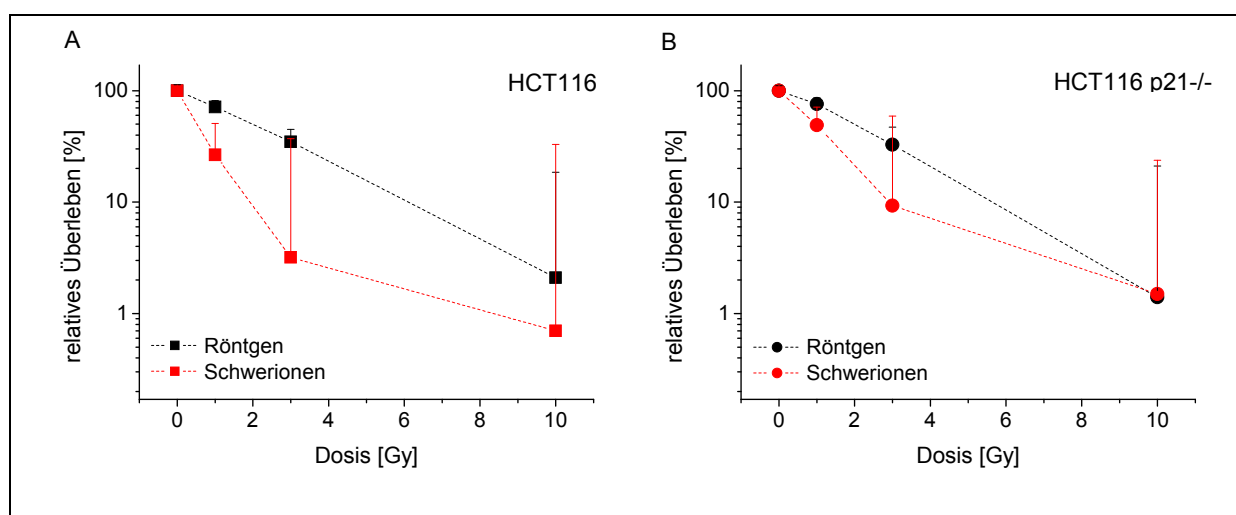


Abbildung 18: Klonogenes Überleben nach Röntgen- und Schwerionenstrahlung.

Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) des relativen Überlebens der Zelllinien HCT116 (A) und HCT116 p21^{-/-} (B) nach Röntgen- (schwarz; N = 5, n = 30) bzw. nach Schwerionenbestrahlung (rot; N = 4, n = 24). Aufgetragen wurde das relative Überleben der Zellen in Prozent gegen die verwendete Dosis in Gy.

Da die Zelllinie U87 keine zählbaren Kolonien bildete, ergaben sich hier Probleme mit der Auswertung. Eine wie in Abbildung 18 gezeigte Grafik war daher für diese Zellen nicht möglich. Abbildung 19 zeigt die Unterschiede bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit der verwendeten Zelllinien. Dabei wurde ersichtlich, dass HCT116 Zellen sehr kompakte Kolonien bildeten. Diese waren gleichmäßig über das auszuzählende Well verteilt und in den eingescannten Bilder schon mit geringer Vergrößerung deutlich zu erkennen. Die Kolonien der ebenfalls untersuchten Zelllinie HCT116 p21^{-/-} zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten, sind hier aber nicht dargestellt. U87 Zellen bildeten hingegen keine kompakten Kolonien. Vielmehr wuchsen sie nach Aussaat der Zellen vereinzelt und ließen so keine Unterscheidung zwischen koloniebildenden und nicht koloniebildenden Zellen zu.

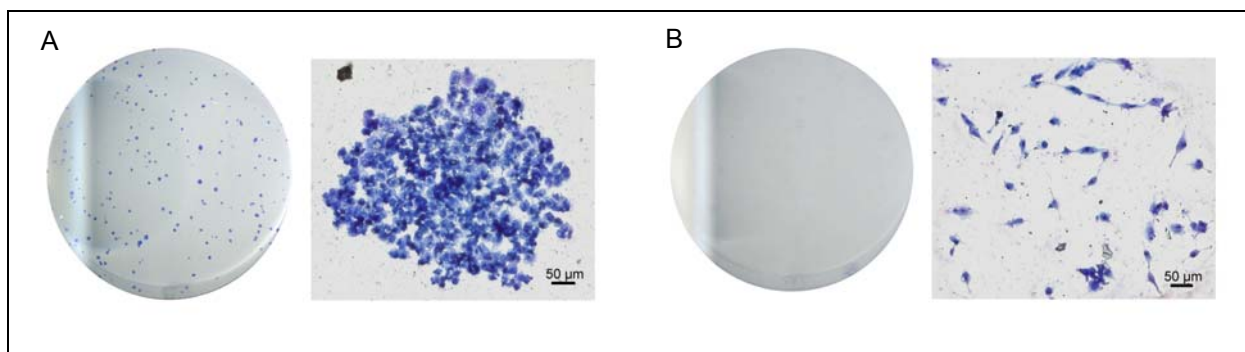


Abbildung 19: Koloniebildung von HCT116 und U87 Zellen.

Gezeigt sind Kolonien der Zelllinien HCT116 (A) und U87 (B). Die Anfärbung der Zellen erfolgte mit Methyleneblau. Jeweils ein Well (Durchmesser: 3,5 cm) einer eingescannten 6-Well-Platte ist exemplarisch dargestellt, sowie die Vergrößerung einer einzelnen Kolonie (10x).

Aus diesem Grund konnte für die Zelllinien kein relatives Überleben nach Bestrahlung mittels Koloniebildungstest erfasst werden. Es wurde daher versucht, ähnliche Wirkungsunterschiede der Strahlenarten über die Messung der Zellvitalität zu ermitteln.

In einem sogenannten XTT-Test wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen als Maß der Zellvitalität im Photometer gemessen. Dazu wurden die Zellen nach Bestrahlung über sechs Tage (dies entsprach dem Zeitraum für einen Klonogenitätstest) im Brutschrank in 96-Well Platten kultiviert. Als Grundlage diente die Annahme, dass nach diesem Zeitraum nur noch die mitochondriale Aktivität der Zellen gemessen werden konnte, die durch erfolgreiche Reparatur des Strahlenschadens in der Lage waren sich zu vermehren. Dieses Verfahren wurde für die Zelllinie U87 auch schon von anderen Arbeitsgruppen angewandt, um die Strahlenresistenz zu quantifizieren. In der Arbeit von Hovinga et al. (2005) wurde dabei eine relative Proliferation von etwa 20 % sieben Tage nach einer Röntgenbestrahlung mit 10 Gy ermittelt.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse des XTT-Vitalitätstests. Auch in dieser Untersuchung waren dosisabhängige Verläufe der Zellaktivität zu erkennen. Allerdings wurde auch die Grenze des Tests deutlich. Im Gegensatz zur Untersuchung des klonogenen Überlebens war hier ein

Ableben der Zellen unter 10 % der Einsaat nicht mehr zu detektieren. Aber auch unter diesen Umständen war zu erkennen, dass die Gliomzelllinie U87 (C) im Vergleich zu beiden kolorektalen Zelllinien deutlich strahlenresistenter war. Während sich für HCT116 (A) und HCT116 p21^{-/-} (B) Zellen eine dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität nach 10 Gy Röntgenbestrahlung (schwarze Linien) auf 12 % (HCT116) bzw. 23 % (HCT116 p21^{-/-}) zeigte, nahm die Zellvitalität von U87 Zellen nach derselben Strahlenart und Dosis nur auf 64 % im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen ab. Nach Schwerionenbestrahlung (rote Linien) zeigte sich ein ähnliches Bild. Zwar sank die Zellvitalität von U87 Zellen nach 10 Gy auf 39 % und war damit deutlich niedriger als nach Röntgenstrahlung, trotzdem war dieser Wert im Vergleich zu den kolorektalen Zellen (8 % HCT116 p21^{-/-}, 9 % HCT116) deutlich höher.

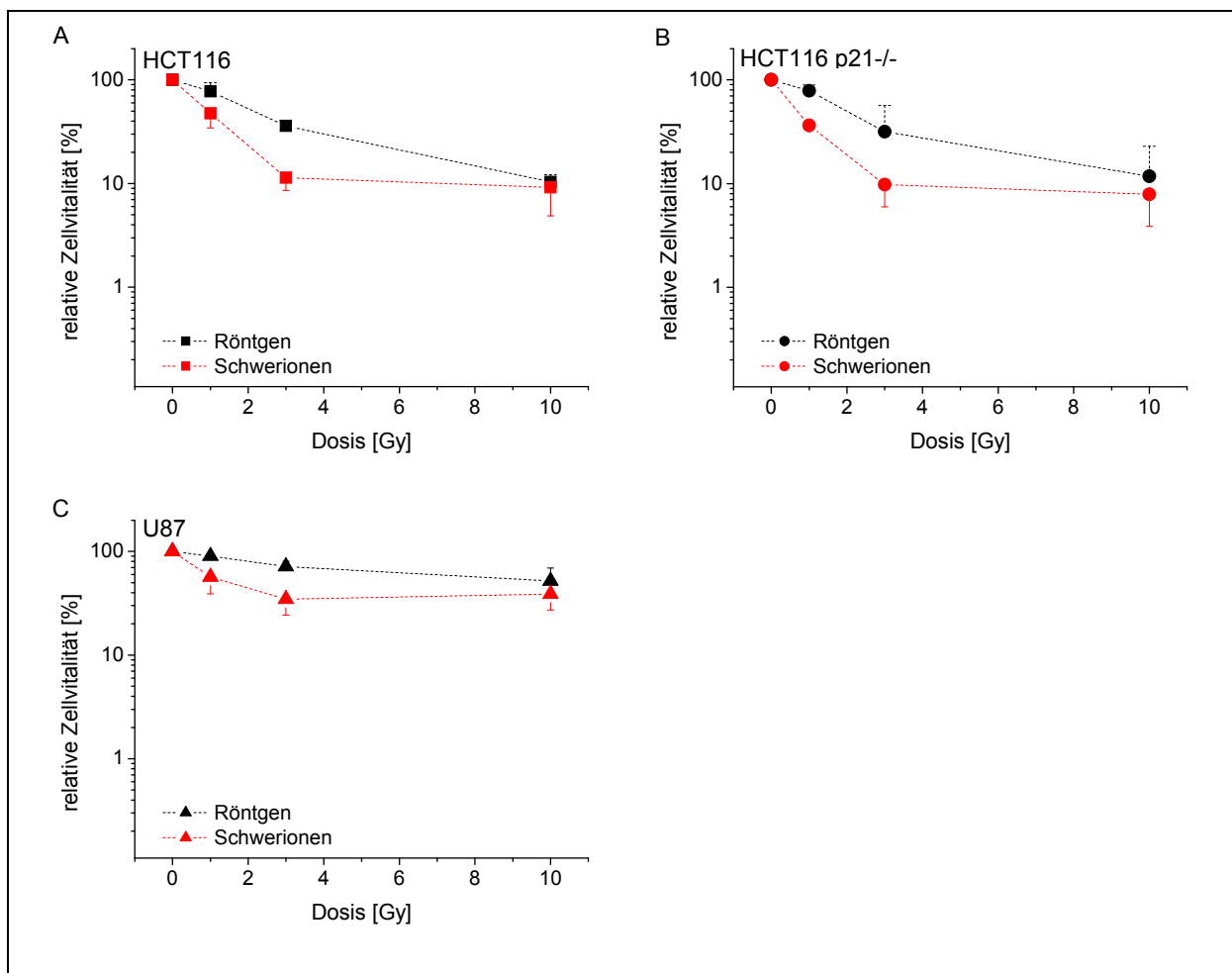


Abbildung 20: Relative Zellvitalität sechs Tage nach Bestrahlung.

Die Abbildung zeigt Mittelwerte (\pm SEM) der relativen Zellvitalität der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21^{-/-} (B) und U87 (C) sechs Tage nach Röntgen- (schwarz; N = 6) bzw. Schwerionenbestrahlung (rot; N = 3). Die Zellvitalität wurde mittels eines kommerziellen XTT-Tests im Photometer bestimmt. Aufgetragen wurde das relative Überleben der Zellen in Prozent gegen die verwendete Dosis in Gy.

3.2 Migrationsmessungen mit Hilfe der Boydenkammer

Um standardisierte Bedingungen zu ermöglichen, mussten vor Beginn der eigentlichen Migrationsuntersuchungen nach Bestrahlung die optimalen, zelllinienspezifischen Bedingungen für die Wanderungen ermittelt werden. So lies sich der Anteil wandernder Zellen durch Variation der vor Versuchsbeginn ausgesäten Zellzahlen, durch die Beschichtung des verwendeten Filters oder durch die Anzahl der eingesäten Zellen pro Well der Boydenkammer beeinflussen.

Ein prozentualer Anteil von 15 – 20 % gewanderter Zellen im Vergleich zur eingesetzten Zellzahl in die Boydenkammer wäre dabei optimal gewesen, da es zum einen eine computergestützte Auswertung ermöglichen und zum anderen Raum für mögliche Zu- oder Abnahmen in der Migration nach Behandlung der Zellen lassen würde.

3.2.1 Ermittlung der einzusetzenden Zellzahlen

Zunächst wurden für die Versuche Zellen in unterschiedlichen Dichten ausgesät und für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgten die Migrationsversuche. Abbildung 21 zeigt den prozentualen Anteil gewanderter Zellen der Zelllinien HCT116 (A) und HCT116 p21^{-/-} (B) in Abhängigkeit der Zelldichte, die drei Tage vor Versuchsbeginn eingesetzt wurden. Zwar wurden die Zellen in unterschiedlichen Dichten vor Versuchsbeginn ausgesät, aber für den eigentlichen Migrationsversuch in der Boydenkammer erfolgte dann der Einsatz mit der gleichen Zellzahl für jede Zelllinie ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml Medium).

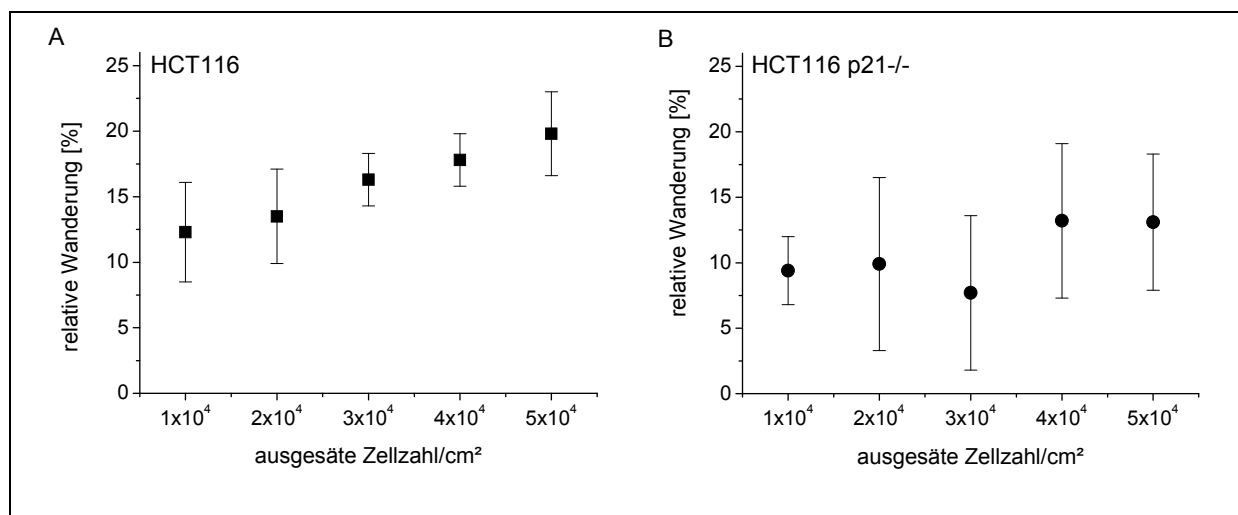


Abbildung 21: Zellmigration nach Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile gewanderter Zellen der Zelllinien HCT116 (A) und HCT116 p21^{-/-} (B). Diese wurden gegen die ausgesäte Zellzahl/cm² aufgetragen. Für den Versuch wurden die Zellen drei Tage vor Versuchsbeginn mit den angegebenen Zellzahlen in Kulturflaschen ausgesät und dann in der gleichen Dichte in den Migrationsversuch eingesetzt. (Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen).

Bei dieser Versuchsanordnung war vor allem bei HCT116 Zellen zu erkennen, dass mit steigender Aussaat der Zellen vor Versuchsbeginn auch der prozentuale Anteil gewanderter Zellen anstieg. Eine ähnlich klare Tendenz trat bei HCT116 p21-/- Zellen nicht auf. Trotzdem stieg auch hier der Prozentsatz gewanderter Zellen nach Aussaat von 4 bzw. 5×10^4 Zellen/cm² im Vergleich zur Aussaat der Zellen mit 1×10^4 Zellen/cm². Zwischen diesen beiden Zellzahlen schien es aber keine größeren Unterschiede in der Ausbeute zu geben. Daher und auf Grund der Tatsache, dass die Zellen für die Untersuchung 24 Stunden nach Bestrahlung einen weiteren Tag inkubiert wurden, wurde für die Linien HCT116 und HCT116 p21-/- eine Aussaat von 4×10^4 Zellen/cm² drei Tage vor Versuchsbeginn als optimal eingestuft.

Für die Zelllinien U87 wurden keine ausführlichen Versuche zur Bestimmung der besten Aussaat durchgeführt. Diese Zellen zeigten gleich zu Beginn mit den gewählten Anfangsbedingungen gute Ergebnisse. Daher wurden diese Bedingungen auch weiterhin beibehalten. U87 Zellen wurden für alle Versuche mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/cm² vier Tage vor Versuchsbeginn ausgesät und $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml wurden in die Boydenkammer eingesetzt.

3.2.2 Beschichtung der Boydenkammerfilter

Neben der oben beschriebenen Variation der ausgesäten Zellzahlen wurde auch die Beschichtung der eingesetzten Filter verändert. So erfolgte neben Filtern die mit Rattenkollagen I oder humanem Kollagen IV beschichtet wurden, auch der Einsatz von Membranen, die mit einem Ethanol/Salzsäuregemisch (EtOH/HCl) behandelt wurden. In diesem wurden die Kollagene gelöst, was zeigen sollte, in wie weit dieses Gemisch die Migration der Zellen beeinflusst. Als Vergleich dienten unbehandelte Filter.

Abbildung 22 zeigt den Prozentsatz gewanderter Zellen auf unterschiedlich behandelten Filtern. HCT116 Zellen (A) wanderten besonders gut auf Rattenkollagen I, wohingegen humanes Kollagen IV als auch eine Behandlung des Filters mit EtOH/HCl keinen Effekt auf die Wanderung der Zellen hatte. HCT116 p21-/- (B) hingegen zeigen im Vergleich zur Wanderung auf unbehandelten Filtern nur eine erhöhte Wanderung nach Behandlung mit EtOH/HCl bzw. nach Beschichtung mit Rattenkollagen I. Eine Beschichtung der Filter mit humanem Kollagen IV hatte auch hier keinen Einfluss auf die Wanderung der Zellen.

Da für die hier durchgeführte computergestützte Auswertung der Migrationsuntersuchungen ein prozentualer Anteil von etwa 15 % Auswertung optimal war, wurde für diese beiden Zelllinien eine Beschichtung der Filter mit Rattenkollagen I als optimale Bedingung für die Zellwanderung erachtet. Für die Zelllinie U87 wurde eine Beschichtung mit humanem Kollagen IV als optimale Filterbeschichtung festgelegt. Dies ergab sich aus den in Abbildung 22 C gezeigten Ergebnisse, in denen zu erkennen ist, dass eine veränderte Behandlung des eingesetzten Filters keine Auswirkung auf die Migration dieser Zellen hatte. Somit hätte auch hier eine Beschichtung mit Rattenkollagen I als optimal festgelegt werden können. Da im

Fälle dieser Zelllinie ein Vergleich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Wolfgang Wick erzielt werden sollte, wurde allerdings humanes Kollagen IV eingesetzt (Wick et al., 1998).

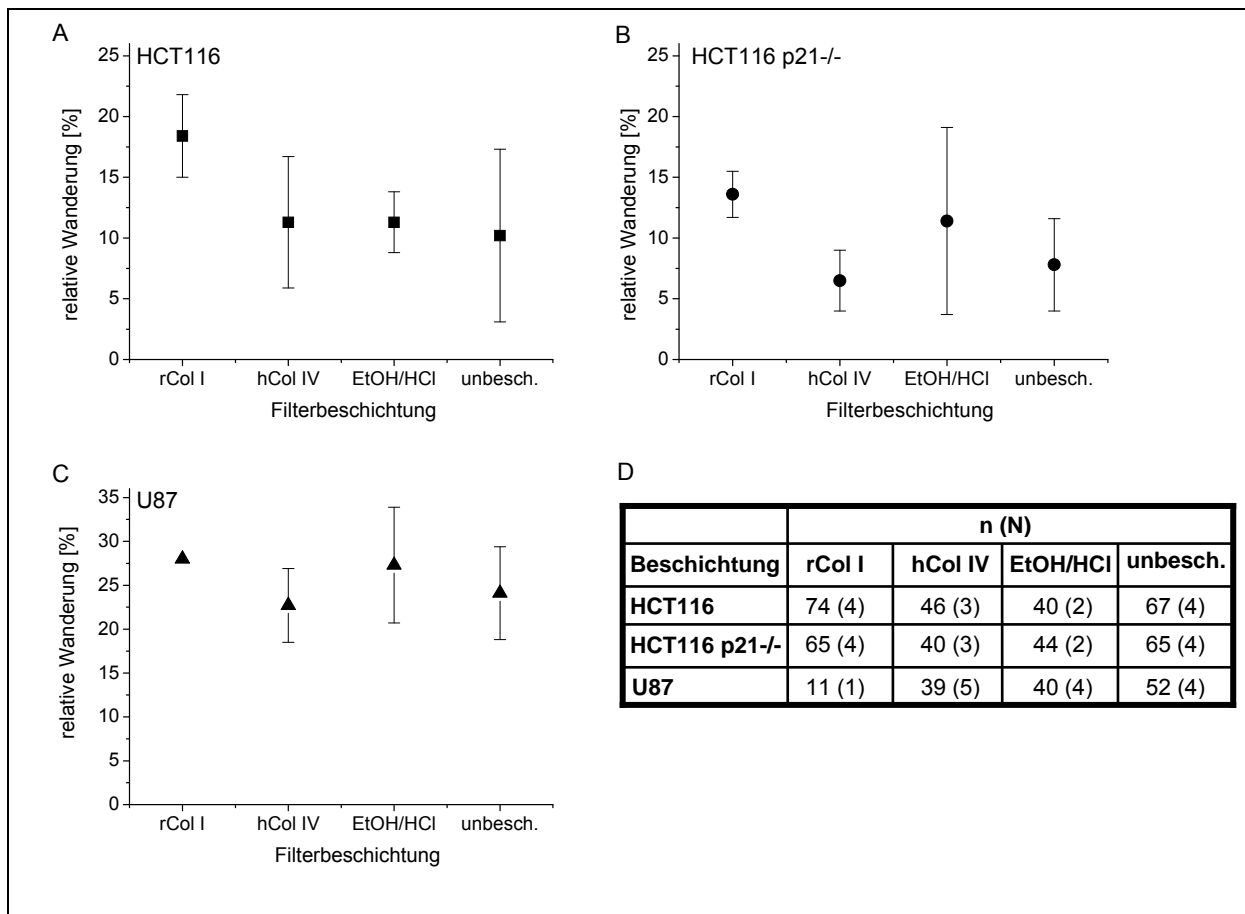


Abbildung 22: Zellmigration in Abhängigkeit der Filterbeschichtung.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des Anteils gewanderter Zellen der Linien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C). Die verwendeten Filter wurden unterschiedlich beschichtet, um Bedingungen für eine optimale Zellmigration zu ermitteln. (rCol I = Rattenkollagen I, hCol IV = humanes Kollagen IV, EtOH/HCl = Ethanol/Salzsäure-Gemisch, unbesch. = unbeschichteter Filter). Die Tabelle (D) zeigt die Anzahl insgesamt ausgewerteter Wells (n), sowie die Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche (N).

Tabelle 5 zeigt zusammenfassend die hier verwendeten Bedingungen für alle weiter durchgeführten Boydenkammerversuche. Das Einhalten dieser Versuchsbedingungen wurde zum Standard, um so eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Versuche zu garantieren.

Tabelle 5: Optimale, standardisierte Bedingungen für die Boydenkammerversuche.

Zelllinie	Beschichtung	Aussaat [Zellen/cm ²]	Aussaat vor Versuchsbeginn [d]	Einsaat [Zellen/ml]
HCT116	Rattenkollagen I	4x10 ⁴	3	2,5x10 ⁵
HCT116 p21-/-	Rattenkollagen I	4x10 ⁴	3	2,5x10 ⁵
U87	Humanes Kollagen IV	1x10 ⁴	4	1,5x10 ⁵

Nachdem dieser standardisierte Versuchsablauf festgelegt wurde, konnten die eigentlichen Experimente nach Bestrahlung der Zellen beginnen. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Folgenden dargestellt.

3.3 Migrationsmessungen und Bestrahlung

Um den Einfluss von Strahlung auf die Migration von Tumorzellen zu untersuchen, wurden diese nach den festgelegten, standardisierten Bedingungen ausgesät. Am Versuchstag erfolgte die Behandlung der Zellen in der GSI in Darmstadt und die anschließende Durchführung der weiteren Experimente in Mainz. Dort wurde die Migration der Zellen direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung bestimmt. Die Untersuchungen der Zellmigration erfolgten dabei zudem im Vergleich zweier unterschiedlicher Strahlenarten. So wurden zum einen die konventionelle Röntgenstrahlung und zum anderen ein ^{12}C -Schwerionenstrahl eingesetzt. In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Migrationsuntersuchungen zu beiden Zeitpunkten nach Bestrahlung zelllinien- und strahlenabhängig gezeigt.

Zu Beginn wird hier das Migrationsverhalten direkt nach Röntgenbestrahlung vorgestellt. Es folgen die Ergebnisse zum selben Zeitpunkt nach Schwerionenbestrahlung, sowie die Resultate 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Strahlenarten. Alle Ergebnisse der Migration sind in den Abbildungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und wurden relativ ausgewertet. Dazu wurde die prozentuale Veränderung der Zellwanderung bezogen auf die Migration un behandelter Zellen aufgetragen. Letztere wurde als 100 % gesetzt.

3.3.1 Migrationsmessungen direkt nach Bestrahlung

Abbildung 23 zeigt die prozentuale Veränderung der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C) direkt nach Röntgenbestrahlung. Dabei sind die gezeigten Werte auf die Zellwanderung unbestrahlter Zellen (100 %, gestrichelte Linie) normiert.

Es ist zu erkennen, dass beide kolorektalen Zelllinien (HCT116 (A) und HCT116 p21-/- (B)) eine leichte Abnahme der Zellmigration nach Röntgenbestrahlung zeigten. Diese waren im Fall der Zelllinie HCT116 nach klinisch relevanten Dosen von 1 Gy und 3 Gy mit einer Abnahme um etwa 15 % signifikant. Mit Abnahmen der Migration von HCT116 p21-/- um etwa 17 % im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen, wurden hier signifikante Änderungen nach 3 Gy und 10 Gy deutlich. Bei Behandlung von U87 Zellen mit Röntgenstrahlen war ein deutlicherer Abfall nach allen eingesetzten Dosen sichtbar. Diese waren nach 1 Gy und 3 Gy auch noch signifikant ($p < 0,05$). Dabei schien die Dosis aber nicht ausschlaggebend, da ein Unterschied von etwa 30 % sowohl nach 1 Gy, 3 Gy als auch nach 10 Gy sichtbar wurde.

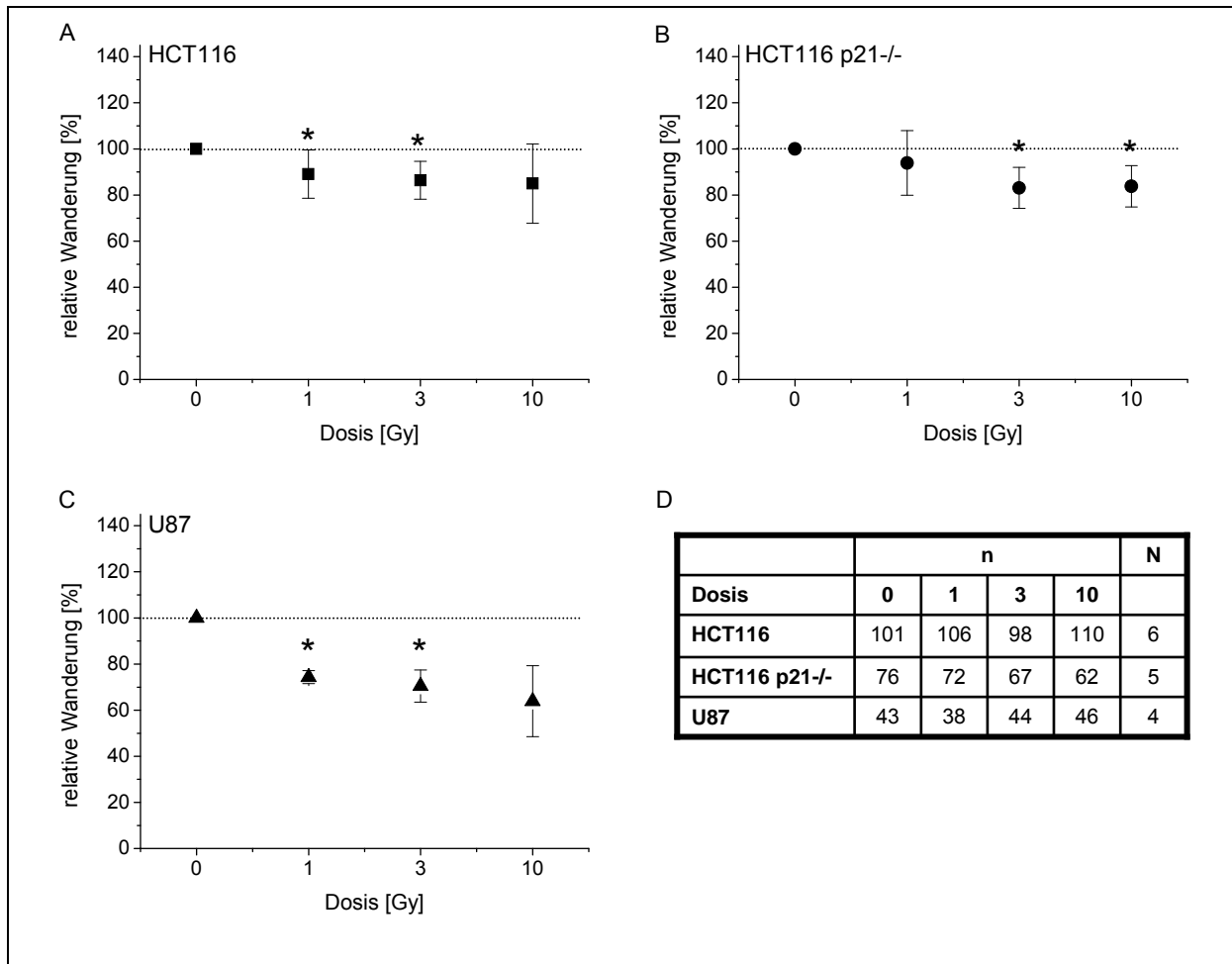


Abbildung 23: Zellmigration direkt nach Röntgenbestrahlung.

Die gezeigten relativen Änderungen der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C) wurden auf die Wanderung unbestrahlter Zellen normiert (100 %, gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Wanderung, welche gegen die verwendete Dosis (Gy) aufgetragen wurde. (* $p < 0,05$; t-test). In (D) sind die Anzahl insgesamt ausgewerteter Wells (n) und die Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche (N) aufgeführt.

In Abbildung 24 ist die relative Zellmigration normiert auf unbestrahlte Kontrollzellen (100 %, gestrichelte Linie) direkt nach Schwerionenstrahlung gezeigt. Im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung veränderte sich die Zellmigration hier bei zwei der drei untersuchten Zelllinien kaum. So zeigten HCT116 Zellen (A) nur eine leichte Abnahme der Migration um etwa 10 % die nur nach 3 Gy signifikant war. Ähnliches galt für HCT116 p21-/- Zellen (B). Hier wurde eine Abnahme der Migration um etwa 20 % deutlich, welche nur nach 1 Gy als signifikant bestimmt werden konnte. U87 (C) zeigten - ähnlich wie HCT116 Zellen - eine Abnahme der Migration von etwa 10 %. Diese wich hier aber nicht signifikant von der Migration der Kontrollzellen ab.

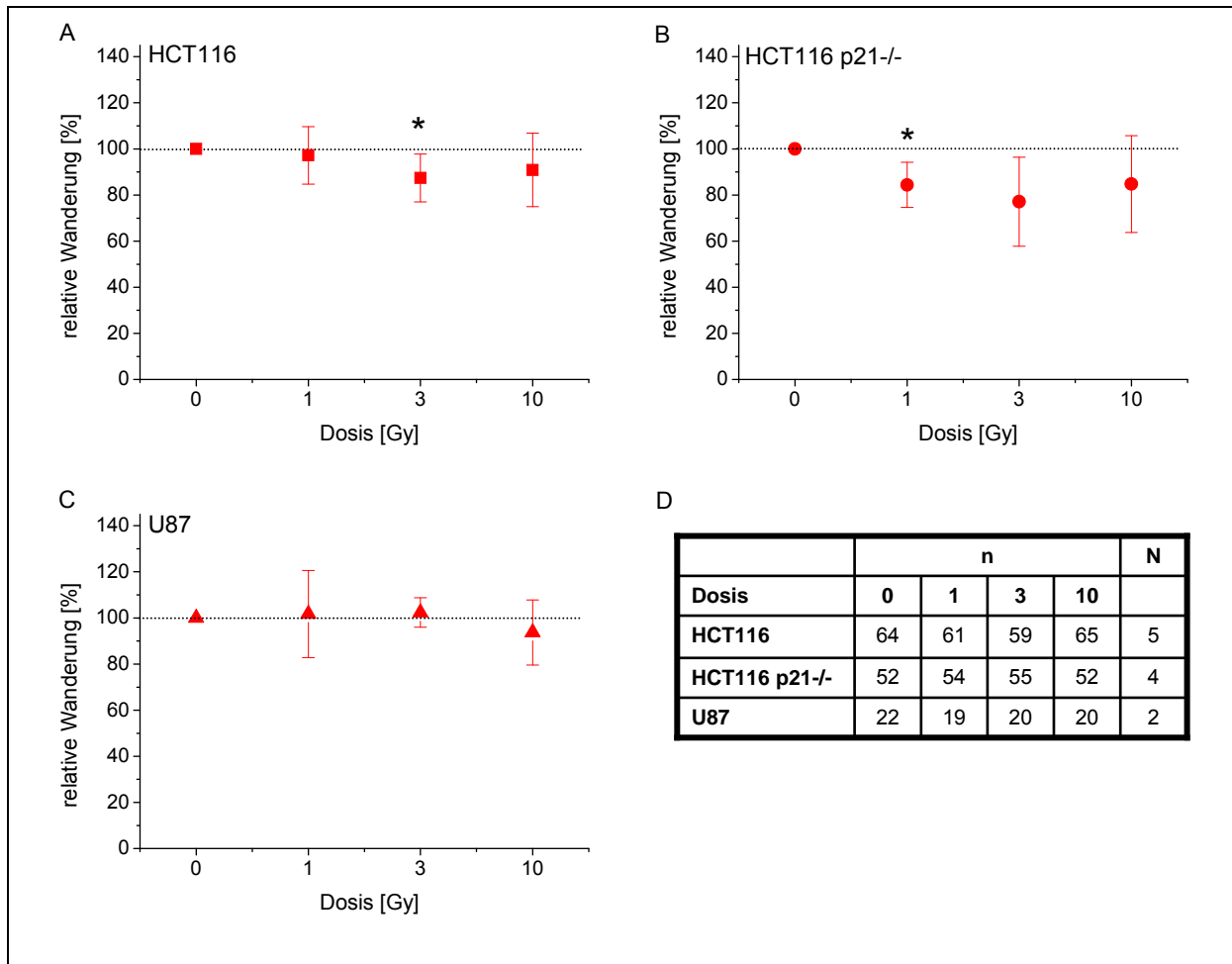


Abbildung 24: Zellwanderung direkt nach Schwerionenbestrahlung.

Die gezeigten relativen Änderungen der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C) wurden auf die Wanderung unbestrahlter Zellen normiert (100 %, gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Wanderung, welche gegen die verwendete Dosis (Gy) aufgetragen wurde. (* $p < 0,05$; t-test). In (D) sind die Anzahl insgesamt ausgewerteter Wells (n) und die Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche (N) aufgeführt.

Die gezeigten Ergebnisse deuteten auf eine kaum akut veränderte Migration der Zellen – außer bei U87 Zellen - nach Röntgen- oder Schwerionenbestrahlung hin. Dabei schien die Art der Strahlung keine unterschiedlichen Einflüsse auf die Migration zu haben, was auf einen zelllinienspezifischen Effekt hindeuten könnte. Um die Migrationsänderungen der Strahlenarten bei gleicher Dosis zu ermitteln, wurde die jeweilige relative Wanderung der Zelle als Mittelwerte (+ Standardabweichung) gegen die eingesetzte Dosis aufgetragen und die Signifikanz der Unterschiede bestimmt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

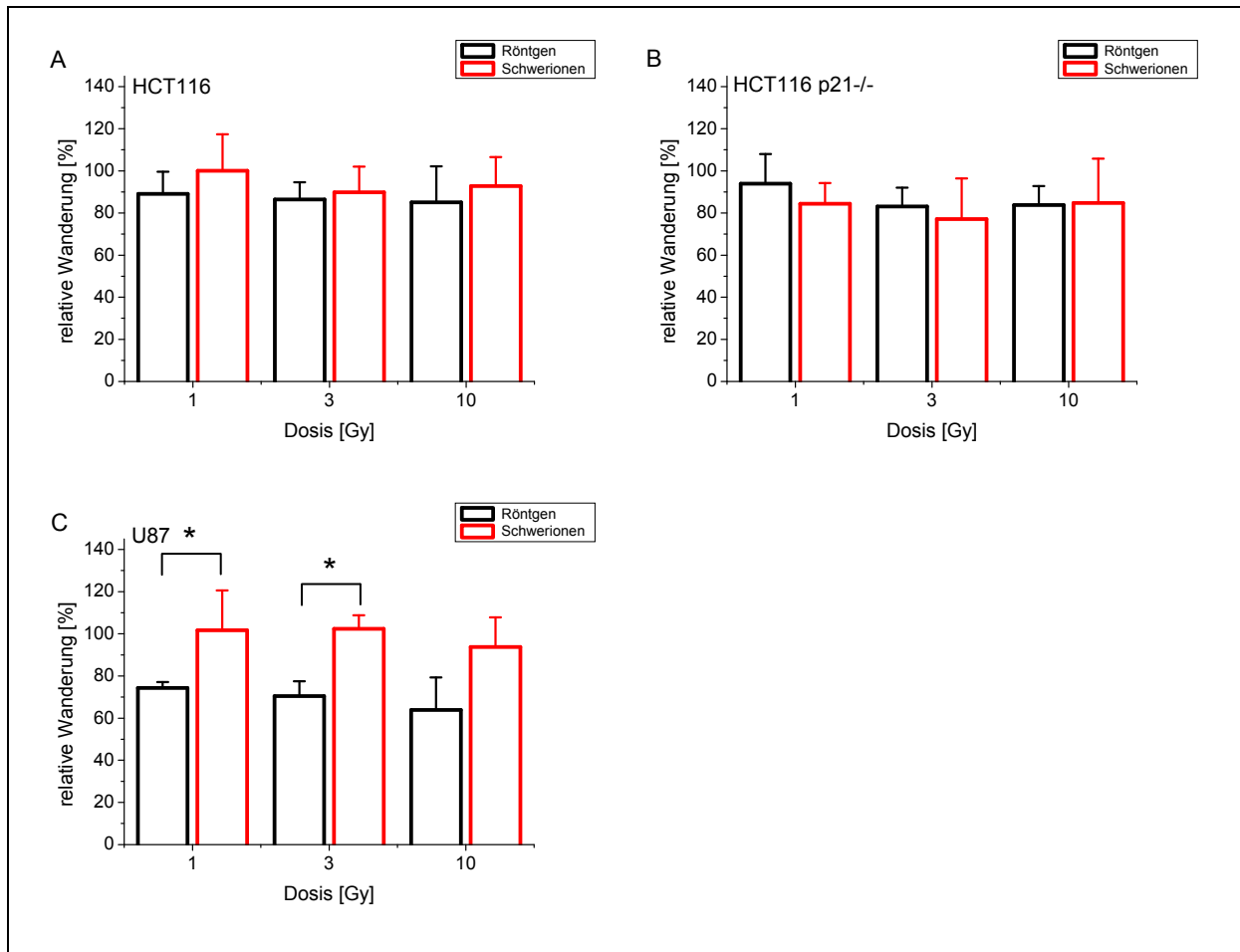


Abbildung 25: Vergleich des Einflusses verschiedener Strahlenarten auf die Migration.

Gezeigt sind relative Änderungen der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21^{-/-} (B) und U87 (C) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen (100 %). Dabei wurde die Signifikanz der Änderung durch beide untersuchten Strahlenarten (schwarz = Röntgenstrahlung, rot = Schwerionenstrahlung) bei gleicher effektiver Dosis verglichen. (* $p < 0,05$; t-test).

Beide kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 (Abbildung 25 A) und HCT116 p21^{-/-} (Abbildung 25 B) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Migration direkt nach Behandlung mit gleichen Dosen Röntgen- oder Schwerionenstrahlung. Für U87 Zellen hingegen konnte mittels t-test ($p < 0,05$) signifikante Unterschiede in der Migration nach 1 Gy und 3 Gy Bestrahlung ermittelt werden. Bei diesen beiden Dosen verminderte die Behandlung mit Röntgenstrahlung die Zellwanderung deutlich effektiver als eine Behandlung der Zellen mit Schwerionen. Auch nach Bestrahlung mit 10 Gy zeigten sich ähnliche Unterschiede zwischen beiden Strahlenarten, diese waren aber nicht signifikant.

Die Ergebnisse verdeutlichten mögliche zelllinien- und strahlenspezifische Einflüsse auf die Migration schon direkt nach Bestrahlung der Zellen.

Für eine mögliche strahleninduzierte Bildung von Metastasen spielt allerdings nicht nur die akut beeinflusste Zellmigration eine Rolle. Vielmehr kann auch eine langfristige Veränderung der Zellwanderung durch Strahlung erzeugt werden. Eine Beeinflussung könnte *in vitro* 24 Stunden nach Bestrahlung in einer veränderten Tumorzellmigration sichtbar werden. Dies

konnte unter anderem schon von Ogata et al. (2005) für beide hier eingesetzten Strahlenarten gezeigt werden. Daher wurde auch hier die Zellmigration 24 Stunden nach Bestrahlung untersucht. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.3.2 Migrationsmessungen 24 Stunden nach Bestrahlung

Die Migration der Tumorzellen 24 Stunden nach Behandlung mit Röntgenstrahlen ist in Abbildung 26 dargestellt. Dabei wurde der Mittelwert (\pm Standardabweichung) des prozentualen Anteils gewanderter Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen (100 %, gestrichelte Linie) gegen die eingesetzte Dosis aufgetragen. Es zeigten sich, im Gegensatz zum Zeitpunkt direkt nach Bestrahlung, deutliche zelllinienspezifische und zum Teil auch dosisabhängige Veränderungen der Zellmigration.

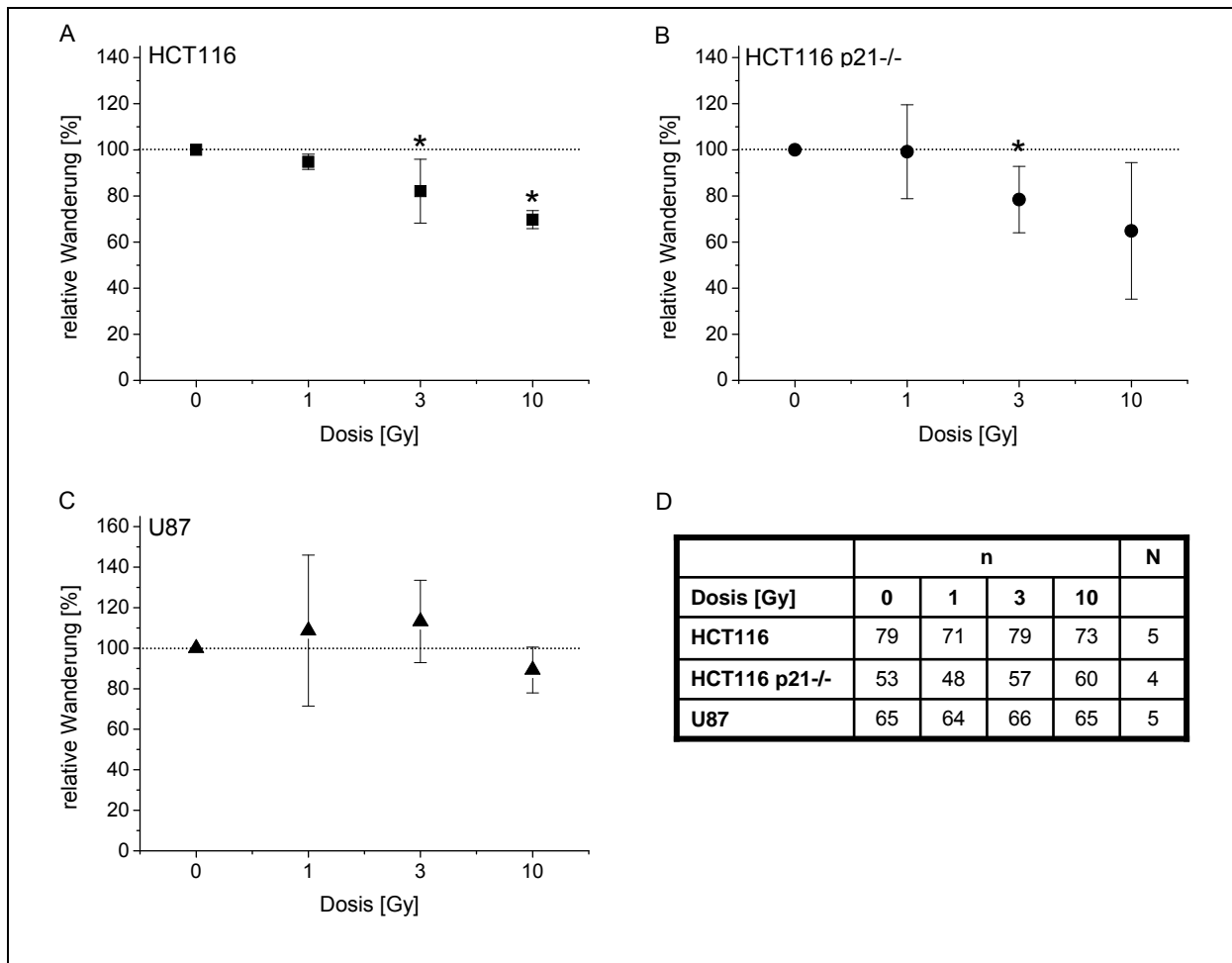


Abbildung 26: Zellwanderung 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung.

Die gezeigten relativen Änderungen der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C) wurden auf die Wanderung unbestrahlter Zellen normiert (100 %, gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Wanderung, welche gegen die verwendete Dosis (Gy) aufgetragen wurde. (* $p < 0,05$; t-test). In (D) sind die Anzahl insgesamt ausgewerteter Wells (n) und die Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche (N) aufgeführt.

Abbildung 26 A zeigt die Wanderung der Zelllinien HCT116 24 Stunden nach Bestrahlung. Hier war eine signifikante dosisabhängige Abnahme der Migration nach 3 Gy und 10 Gy Röntgenbestrahlung zu erkennen. Dabei sank die Zellwanderung um bis zu 30 % (10 Gy). Ein ähnliches Bild zeigten HCT116 p21-/- Zellen (Abbildung 26 B). Auch hier wurde eine dosisabhängige Abnahme der Zellwanderung sichtbar, welche um 35 % nach 10 Gy sank. Eine Signifikanz der Änderung konnte allerdings nur nach einer Bestrahlung mit 3 Gy festgestellt werden. U87 Zellen zeigten ein anders Bild (Abbildung 26 C). Hier nahm die Tumorzellmigration nach klinisch relevanten Dosen von 1 Gy und 3 Gy Röntgenbestrahlung leicht zu, während nach 10 Gy eine leichte Abnahme der Wanderung deutlich wurde. Diese gemittelten Änderungen der Zellmigration waren allerdings, im Gegensatz zu denen der kolorektalen Karzinomzelllinien, nicht signifikant und bewegten sich im Rahmen von etwa 10 %.

Eine Betrachtung der einzelnen in Abbildung 26 gemittelten Versuche und eine separate statistisch Auswertung machten allerdings Unterschiede zwischen den durchgeführten Experimenten - vor allem bei der Zelllinie U87 - deutlich. Abbildung 27 zeigt daher den prozentualen Anteil gewanderter Zellen der oben gemittelten Einzelversuche. Diese wurden erneut gegen die verwendete Dosis aufgetragen.

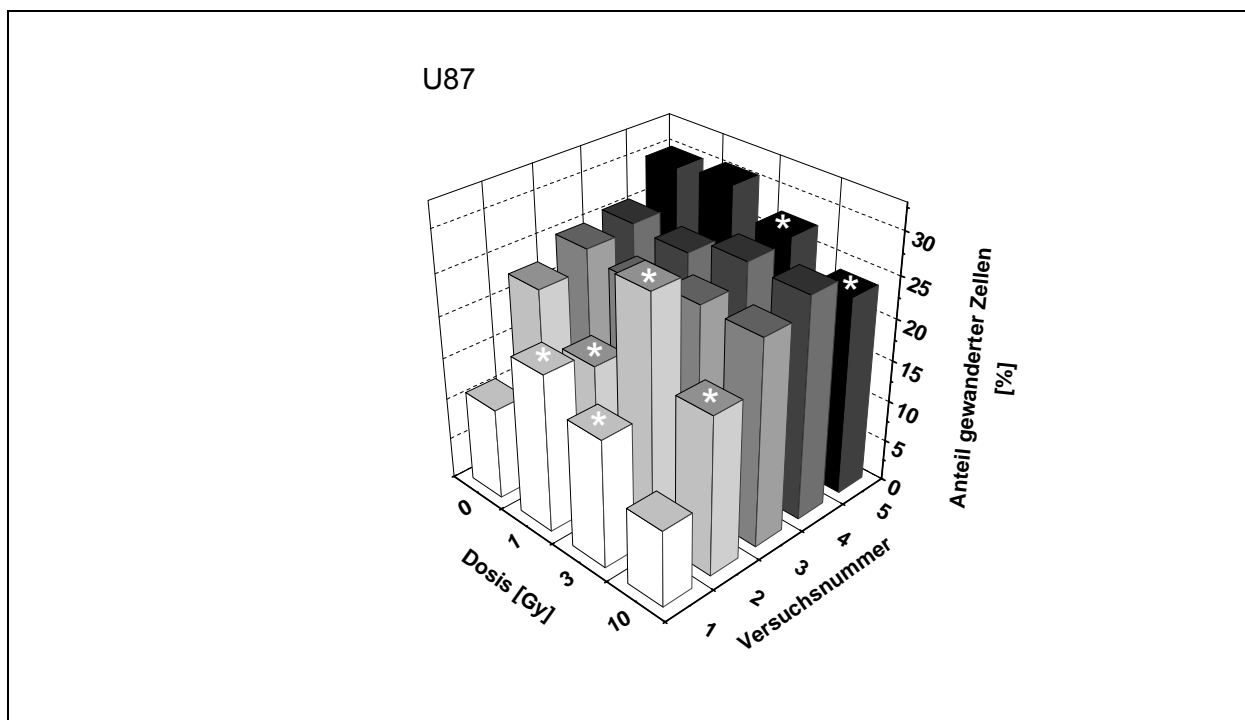


Abbildung 27: Zellwanderung der Zelllinie U87 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung. Gezeigt ist der relative Anteil gewanderter Zellen in Prozent im Vergleich zur Einsaat aufgetragen gegen die verwendete Dosis in Gy. Unterschiedliche Farben stellen dabei die Ergebnisse der durchgeführten Einzelversuche dar (Versuchsnummer). (* $p < 0,05$; t-test).

Es waren zwei unterschiedliche Wanderungsmuster von U87 Zellen zu erkennen. Zum einen wurden Versuche durchgeführt, in denen sich kaum etwas am prozentualen Anteil der ge-

wanderten Zellen nach Bestrahlung änderte (Versuch 3, 4 und 5). Dabei migrierten unbestrahlte Kontrollzellen mit einem Anteil von 25 % im Vergleich zur Einsaat. Dieser Prozentsatz sank nur in Versuch 5 signifikant nach Bestrahlung mit 10 Gy auf unter 25 %. Lag der Anteil wandernder Zellen unter Kontrollbedingungen hingegen deutlich tiefer, so zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung der Zellmigration durch Bestrahlung mit klinisch relevanten Dosen von 1 Gy oder 3 Gy (Versuch 1 und 2). Dabei wurde in Versuch 1 ein signifikanter Anstieg der Migration nach 1 Gy und 3 Gy deutlich. Versuch 2 ergab einen ebenfalls signifikanten Anstieg der Wanderung von U87 Zellen nach 3 Gy, aber zudem eine signifikante Abnahme der Migration nach 1 Gy und 10 Gy. Bei der Zelllinie U87 schien ein Migrationsanteil unbestrahlter Kontrollzellen von etwa 25 % zu keiner weiteren Steigerung der Wanderung zu führen. Nur wenn sich schon in den unbestrahlten Zellen ein geringerer Anteil wandernder Zellen befand, war es möglich, eine Steigerung der Zellmigration nach Bestrahlung zu detektieren.

Um herauszufinden, ob es sich bei diesem Phänomen um ein zelllinienspezifisches Problem oder um ein allgemeingültiges Problem bei der Methode der Boydenkammer handelt, wurden auch die für die Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} gemittelten Versuche 24 Stunden nach Bestrahlung einzeln aufgetragen und statistisch ausgewertet. Abbildung 28 zeigt den prozentualen Anteil gewanderter Zellen im Vergleich zur Einsaat als Funktion der verwendeten Dosis in Gy.

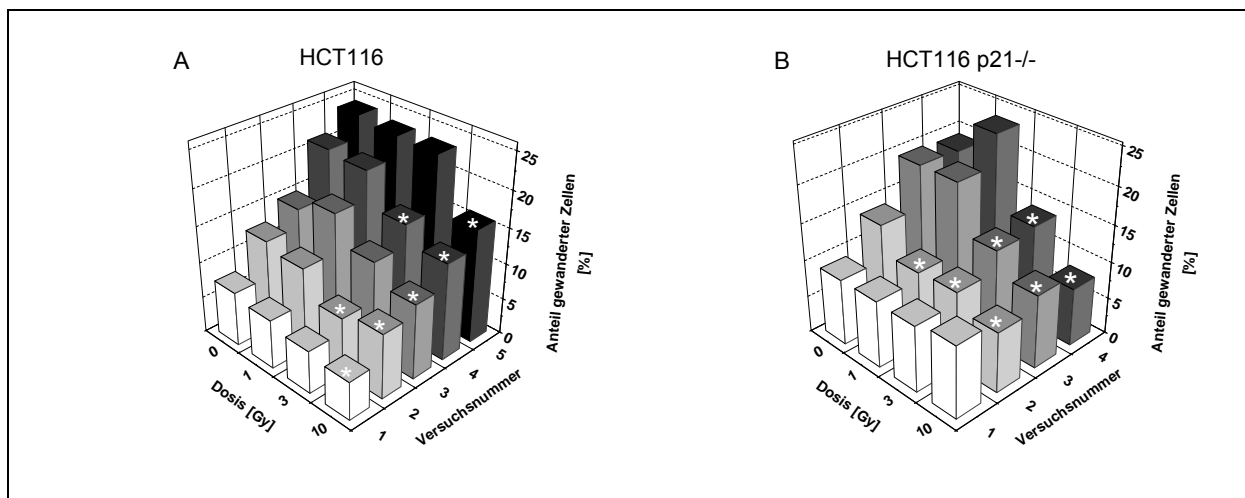


Abbildung 28: Zellwanderung 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung.

Gezeigt ist der relative Anteil gewanderter Zellen in Prozent (HCT116 (A) und HCT116 p21^{-/-} (B)) im Vergleich zur Einsaat aufgetragen gegen die verwendete Dosis in Gy. Unterschiedliche Farben stellen dabei die Ergebnisse der durchgeführten Einzelversuche dar (Versuchsnummer). (* $p < 0,05$; t-test).

In Abbildung 28 A sind die Einzelversuche der Zelllinie HCT116 dargestellt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit U87 Zellen zeigte sich für alle durchgeführten Versuche ein ähnlicher Verlauf der Migrationsänderungen mit einer Abnahme der Zellwanderung nach hohen Do-

sen. Auch hier gab es Unterschiede im prozentualen Anteil der wandernden Kontrollzellen im Vergleich zur Einsaat. Dieser schien allerdings in diesem Fall keinen so großen Einfluss auf das Ergebnis der Migration zu haben. Ähnliches galt für die in Abbildung 28 B dargestellten Versuche der Zelllinie HCT116 p21^{-/-}. Hier schien es eine untere Grenze zu geben, ab der Unterschiede nicht mehr detektiert werden konnten (Versuch 1). Die in Versuch 4 zu erkennende Zunahme der Migration nach einer Behandlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung ist nicht signifikant und mit einer hohen Standardabweichung eher auf Probleme bei der Einsaat oder der Auswertung zurückzuführen.

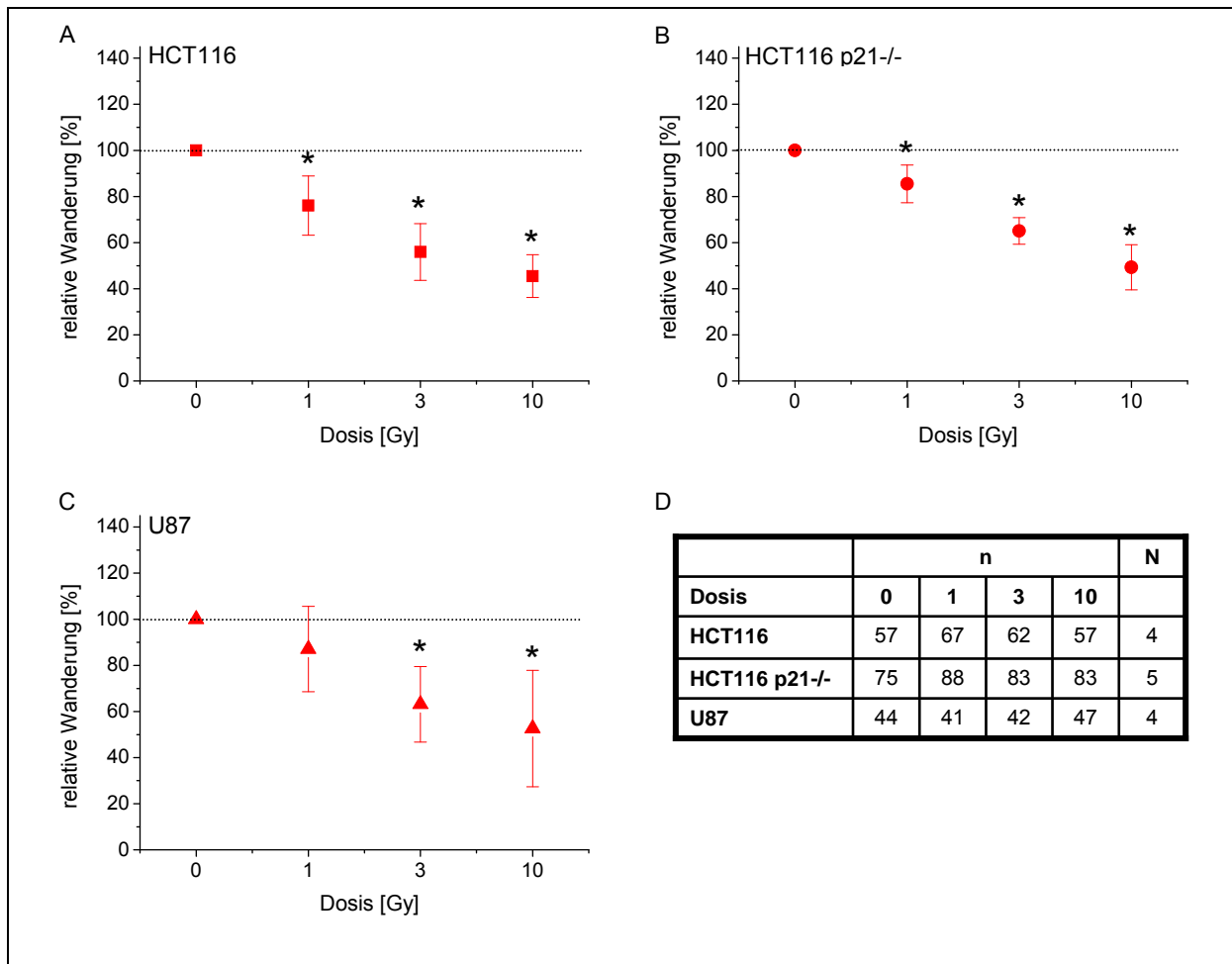


Abbildung 29: Zellwanderung 24 Stunden nach Schwerionenbestrahlung.

Die gezeigten relativen Änderungen der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21^{-/-} (B) und U87 (C) wurden auf die Wanderung unbestrahlter Zellen normiert (100 %, gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Wanderung, welche gegen die verwendete Dosis (Gy) aufgetragen wurde. (* p < 0,05; t-test). In (D) sind die Anzahl insgesamt ausgewerteter Wells (n) und die Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche (N) aufgeführt.

Die Zellmigration 24 Stunden nach Bestrahlung mit ¹²C-Schwerionen wurde ebenfalls untersucht. Abbildung 29 zeigt die beobachteten Veränderungen. Dabei wurde die relative, prozentuale Wanderung der Zellen auf die Migration unbestrahlter Kontrollzellen normiert (100 %, gestrichelte Linie) und als Mittelwerte (± Standardabweichung) gegen die Dosis aufgetragen.

Hier war, im Gegensatz zur Behandlung mit Röntgenstrahlen, bei allen untersuchten Zelllinien ein ähnliches Bild der Migration zu finden. So zeigten alle Zelllinien eine dosisabhängige Abnahme der Migration, die sich nur in ihrer Differenz zur Kontrolle unterschied. Die Wanderung von HCT116 Zellen (A) sank auf bis zu 45 % im Vergleich zu unbestrahlten Zellen ab, während bei HCT116 p21-/- (B) und U87 Zellen (C) noch etwa die Hälfte der Zellen wanderten (49 % bzw. 53 %). In diesem Fall schien also die eingesetzte Strahlung auf alle Zellen einen ähnlichen Einfluss zu haben und die Migration der Zellen im gleichen Maße negativ zu beeinflussen. Dabei waren die beobachteten Abnahmen der kolorektalen Karzinomzelllinien nach allen eingesetzten Dosen signifikant, während eine Signifikanz der veränderten Zellmigration von U87 Zellen nur nach Bestrahlung mit 3 Gy und 10 Gy ermittelt werden konnte ($p < 0,05$; t-test).

Auch für die in Abbildung 29 gemittelten Versuche wurden Einzelauswertungen durchgeführt. Diese sind in Abbildung 30 dargestellt und zeigen den prozentualen Anteil gewanderter Zellen der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C).

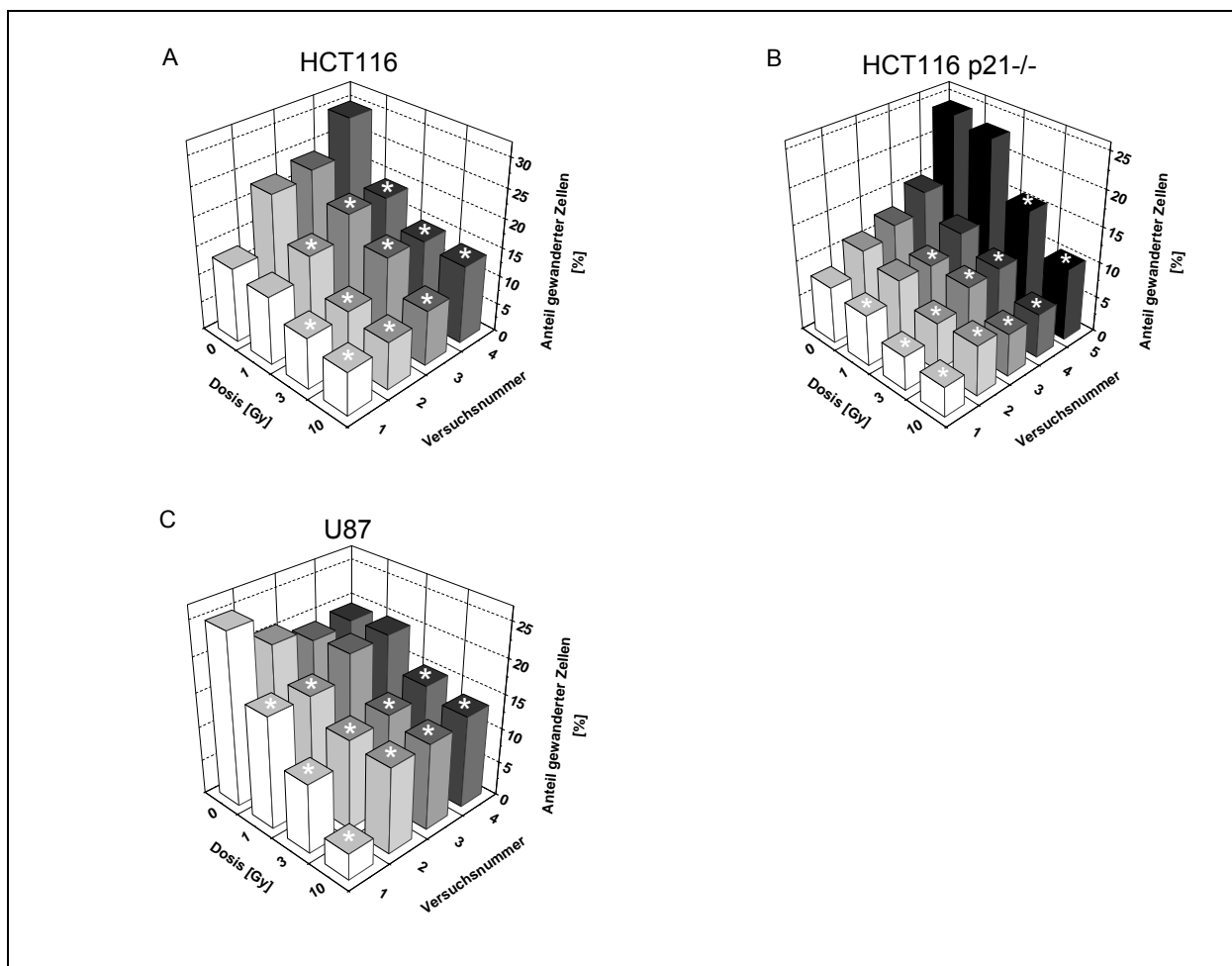


Abbildung 30: Zellmigration 24 Stunden nach Schwerionenbestrahlung.

Gezeigt wurde der relative Anteil gewanderter Zellen in Prozent im Vergleich zur Einsaat der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21-/- (B) und U87 (C) aufgetragen gegen die verwendete Dosis in Gy. Unterschiedliche Farben stellen dabei die Ergebnisse der durchgeführten Einzelversuche dar (Versuchsnummer). (* $p < 0,05$; t-test).

Im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung war hier keine hohe Vorstimulation der Zellen zu erkennen. In allen hier durchgeführten Versuchen lag der Anteil migrierender Zellen in den unbestrahlten Kontrollen unterhalb von 25 %, was als unterer Grenzwert für eine hohe Vorstimulation der Migration eingestuft wurde. Vielmehr zeigten sich in allen Experimenten signifikante Veränderungen der Zellmigration. Die Abnahme der Migration wurde vor allem nach 3 Gy und 10 Gy in allen durchgeführten Versuchen unabhängig von der Zelllinie deutlich.

Um auch 24 Stunden nach Bestrahlung eine Aussage über die Effektivität der Strahlenarten machen zu können, wurden auch hier die Ergebnisse der Zellmigration dosisabhängig miteinander verglichen. Dazu wurden die Mittelwerte (+ Standardabweichung) gegen die eingesetzte Dosis aufgetragen und die Unterschiede in der Zellmigration nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung bei gleicher Dosis auf Signifikanz getestet. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

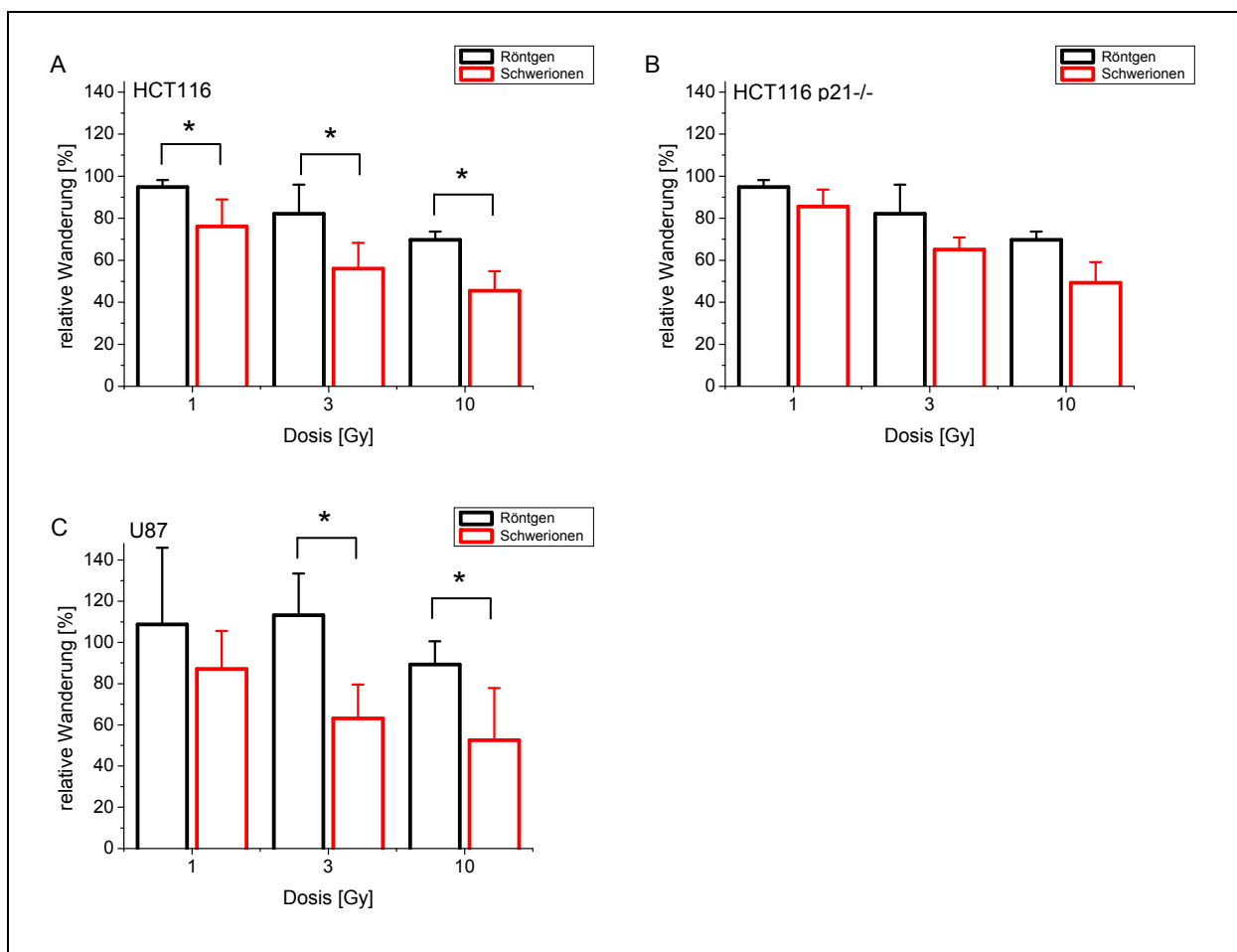


Abbildung 31: Vergleich des Einflusses verschiedener Strahlenarten auf die Migration.

Gezeigt sind relative Änderungen der Zellmigration der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21^{-/-} (B) und U87 (C) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen (100 %). Dabei wurde die Signifikanz der Änderung durch die untersuchten Strahlenarten (schwarz = Röntgenbestrahlung, rot = Schwerionenbestrahlung) bei gleicher effektiver Dosis bestimmt. (* $p < 0,05$; t-test).

Es zeigte sich eine zelllinienabhängige Effektivität der beiden Strahlenarten auf die Migration 24 Stunden nach Bestrahlung. So führte eine Schwerionenbehandlung in HCT116 Zellen (A) nach allen drei eingesetzten Dosen von 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy zu einer signifikant deutlicheren Abnahme der Zellmigration im Vergleich zur Behandlung mit Röntgenstrahlen ($p < 0,05$; t-test). Die Zellmigration von HCT116 p21-/- Zellen (B) nahm nach Schwerionenbestrahlung zwar auch stärker ab, als nach Röntgenbestrahlung. Hier waren die Änderungen allerdings nicht signifikant. Auch U87 Zellen zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Strahlenarten. Dabei waren die Änderungen allerdings nur nach 3 Gy und 10 Gy deutlich und zeigten eine klare Abnahme der Migration nach Behandlung mit ^{12}C -Ionen, welche nach Röntgenbestrahlung nicht erzeugt werden konnte.

In den bis hierher dargestellten Ergebnissen zeigte sich, dass die Tumorzellmigration durch Bestrahlung zelllinien- und strahlenspezifisch beeinflusst werden konnte. Dabei wurden aber Veränderungen der Migration zum Teil nicht direkt nach Bestrahlung, sondern vielmehr erst 24 Stunden später sichtbar. Unabhängig von der Strahlenart zeigten sich direkt nach Bestrahlung der Zellen kaum signifikante Änderungen. 24 Stunden nach Behandlung hingegen war abhängig von der eingesetzten Zelllinie und der Strahlenart eine signifikante Veränderung der Migration zu erkennen. Daher stellte sich nun die Frage, wie sich diese unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf molekularer Ebene erklären ließen. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Expression migrationsrelevanter Proteine. Die diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.4 Analysen der Proteinexpression

Aufgrund vorangegangener Ergebnisse andere Arbeitsgruppen schien eine Veränderung der Expression der β_1 oder β_3 Integrine eine mögliche Erklärung für die hier beobachteten Migrationsunterschiede. So konnte zum Beispiel eine erhöhte β_1 und β_3 Integrinexpression nach Bestrahlung in verschiedenen Gliomzelllinien von Cordes et al. (2003) festgestellt werden. In der kolorektalen Karzinomzelllinien COLO-320 konnte ebenfalls eine Erhöhung von β_1 Integrinen nach Bestrahlung detektiert werden (Meineke et al., 2002) und Abdollahi et al. (2005) konnten einen Bestrahlungseinfluss auf die Expression des Integrins β_3 zeigen. Daher wurden parallel zu den für die Migration eingesetzten Zellen, Zelllysate für die Analyse der Proteinexpression hergestellt und die Expression der Integrine β_1 und β_3 direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung untersucht.

Da nicht zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung von jeder Zelllinie eine gleiche Anzahl Proben untersucht werden konnten, zeigen Tabelle 6 (0 Stunden) und Tabelle 7 (24 Stunden) die Anzahl der jeweils durchgeführten Western Blot Versuche der untersuchten migrationsre-

levanten Proteine. Dort sind auch schon die Anzahl Versuche für die später gezeigten Untersuchungen der Proteine Akt1, Akt2 und der Phosphorylierung von Akt aufgeführt.

Tabelle 6: Anzahl der durchgeführten Western Blot Versuche direkt nach Bestrahlung.

	β_1		β_3		Akt1		Akt2		pAkt	
	Rö	SIS	Rö	SIS	Rö	SIS	Rö	SIS	Rö	SIS
HCT116	5	3	-	-	4	3	4	3	2	2
HCT116 p21-/-	5	1	-	-	1	3	4	3	3	2
U87	2	3	4	1	2	1	4	1	5	1

Rö = Versuche nach Röntgenstrahlung; SIS = Versuche nach Schwerionenstrahlung.

Tabelle 7: Anzahl der durchgeführten Western Blot Versuche 24 Stunden nach Bestrahlung.

	β_1		β_3		Akt1		Akt2		pAkt	
	Rö	SIS	Rö	SIS	Rö	SIS	Rö	SIS	Rö	SIS
HCT116	6	4	-	-	4	3	4	5	2	3
HCT116 p21-/-	4	3	-	-	2	4	4	3	3	1
U87	4	5	5	4	2	4	4	2	5	2

Rö = Versuche nach Röntgenstrahlung; SIS = Versuche nach Schwerionenstrahlung.

3.4.1 β_1 Integrinexpression

Abbildung 32 zeigt repräsentative Western Blot Banden der Proteine β_1 Integrin und Aktin der Zelllinien HCT116, HCT116 p21-/- und U87 direkt bzw. 24 Stunden nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung.

Für weitere densitometrische Auswertungen wurde die optische Dichte (OD) der einzelnen Integrinbanden bestimmt und mit der OD des hier verwendeten Haushaltsproteins Aktin verrechnet. Aus den so normierten Intensitätswerten wurden relative, prozentuale Veränderungen der Proteinexpression im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen ermittelt. Diese relativen Veränderungen sind in den folgenden Tabellen als Zunahmen (+) bzw. Abnahme (-) der Expression eingetragen.

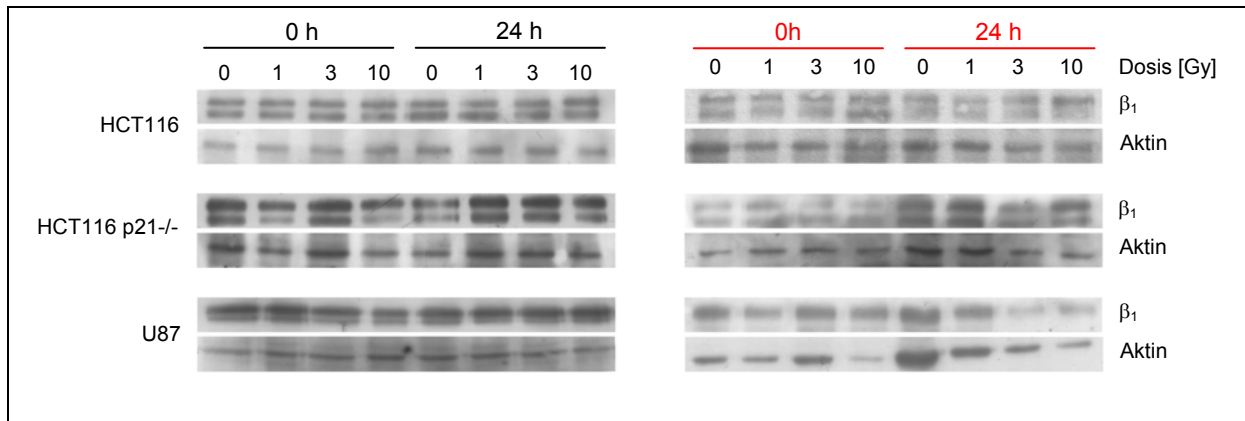


Abbildung 32: Western Blots der Proteine β_1 Integrin und Aktin 0 und 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind Western Blot Nachweise der Proteine β_1 Integrin und Aktin in Lysaten der Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 0 und 24 Stunden (h) nach Röntgen- (schwarz) und Schwerionenbestrahlung (rot). Die Proben wurden mit 0 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy bestrahlt und mit steigender Dosis auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 8 zeigt die relativen, prozentualen Veränderungen der β_1 Integrinexpression direkt nach Bestrahlung.

Tabelle 8: Relative Veränderungen der β_1 Integrinexpression direkt nach Bestrahlung.

Gezeigt sind die relativen, prozentualen Veränderungen der Mittelwerte der β_1 Integrinexpression direkt nach Behandlung mit Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenstrahlung (rot) in den drei untersuchten Zelllinien bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	+ 13	- 28	- 31	+ 251	+ 222	+ 163
HCT116 p21 ^{-/-}	- 2	+ 53	+ 17	+ 30	+ 11	+ 60
U87	+ 86	+ 72	+ 29	+ 11	-11	+ 3

Für die drei untersuchten Zelllinien zeigten sich uneinheitliche Ergebnisse direkt nach Bestrahlung. Während für HCT116 Zellen nach Behandlung mit Röntgenstrahlen eher eine Abnahme der β_1 Integrinexpression nach höheren Dosen (3 Gy und 10 Gy) deutlich wurden, zeigte sich nach Bestrahlung mit ¹²C-Ionen eine klare Zunahme der Expression in dieser Zelllinie nach allen drei verwendeten Dosen. Für HCT116 p21^{-/-} konnte für beide Strahlentypen eher eine Zunahme der Expression ermittelt werden, während U87 Zellen nach Röntgenbestrahlung eine deutliche Zunahme, vor allem nach geringen Dosen und eher keine Veränderungen nach Schwerionenstrahlung zeigten.

In Tabelle 9 sind die induzierten, relativen Veränderungen der β_1 Integrinexpression 24 Stunden nach Bestrahlung sind gezeigt.

Tabelle 9: Relative Veränderungen der β_1 Integrinexpression 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind die relativen, prozentualen Veränderungen der Mittelwerte der β_1 Integrinexpression 24 Stunden nach Behandlung mit Röntgen- oder Schwerionenstrahlung in drei untersuchten Zelllinien bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	+ 23	+31	+ 107	- 27	- 31	- 52
HCT116 p21-/-	+ 31	- 12	- 8	+ 57	+ 77	+ 143
U87	+ 61	+ 34	+ 93	+ 17	+ 155	+ 164

Auch hier zeigten sich vor allem zelllinienspezifische Unterschiede in der relativen β_1 Integrinexpression. So wurde eine dosisabhängige Zunahme der Expression nach Röntgenbestrahlung in HCT116 Zellen um bis zu 107 % (10 Gy) detektiert, während sich nach Bestrahlung mit Schwerionen in derselben Zelllinie eine Abnahme um bis zu 52 % der Expression mit der Dosis zeigte. Behandlung von HCT116 p21-/- Zellen mit Röntgenstrahlung führte 24 Stunden später bei Dosen von 1 Gy zu einer Zunahme der Expression um 31 %, während eine Bestrahlung mit 3 Gy oder 10 Gy zu einer leichten Reduktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen führten (- 12 % bzw. - 8 %). Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen führte in diesen Zellen zu einer dosisabhängigen Zunahme von β_1 Integrinen um bis zu 143 %. In U87 Gliomzellen konnten sowohl nach Röntgen- als auch Schwerionenbestrahlung deutliche Zunahmen in der Proteinexpression bis zu 93 % bzw. 164 % detektiert werden. Diese waren nach Bestrahlung von ^{12}C -Ionen dosisabhängig, während sich nach Röntgenbestrahlung ein uneinheitliches Bild zeigte.

3.4.2 β_3 Integrinexpression

Abbildung 33 zeigt repräsentative Western Blot Banden der Proteine β_3 Integrin und Aktin der Zelllinien HCT116, HCT116 p21-/- und U87. Dabei wurden in Abbildung 33 A die Expression in unbestrahlten Zellen verglichen, während Abbildung 33 B die Proteinbanden der Zelllinie U87 nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung zeigt.

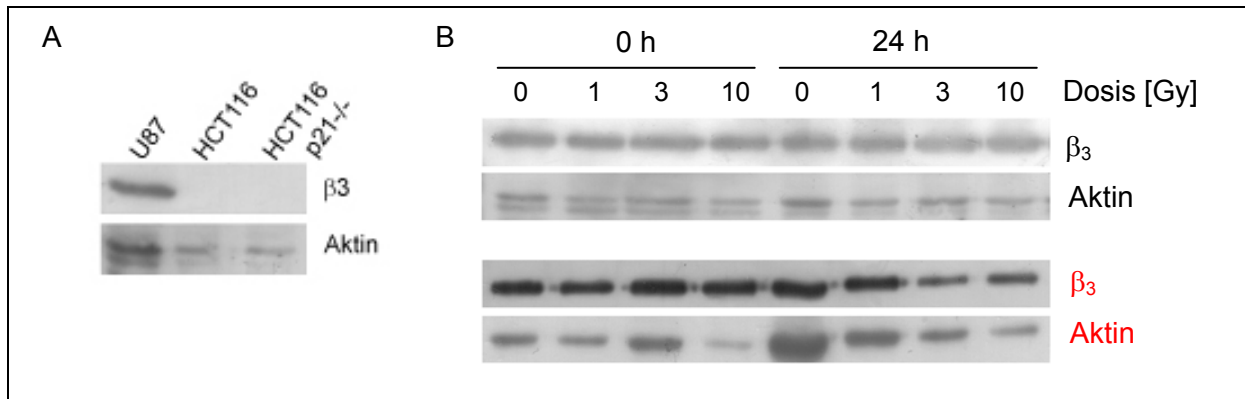


Abbildung 33: β_3 Integrinexpression in verschiedenen Zelllinien und nach Bestrahlung in U87 Zellen.

Gezeigt sind Nachweise der Proteine β_3 Integrin und Aktin der Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 (A) und in U87 Zellen direkt und 24 Stunden (0 h und 24 h) nach Röntgen- (schwarz) und Schwerionenbestrahlung (rot) (B). In (B) wurden die Zellen mit 0 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy bestrahlt und mit steigender Dosis auf das Gel aufgetragen.

In diesen Western Blot Versuchen zeigten sich zelllinienspezifische Integrinexpressionsmuster. So exprimierten die Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} kein β_3 Integrin während dieses in Zelllysaten von U87 Gliomzellen deutlich detektiert werden konnte. Für weitere Auswertungen der Expressionsänderungen von β_3 Integrinen nach Bestrahlung kam daher nur noch die Zelllinie U87 in Frage. Auch hier wurde für die densitometrische Auswertung die OD der einzelnen Banden bestimmt, auf Aktin normiert und relativ zu unbestrahlten Kontrollzellen ausgewertet. Die so erhaltenen relativen, prozentualen Änderungen zu beiden untersuchten Zeitpunkten (0 Stunden und 24 Stunden) für Röntgen- und Schwerionenstrahlung sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Relative Veränderungen der β_3 Integrinexpression in U87 Zellen nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative, prozentuale Veränderungen der β_3 Integrinexpression in U87 Zellen nach Röntgen- oder Schwerionenbestrahlung. Die Werte wurden auf die Proteinexpression in unbestrahlten Kontrollzellen bezogen.

	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
Dosis [Gy]	1	3	10	1	3	10
0 Stunden	± 0	+ 9	- 2	+ 20	- 16	+ 109
24 Stunden	+ 244	+ 509	+ 360	+ 19	+ 34	+ 66

U87 Zellen zeigten direkt nach Bestrahlung nur bei Einsatz hoher Dosen Schwerionen eine deutliche Änderung der β_3 Integrinexpression. Nach Behandlung mit Röntgenstrahlen unterschieden sich die detektierten Bandenintensitäten von denen unbestrahlter Kontrollzellen nur um maximal 9 % (3 Gy). Direkt nach Schwerionenbestrahlung wurden bei kleinen, klinisch relevanten Dosen (1 Gy und 3 Gy) geringe uneinheitliche Veränderungen festgestellt (+ 20 % bzw. - 16 %). Nur nach einer Bestrahlung mit 10 Gy ¹²C-Ionen wurde eine deutliche Erhö-

hung um 109 % detektiert. 24 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich ein anderes Bild. Zu diesem Zeitpunkt konnte nach Röntgenbestrahlung eine deutliche Zunahme der β_3 Integrinexpression in U87 Zellen um bis zu 509 % nachgewiesen werden. 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit einem ^{12}C -Ionenstrahl zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Proteinexpression. Diese stieg dosisabhängig um bis zu 66 % nach 10 Gy an.

3.4.3 Akt-Expression

Ebenfalls untersucht wurden mögliche Expressionveränderungen der Proteinkinase Akt. Diese steht an entscheidenden Verzweigungspunkten verschiedener Signalwege (s. auch 1.2.1.1) und spielt eine wichtige Rolle in der migratorischen Signalweiterleitung (Stambolic und Woodgett, 2006). Zudem wurde festgestellt, dass die beiden Akt-Isoformen Akt1 und Akt2 unterschiedliche Einflüsse in der Signaltransduktion haben können. Während Akt1 eher einen Einfluss auf die Zellmigration zu haben scheint, könnte Akt2 vor allem eine Rolle bei der Proliferation und in der apoptotischen Signalkaskade spielen (Irie et al., 2005).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Expressionen der Isoformen Akt1 und Akt2, sowie deren Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot untersucht. Dazu wurden, wie auch schon für die Untersuchung der Integrinexpression, Zelllysate der Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 verwendet und die Expression direkt und 24 Stunden nach Behandlung mit Röntgen- oder Schwerionenstrahlen analysiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

3.4.3.1 Akt1

Abbildung 34 zeigt repräsentative Western Blot Banden der Proteine Akt1 und Aktin aus Zelllysaten der Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 direkt und 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit Röntgen- bzw. Schwerionenstrahlung.

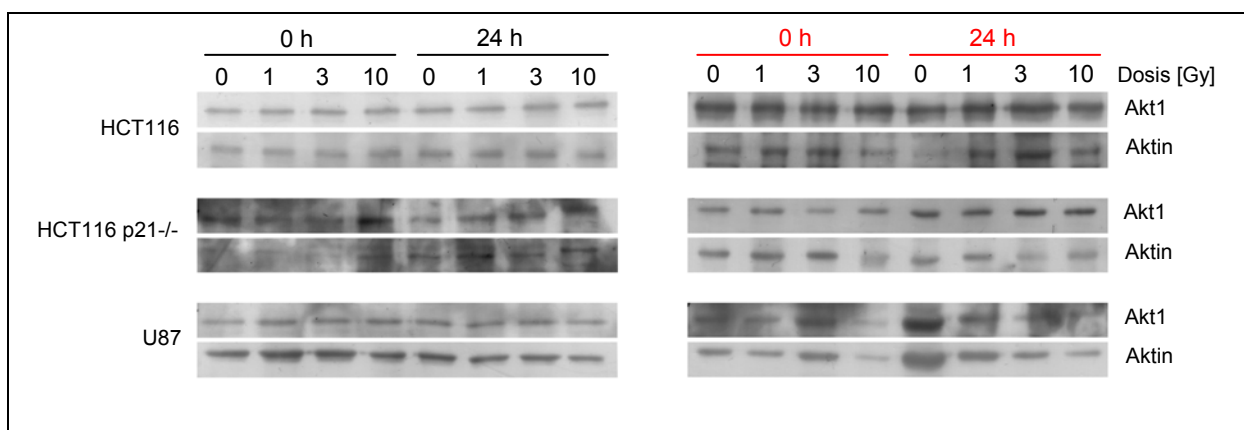


Abbildung 34: Western Blot Nachweis der Akt1-Expression nach Bestrahlung.

Für die Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 wurden die Proteine Akt1 und Aktin mittels Western Blot nachgewiesen. Dies geschah direkt und 24 Stunden (0 h und 24 h) nach Röntgen- (schwarz) bzw. Schwerionenbestrahlung (rot). Gezeigt sind repräsentative Western Blots. Die Proben wurden mit 0 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy bestrahlt und mit steigender Dosis auf das Gel aufgetragen.

Zur relativen, densitometrischen Auswertung der Änderungen der Akt1-Expression wurde die OD der Banden ermittelt, diese auf Aktin normiert und die so erhaltenen Intensitäten auf die Werte unbehandelter Zellen bezogen. Diese wurden als 100 % gesetzt und die Ergebnisse bestrahlter Zellen relativ dazu angegeben. Tabelle 11 zeigt diese relativen prozentualen Änderungen der Akt1-Expression direkt nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung

Tabelle 11: Relative Änderungen der Akt1-Expression direkt nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative, prozentuale Veränderungen der Akt1-Expression direkt nach Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenbestrahlung (rot) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	- 14	+ 17	- 26	+ 19	- 33	- 55
HCT116 p21-/-	+ 11	+ 176	+ 561	+ 23	+ 90	+ 28
U87	+ 9	- 7	- 27	+ 54	+ 158	-

Es wurden zelllinien- und strahlenspezifische Unterschiede deutlich. Direkt nach Röntgenbestrahlung zeigten HCT116 ein uneinheitliches Bild. So sank die Expression von Akt1 nach 1 Gy und 10 Gy (- 14 % bzw. - 26 %) während sie nach Bestrahlung mit 3 Gy um 17 % zunahm. Die Bestrahlung mit 1 Gy ¹²C-Ionen führte zu einer Erhöhung des Proteingehalts um 19 % während eine Behandlung mit Dosen von 3 Gy oder 10 Gy zu einer Abnahme der Expression von Akt1 führten (- 33 % bzw. - 55 %). HCT116 p21-/- Zellen zeigten nach der Röntgenbestrahlung eine deutliche dosisabhängige Zunahme der Expression (um bis zu 561 %). Auch nach Behandlung mit Schwerionen konnte eine Zunahme der Expression detektiert werden. Diese war allerdings nicht dosisabhängig, sondern zeigten leichte Änderungen um 23 % bzw. 28 % nach 1 Gy und 10 Gy und eine deutlichere Erhöhung um 90 % nach Bestrahlung der Zellen mit 3 Gy. Nur geringe Veränderungen konnten in U87 Zellen direkt nach Röntgenbestrahlung mit 1 Gy und 3 Gy festgestellt werden (+ 9 % bzw. - 7 %). Eine etwas deutlichere Reduktion wurde nach Bestrahlung mit 10 Gy detektiert. Direkt nach Bestrahlung mit ¹²C-Ionen konnten auf Grund sehr starker Hintergrundfärbungen nur Dosen von 1 Gy und 3 Gy ausgewertet werden. Dabei zeigte sich eine Zunahme um bis zu 158 % nach 3 Gy.

Ein anderes Bild wurde für die drei untersuchten Zelllinien 24 Stunden nach Bestrahlung ersichtlich. Die dort beobachteten relativen, prozentualen Veränderungen der Akt1-Proteinexpression 24 Stunden nach Bestrahlung sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Relative Änderungen der Akt1-Expression 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative, prozentuale Veränderungen der Akt1-Expression 24 Stunden nach Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenbestrahlung (rot) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	- 10	+ 16	+ 5	- 29	- 37	- 54
HCT116 p21-/-	- 90	+ 69	+ 97	- 25	- 23	+ 37
U87	+ 83	+ 161	+ 96	+ 60	+ 14	+ 102

Es zeigten sich auch hier deutliche zelllinienspezifische Unterschiede. So konnte in HCT116 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung nur geringe Veränderungen detektiert werden. Diese nahmen nach 1 Gy Röntgenstrahlung um 10 % ab, während die Expression nach 3 Gy und 10 Gy mit 16 % bzw. 5 % leicht zunahm. Nach Schwerionenbestrahlung nahm der Akt1-Proteingehalt dosisabhängig um bis zu 54 % ab. HCT116 p21-/- Zellen zeigten nach beiden Strahlenarten ein eher uneinheitliches Bild. Während nach 1 Gy Röntgenstrahlung eine Reduktion um 90 % gemessen wurde, konnte nach Bestrahlung mit 3 Gy und 10 Gy eine Zunahme festgestellt werden (+ 69 % bzw. + 97 %). Bei klinisch relevanten Dosen Schwerionen von 1 Gy und 3 Gy zeigten sich Abnahmen in der Akt1-Expression von 25 % bzw. 23 %, während eine Bestrahlung mit 10 Gy Schwerionen zu einer Erhöhung um 37 % führte. Die Gliomzelllinie U87 zeigte eine Zunahme des Akt1-Proteingehalts nach beiden verwendeten Strahlenarten. Dabei wurde die maximale Erhöhung nach 3 Gy Röntgenstrahlung (+ 161 %) und nach 10 Gy Schwerionenbestrahlung (+ 102 %) detektiert.

3.4.3.2 Akt2

Als repräsentative Beispiele sind in Abbildung 35 Western Blot Banden der Protein Akt2 und Aktin dargestellt. Aus diesen wurden, wie auch schon bei Akt1 und den Integrinen β_1 und β_3 , die relativen, prozentualen Änderungen der Proteinexpression im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen ermittelt. Diese sind für die Zeitpunkte direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt.

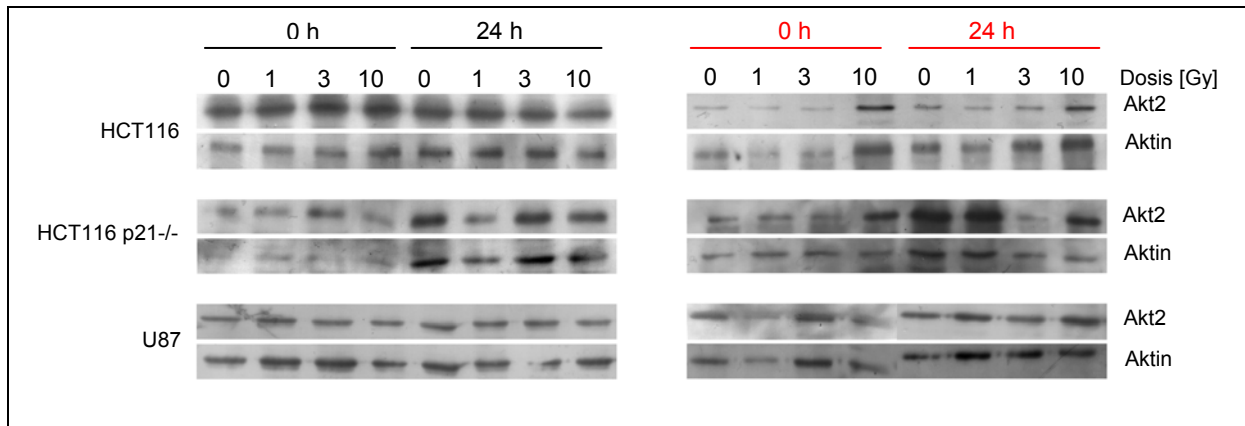


Abbildung 35: Western Blot Nachweis der Akt2-Expression nach Bestrahlung.

Für die Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 wurden die Proteine Akt2 und Aktin mittels Western Blot nachgewiesen. Dies geschah direkt und 24 Stunden (0 h und 24 h) nach Röntgen- (schwarz) bzw. Schwerionenbestrahlung (rot). Gezeigt sind repräsentative Western Blots von Proben die mit 0 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy bestrahlt und mit steigender Dosis auf das Gel aufgetragen wurde.

Tabelle 13 zeigt die Expressionsänderungen der Proteinkinase Akt2 direkt nach Bestrahlung. Auch hier konnten uneinheitliche zelllinien- und strahlenspezifische Änderungen detektiert werden.

Tabelle 13: Relative Änderungen der Akt2-Expression direkt nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative, prozentuale Veränderungen der Akt2-Expression direkt nach Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenbestrahlung (rot) bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	+ 136	+ 24	+ 193	- 16	+ 25	+ 46
HCT116 p21 ^{-/-}	+ 19	+ 160	- 6	- 4	+ 135	+ 71
U87	+ 8	- 9	- 9	+ 83	+ 8	- 11

In HCT116 Zellen führte eine Röntgenbestrahlung zu einer allgemeinen Erhöhung der Proteinkinaseexpression um bis zu 193 % nach einer Dosis von 10 Gy. Bestrahlung mit Schwerionen führte bei einer Dosis von 1 Gy zu einer leichten Abnahme (- 16 %) während Dosen von 3 Gy und 10 Gy zu einer Zunahme um 25 % bzw. 46 % führten. Ein ähnliches Muster zeigte sich auch in HCT116 p21^{-/-} Zellen nach derselben Bestrahlungsart. Dort konnte eine Abnahme nach 1 Gy um 4 % detektiert werden, während eine Bestrahlung mit höheren Dosen zu einer Zunahme führte. Diese lag mit 135 % nach 3 Gy am höchsten. Nach Röntgenbestrahlung zeigte sich ein sehr uneinheitliches Bild. Klinisch relevante Dosen von 1 Gy und 3 Gy induzierten eine Zunahme der Akt2-Expression um 19 % bzw. 160 %, während eine Dosis von 10 Gy zu einer leichten Reduktion führte (- 6 %). U87 Zellen zeigten nach Röntgenbestrahlung mit einer Erhöhung der Expression nach 1 Gy um 8 % und einer Abnahme um 9 % nach 3 Gy und 10 Gy, nur geringe Veränderungen. Schwerionen induzierten in Gliomzellen nur nach einer Dosis von 1 Gy eine deutliche Veränderung. Hier stieg der Protein-

gehalt um 83 %. Nach 3 Gy und 10 Gy wurden nur noch geringe Veränderungen detektiert (+ 8 % bzw. - 11 %).

Tabelle 14: Relative Änderungen der Akt2-Expression 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind prozentuale relative Veränderungen der Akt2-Expression 24 Stunden nach Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenbestrahlung (rot) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	+ 91	+ 36	+ 84	+ 25	+ 45	+ 48
HCT116 p21-/-	+ 75	- 25	- 40	- 1	- 18	- 53
U87	- 12	- 6	+ 6	+ 80	+ 220	+ 238

Für den Untersuchungszeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung sind in Tabelle 14 die ermittelten Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich, dass HCT116 Zellen sowohl nach Röntgen- als auch nach Schwerionenbestrahlung mit einer Erhöhung der Akt2-Expression reagierten. Diese war 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung nach einer Dosis von 1 Gy am deutlichsten (+ 91 %). Nach Behandlung mit ¹²C-Ionen nahm die Expression um bis zu 48 % nach 10 Gy dosisabhängig zu. Die Zelllinie HCT116 p21-/- zeigte nach Röntgenbestrahlung ein uneinheitliches Bild. Während nach einer Dosis von 1 Gy eine Zunahme um 75 % detektiert wurde, führten Dosen von 3 Gy und 10 Gy zu einer Reduktion um 25 % bzw. 40 %. Nach Schwerionenbestrahlung konnte hingegen eine deutliche dosisabhängige Abnahme um bis zu 53 % der Akt2-Expression nachgewiesen werden. U87 Zellen zeigten nur leichte Änderungen nach Röntgenbestrahlung. Dort wurden geringe Abnahmen nach 1 Gy und 3 Gy (- 12 % bzw. - 6 %) und eine leichte Zunahme nach 10 Gy (+ 6 %) registriert. Schwerionenstrahlung führte hingegen zu deutlichen dosisabhängigen Zunahmen um bis zu 238 % nach 10 Gy.

3.4.3.3 pAkt

Da nicht nur eine erhöhte oder verringerte Expression ausschlaggebend für eine Veränderung möglicher Signalwege ist, sondern auch der Phosphorylierungsstatus entscheidend für eine veränderte Aktivität sein kann, wurde dieser für die Proteinkinase Akt ebenfalls untersucht. Der hier verwendete Antikörper konnte nicht zwischen den verschiedenen Akt-Isoformen unterscheiden, so dass hier die Phosphorylierung des gesamten Akts nachgewiesen wurde.

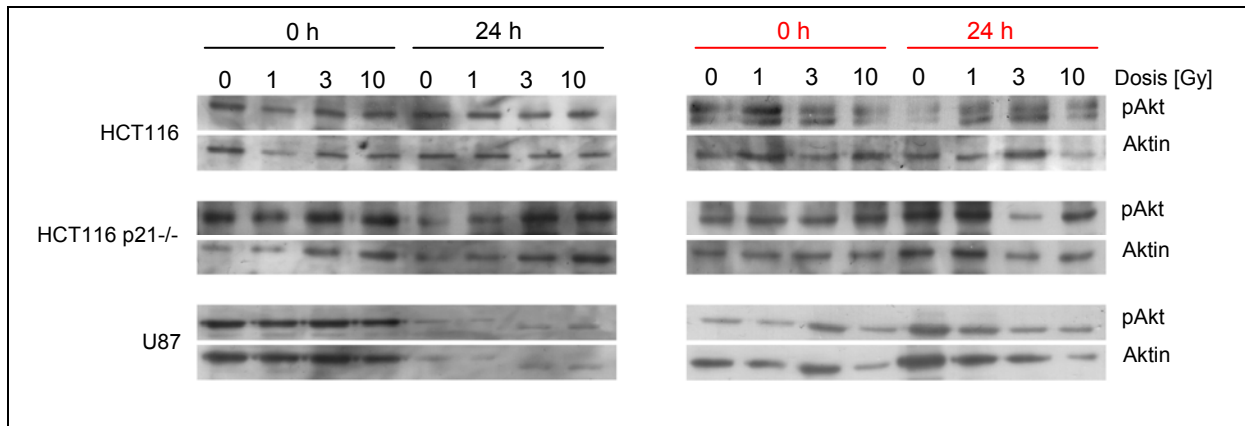


Abbildung 36: Western Blot Nachweis der Akt-Phosphorylierung (pAkt) nach Bestrahlung.

Für die Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 wurden die Proteine pAkt und Aktin mittels Western Blot nachgewiesen. Dies geschah direkt und 24 Stunden (0 h und 24 h) nach Röntgen- (schwarz) bzw. Schwerionenbestrahlung (rot). Gezeigt sind repräsentative Western Blots von Proben die mit 0 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy bestrahlt und mit steigender Dosis auf das Gel aufgetragen wurde.

Abbildung 36 zeigt repräsentative Western Blot Banden des Phosphorylierungsstatus von Akt und des Proteins Aktin aus Zelllysaten der Zelllinien HCT116, HCT116 p21^{-/-} und U87 nach Bestrahlung. Aus diesen berechneten sich die relativen, prozentualen Veränderungen die in Tabelle 15 und Tabelle 16 im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen angegeben wurden.

Tabelle 15: Relative Änderungen der pAkt-Expression direkt nach Bestrahlung.

Gezeigt sind prozentuale relative Veränderungen der pAkt-Expression direkt nach Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenbestrahlung (rot) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	- 54	- 3	- 20	+ 18	- 58	+ 76
HCT116 p21 ^{-/-}	- 41	- 33	+ 38	+ 234	+ 34	+ 76
U87	+ 17	+ 20	- 7	+ 13	+ 53	+ 6

Tabelle 15 zeigt die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt direkt nach Bestrahlung. Es konnte für die Zelllinie HCT116 direkt nach Röntgenbestrahlung eine Abnahme der Phosphorylierung nach allen eingesetzten Dosen detektiert werden. Diese war nach 1 Gy am deutlichsten (- 54 %). Nach Schwerionenbestrahlung zeigte sich ein uneinheitlicheres Bild. Dort nahm die Phosphorylierung nach 1 Gy und 10 Gy zu (um + 18 % bzw. + 76 %) und reduzierte sich nach 3 Gy um 58 %. Eine Röntgenbestrahlung von HCT116 p21^{-/-} Zellen führte zu einer Abnahme nach 1 Gy und 3 Gy (- 41 % bzw. - 33 %) und zu einer Zunahme nach 10 Gy (+ 38 %). U87 Zellen zeigten nach Röntgenbestrahlung geringe Veränderungen mit Zunahmen um 17 % bzw. 20 % nach 1 Gy und 3 Gy und einer Reduktion der Phosphorylierung

nach 10 Gy um 7 %. Eine Bestrahlung mit ¹²C-Ionen induzierte nach allen Dosen eine Zunahme des Phosphorylierungsstatus um bis zu 53 % nach 3 Gy.

Auch 24 Stunden nach Bestrahlung wurde untersucht, in wie weit die Proteinkinase Akt phosphoryliert wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Relative Änderungen der pAkt-Expression 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind prozentuale relative Veränderungen der pAkt-Expression 24 Stunden nach Röntgen- (schwarz) oder Schwerionenbestrahlung (rot) bezogen auf unbestrahlte Kontrollzellen.

Dosis [Gy]	Röntgenstrahlung			Schwerionenstrahlung		
	1	3	10	1	3	10
HCT116	- 3	+ 141	+ 73	+ 122	+ 240	- 63
HCT116 p21-/-	+ 894	+ 539	+ 553	- 24	+ 161	+ 284
U87	- 37	- 39	- 45	+ 19	+ 31	+ 44

HCT116 Zellen zeigten nach Röntgenbestrahlung mit 3 Gy und 10 Gy eine deutliche Erhöhung des Phosphorylierungsstatus um bis zu 141 % (3 Gy) und nur eine sehr geringe Abnahme nach 1 Gy (- 3 %). Schwerionen induzierten in diesen Zellen eine starke Phosphorylierung nach klinisch relevanten Dosen von 1 Gy und 3 Gy und eine deutliche Abnahme nach hohen Dosen von 10 Gy. In HCT116 p21-/- Zellen konnte eine sehr deutliche Zunahme nach allen eingesetzten Dosen detektiert werden (maximal 894 % nach 1 Gy). Auch Schwerionen führten bei dieser Zelllinie zu einer Erhöhung der Phosphorylierung. Dies geschah allerdings erst nach Dosen von 3 Gy und 10 Gy (+ 161 % bzw. + 284 %). Eine geringere Dosis von 1 Gy führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung um 24 %. In U87 zeigten sich deutliche strahlenspezifische Unterschiede. So reduzierten Röntgenstrahlen den Phosphorylierungsstatus um 37 % bis 45 % (1 Gy bis 10 Gy), während ¹²C-Ionen zu einer dosisabhängigen Zunahme der Phosphorylierung um bis zu 44 % (10 Gy) führten.

Die durchgeführten Proteinanalysen nach Bestrahlung zeigten insgesamt zelllinien- und strahlenspezifische Veränderungen in der Expression der untersuchten Proteine. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor dargestellten Migrationsänderungen nach Bestrahlung, die ebenfalls zelllinien- und strahlenspezifisch waren. In wie weit dabei eine beobachteten Änderungen der Migration durch eine ermittelte Änderung der Expression der untersuchten Proteine zu erklären ist, soll im Folgenden Abschnitt geklärt werden.

3.5 Vergleich von Migration und Proteinexpression

Um beurteilen zu können, in wie weit die beobachteten Änderungen der Proteinexpression die gemessenen Änderungen der Migration erklären könnten, wurden die jeweiligen zelllinienspezifischen Parameter vergleichend aufgetragen. Dabei wurden nur Migrations- und Proteinexpressionsänderungen 24 Stunden nach Bestrahlung berücksichtigt, da sich zu diesem Zeitpunkt die signifikanteren Migrationsbeeinflussungen zeigten. Dementsprechend sind in den folgenden Diagrammen die relativen, prozentualen Migrationsänderungen (schwarz) und die relativen, prozentualen Expressionsänderungen (blau) als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) mit zwei y-Achsen gegen die verwendete Dosis aufgetragen.

In Abbildung 37 sind für die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 (A, B) und HCT116 p21^{-/-} (C, D) die Änderungen der Migration 24 Stunden nach Bestrahlung den Änderungen der β_1 Integrinexpression gegenübergestellt.

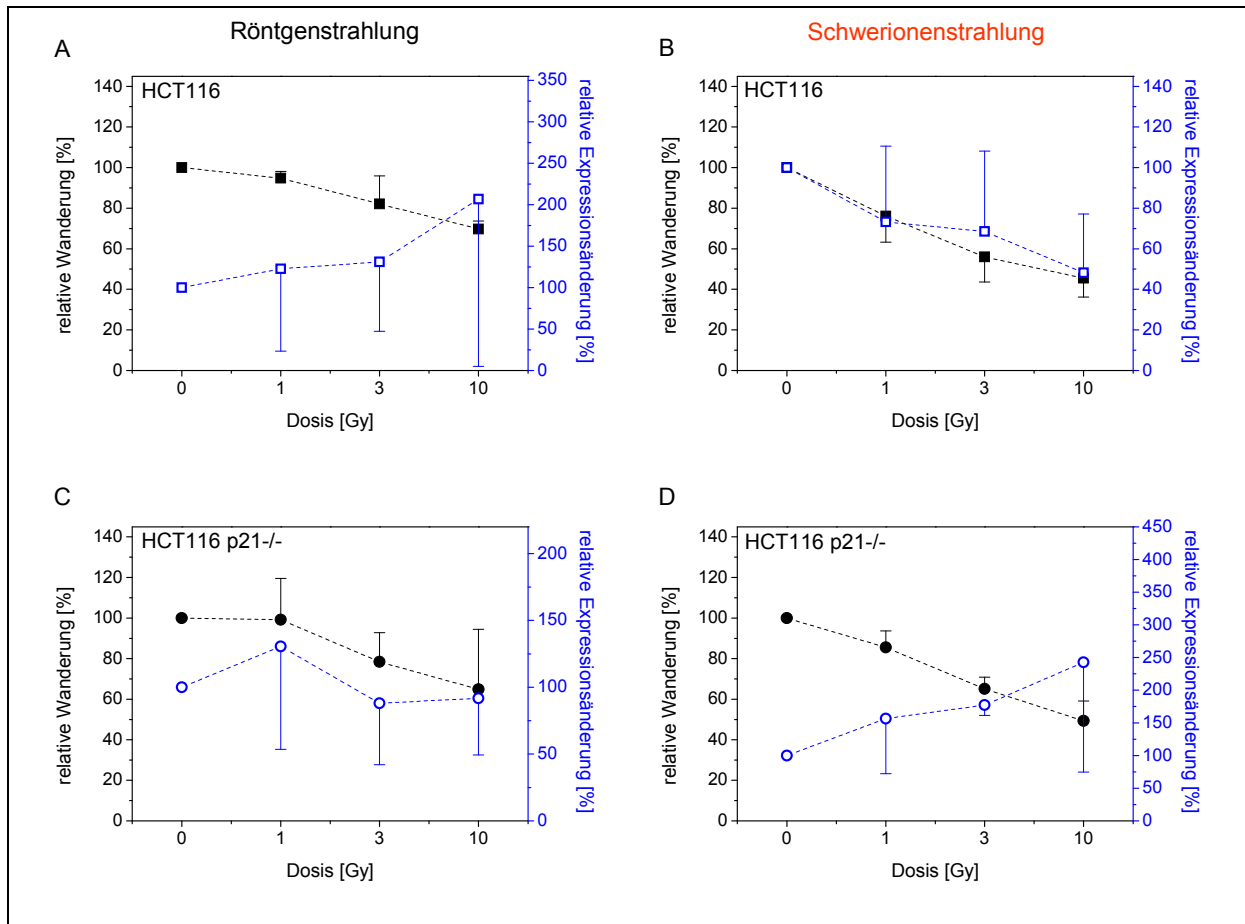


Abbildung 37: Vergleich der Migrations- und β_1 Integrinexpressionsänderungen 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative, prozentuale Änderungen der Migration (schwarz) und β_1 Integrinexpression (blau) in HCT116 (A, B) und HCT116 p21^{-/-} (C, D) Zellen 24 Stunden nach Röntgen- (A, C) und Schwerionenbestrahlung (B, D). Aufgetragen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter gegen die Dosis in Gy.

Es wurde ersichtlich, dass sich durch die beobachteten Unterschiede in der Expression des β_1 Integrins 24 Stunden nach Bestrahlung die Änderungen in der Migration nach Bestrahlung nicht erklären ließen. Während HCT116 Zellen nach beiden Strahlenarten mit einer Abnahme der Zellwanderung reagierten, führte eine Röntgenbestrahlung (Abbildung 37 A) zu einer gegenläufigen Änderung der Proteinexpression, wo hingegen Schwerionen (Abbildung 37 B) eine zur Migration nahezu parallele Veränderung induzierten. Auch HCT116 p21^{-/-} Zellen zeigten nach beiden Arten der Bestrahlung eine Reduktion des Migrationspotentials, aber strahlenspezifische Änderungen der β_1 Integrinexpression. Dabei wurden nach Röntgenbestrahlung (Abbildung 37 C) nur geringe Veränderungen beobachtet, während nach Behandlung mit Schwerionen (Abbildung 37 D) eine deutliche Zunahme der Expression gemessen wurde, die umgekehrt zu der strahleninduzierten Migrationsänderungen verlief.

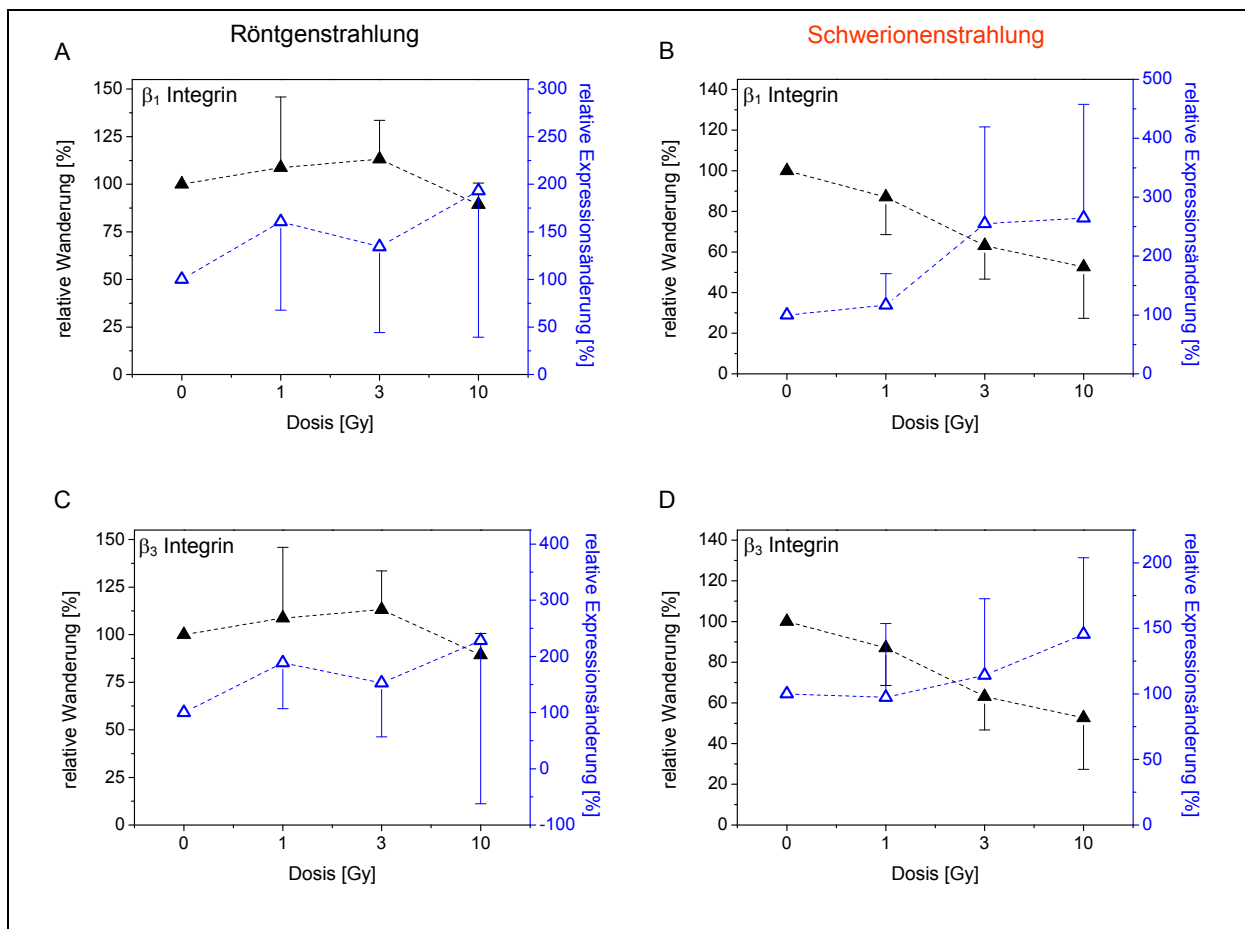


Abbildung 38: Vergleich der Migrations- und β_1 bzw. β_3 Integrinexpressionsänderungen in U87 Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative, prozentuale Änderungen der Migration (schwarz) und β_1 (A, B) bzw. β_3 (C, D) Integrinexpression (blau) in U87 Zellen 24 Stunden nach Röntgen- (A, C) und Schwerionenbestrahlung (B, D). Aufgetragen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter gegen die Dosis in Gy.

Abbildung 38 zeigt den Vergleich der Migration und Integrinexpression 24 Stunden nach Bestrahlung für die Zelllinie U87. Dabei wurden in A und B die Änderung der β_1 Integrine und in

C und D die der β_3 Integrine gegen die verwendete Dosis aufgetragen. Auch hier ließ sich die durch Strahlung beeinflusste Migration nicht durch die Änderungen der Integrinexpression erklären. So zeigten U87 Zellen nach beiden eingesetzten Strahlenarten eine Erhöhung des β_1 Integringehalts, allerdings wurden eher gleichsinnige Veränderungen in der Migration nach Röntgenbestrahlung (Abbildung 38 A) und deutlich gegenläufige Veränderungen nach Behandlung mit Schwerionen beobachtet (Abbildung 38 B). Ein ähnliches Bild zeigte sich für den Vergleich der Migration mit der Beeinflussung der β_3 Integrinexpression. Auch hier wurde nach Röntgenbestrahlung (Abbildung 38 C) eine eher gleichläufige und nach Behandlung mit einem ^{12}C -Ionenstrahl (Abbildung 38) eine gegenläufigen Veränderung der beiden untersuchten Parameter deutlich.

Die Expression der untersuchten Integrine β_1 und β_3 erklärte demnach nicht die beobachteten zelllinienspezifischen Unterschiede in der Migration.

Ein entsprechender Vergleich der Änderungen der Proteinkinase Akt und der Migration sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Auch hier wurden nur die Änderungen 24 Stunden nach Bestrahlung betrachtet und als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aufgetragen.

Abbildung 39 zeigt den Vergleich der veränderten Migrationspotentiale mit der beeinflussten Akt1-Expression in den untersuchten Zelllinien. Für HCT116 Zellen (Abbildung 39 A und B), die nach beiden Arten der Bestrahlung eine Reduktion der Migration zeigten, entsprachen die gemessenen Änderungen in der Akt1-Expression nach Röntgenbestrahlung einem eher entgegengesetzten Verlauf, während sich nach Schwerionenbestrahlung eine gleichsinnige Änderung zeigte. Eine Abnahme der Migration nach beiden Bestrahlungsarten war auch für HCT116 p21^{-/-} Zellen (Abbildung 39 C und D) zu beobachten. Dort nahm allerdings die Akt1-Expression nach Röntgen- und Schwerionenstrahlung eher zu, was einem gegenläufigen Trend zur Zellwanderung entsprach. U87 Zellen (Abbildung 39 E und F) zeigten zwar unterschiedliche Tendenzen in der Migration 24 Stunden nach Bestrahlung, aber gleiche Veränderungen der Akt1-Expression. So verhielten sich die untersuchten Parameter nach Röntgenbestrahlung eher gleichsinnig, während nach Behandlung mit ^{12}C -Ionen ein entgegengesetzter Verlauf zu beobachten war.

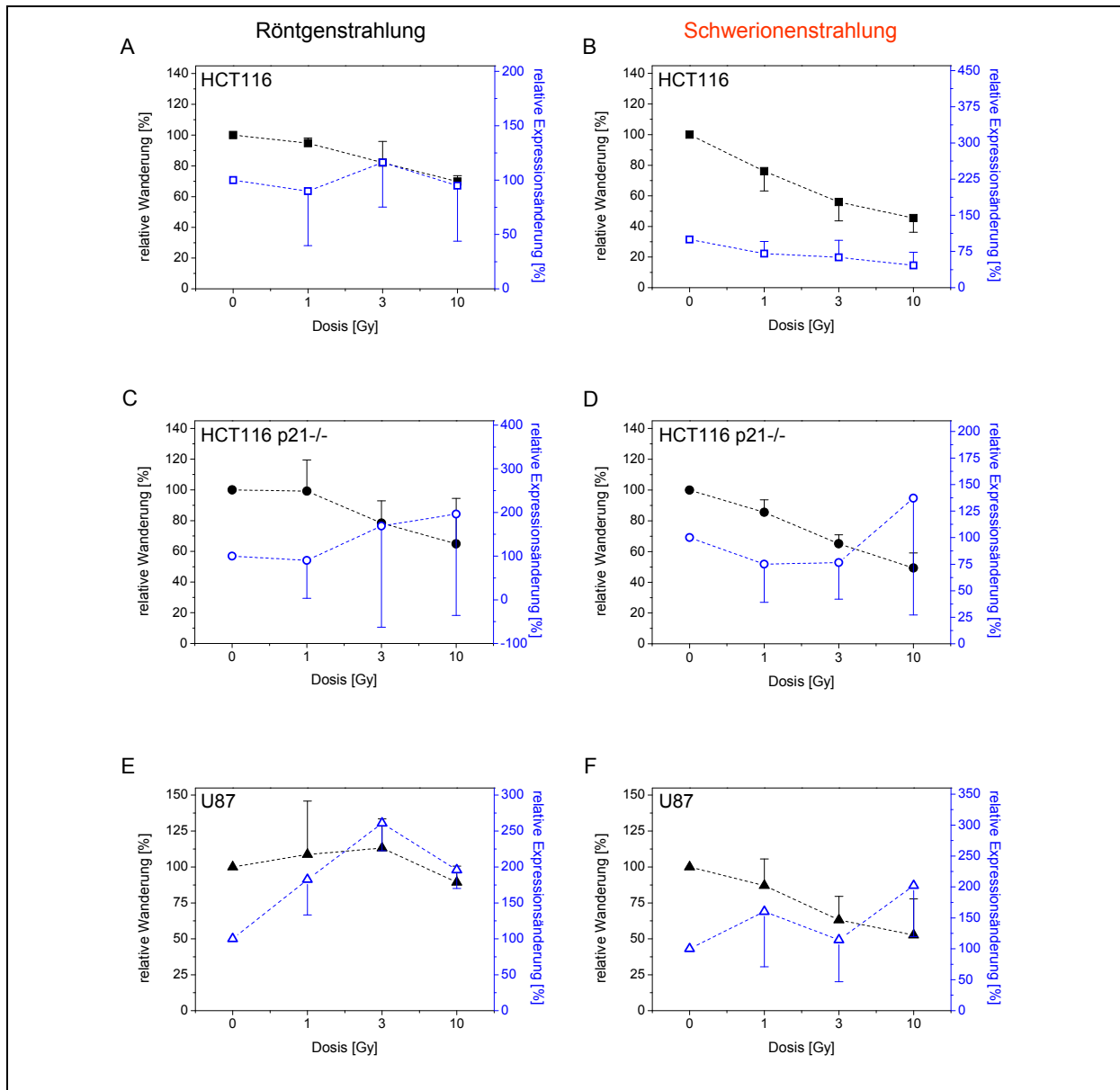


Abbildung 39: Vergleich der Migrations- und Expressionsänderungen von Akt1 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative prozentuale Veränderungen des Migrationspotentials (schwarz) und der Akt1-Expression (blau) in den Zelllinien HCT116 (A, B), HCT116 p21^{-/-} (C, D) und U87 (E, F) 24 Stunden nach Röntgen- (A, C, E) bzw. Schwerionenbestrahlung (B, D, F). Aufgetragen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter gegen die Dosis in Gy.

Abbildung 40 stellt die Migrations- und Akt2-Expressionsänderungen der untersuchten Zelllinien 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit Röntgen- bzw. Schwerionenstrahlung gegenüber. Dabei zeigten sich für HCT116 Zellen (Abbildung 40 A und B) nach beiden Strahlenarten gegensinnige Verläufe der beiden Parameter. Während die Zellwanderung abnahm, nahm die Expression des Proteins Akt2 in beiden Fällen zu. Die Untersuchung von HCT116 p21^{-/-} Zellen (Abbildung 40 C und D) führte zu einem anderen Bild. Hier verhielten sich die Migration und die Akt2-Expression nach Behandlung der Zellen mit Röntgen- oder Schwerionenstrahlung eher gleichsinnig. So reduzierte sich sowohl das Potential zur Zellwanderung, als auch der Proteingehalt von Akt2. Für U87 Zellen (Abbildung 40 E und F)

stellte sich nach beiden Bestrahlungsarten ein gegensinniger Verlauf der Parameter dar. Während die Migration nach Röntgenstrahlen bei kleinen Dosen zunahm, sank die Akt2-Expression und nahm, entgegen dem Migrationspotential, nach einer hohen Dosen von 10 Gy zu. Nach Schwerionenbestrahlung zeigten sich eine Abnahme der Zellwanderung und eine ihr entgegen gesetzte Zunahme der Expression von Akt2.

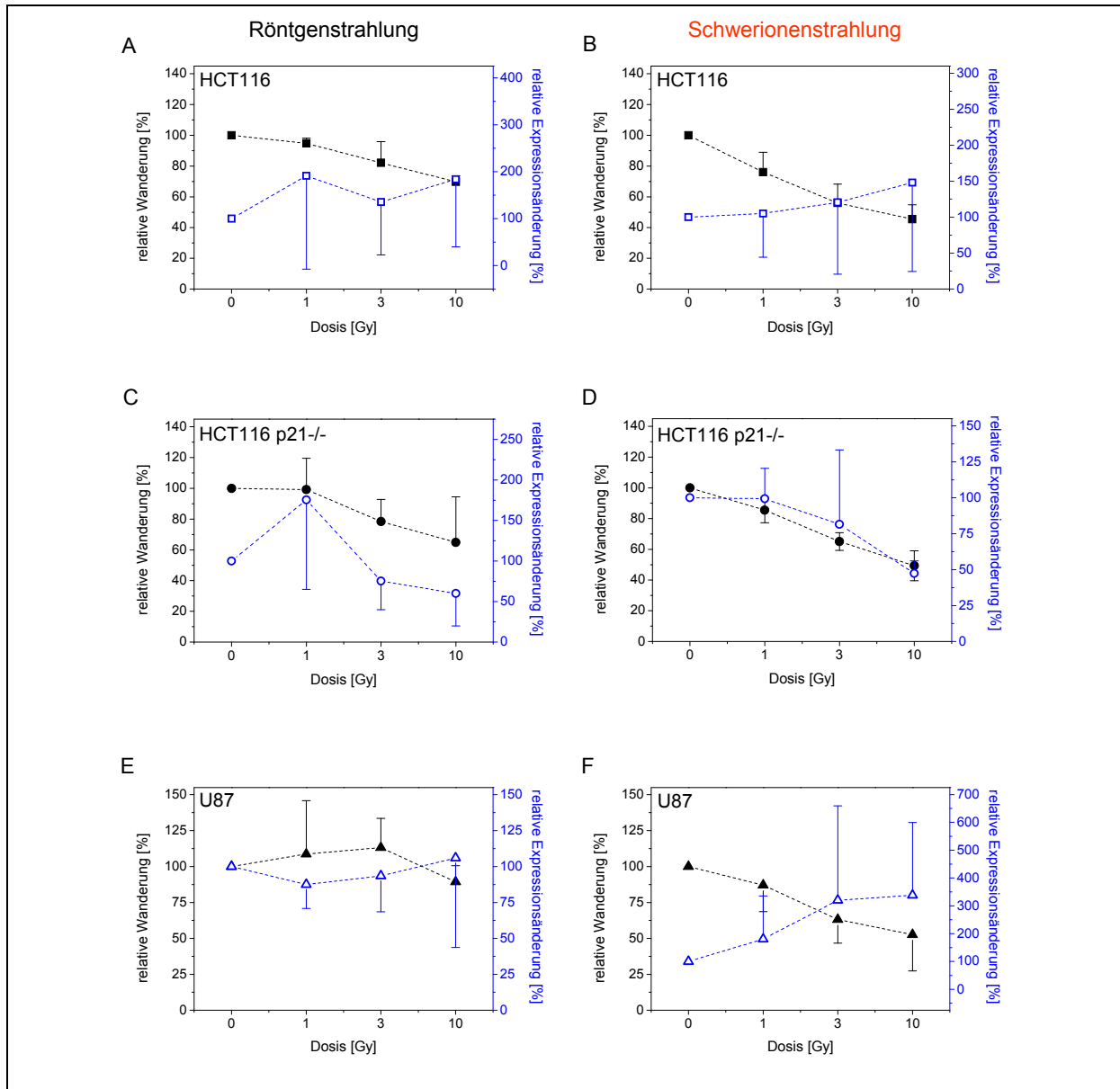


Abbildung 40: Vergleich der Migrations- und Akt2-Expressionsänderungen 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative prozentuale Veränderungen des Migrationspotentials (schwarz) und der Akt2-Expression (blau) in den Zelllinien HCT116 (A, B), HCT116 p21^{-/-} (C, D) und U87 (E, F) 24 Stunden nach Röntgen- (A, C, E) und Schwerionenbestrahlung (B, D, F). Aufgetragen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter gegen die Dosis in Gy.

In Abbildung 41 sind die Vergleiche der Zellmigration und der Phosphorylierung der Proteinkinase Akt 24 Stunden nach Bestrahlung dargestellt. Dort zeigte sich für die Zelllinie HCT116 (Abbildung 41 A und B) ein eher gegenläufiger Trend der untersuchten Parameter. Während

die Zellwanderung nach Bestrahlung abnahm, war für die Phosphorylierung eine zunehmende Tendenz zu beobachten. Ähnliches galt für HCT116 p21^{-/-} Zellen (Abbildung 41 C und D). Auch hier nahm die Zellwanderung nach beiden Arten der Bestrahlung ab, während die Phosphorylierung deutlich zunahm. Dagegen zeigten U87 Zellen (Abbildung 41 E und F) unterschiedliche Verläufe der untersuchten Parameter. Hier nahm die Zellmigration nach Röntgenstrahlung tendenziell zu, während die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt deutlich abnahm. Nach Bestrahlung mit Schwerionen hingegen zeigten die Zellen eine deutliche Abnahme des Migrationspotentials, während sich der Anteil des phosphorylierten Akts eindeutig erhöhte.

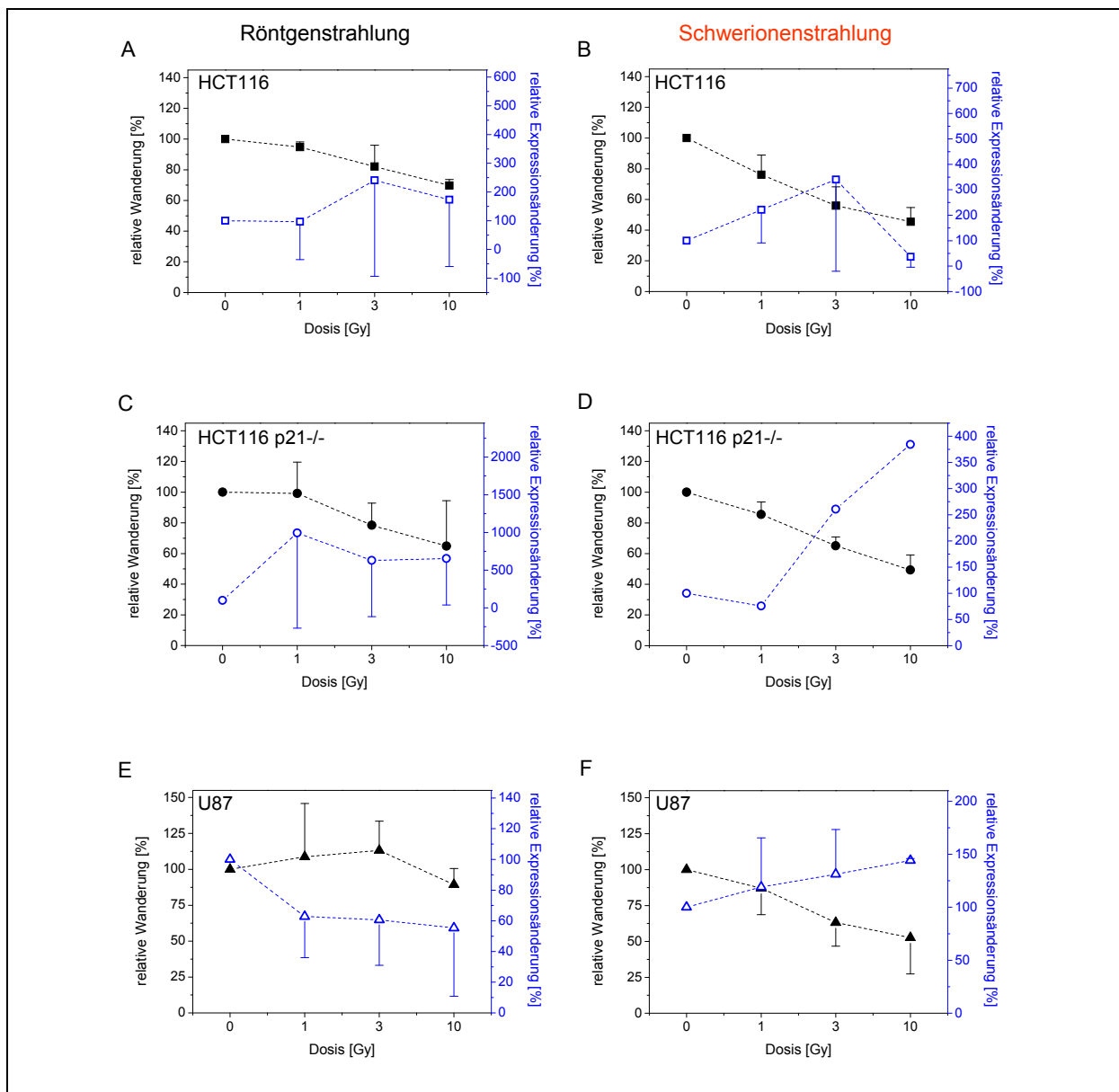


Abbildung 41: Vergleich der Migrationsänderungen und der Akt-Phosphorylierung 24 Stunden nach Bestrahlung.

Gezeigt sind relative Veränderungen des Migrationspotentials (schwarz) und der Akt-Phosphorylierung (blau) in den Zelllinien HCT116 (A, B), HCT116 p21^{-/-} (C, D) und U87 (E, F) 24 Stunden nach Röntgen- (A, C, E) bzw. Schwerionenbestrahlung (B, D, F). Aufgetragen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter gegen die Dosis in Gy.

Aus den hier gezeigten Vergleichen ging hervor, dass es nur bedingte Übereinstimmungen zwischen einer veränderten Migration und einer parallel dazu beeinflussten Proteinexpression gab. Dies schien sich für alle hier untersuchten Proteine zu bestätigen.

Gezeigt werden konnte, dass sich das Potential zur Migration von Tumorzellen durch Bestrahlung beeinflussen lässt. Diese Veränderung trat in signifikanter Weise erst 24 Stunden nach der Behandlung mit Strahlen auf und war dann sowohl zelllinien- als auch strahlenspezifisch. Ein direkter Zusammenhang zwischen den beobachteten Migrationsänderungen und der Expression von β_1 und β_3 Integrinen, sowie der Proteinkinase Akt1 und Akt2 und deren Phosphorylierung konnte nicht gefunden werden. Auch hier ergaben sich sehr deutliche zelllinien- und strahlenspezifische Unterschiede, die keinen allgemeingültigen Trend erkennen ließen.

4 Diskussion

Die Metastasierung von Tumoren stellt ein großes Risiko für eine erfolgreiche Heilung einer Krebserkrankung dar. Auf Grund immer besserer Möglichkeiten Primärtumoren zu heilen, rückt die Bildung von Metastasen weiter in den Vordergrund und die Frage nach einer Induktion einer Metastasierung durch die angewendeten Therapien kommt auf. Für eine konventionelle Behandlung mit Röntgenstrahlung ist diesbezüglich schon einiges bekannt, während für eine ^{12}C -Schwerionentherapie kaum Daten vorliegen.

Da die Metastasierung stark an die Tumorzellmigration geknüpft ist, sollte sich die vorliegende Arbeit mit der Auswirkung einer Röntgen- bzw. Schwerionenbestrahlung auf das Migrationsverhalten verschiedener Tumorzelllinien beschäftigen. Dafür wurde die Migration der Tumorzellen direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung in Boydenkammern untersucht und die Expression verschiedener migrationsrelevanter Proteine ermittelt. Im Folgenden soll zum einen die Durchführung der Experimente bewertet und zum anderen die erhaltenen Ergebnisse in Bezug zu Literaturdaten gesetzt werden. Außerdem wird ein Ausblick auf mögliche Konsequenzen für die Radiotherapie gegeben.

4.1 Charakterisierung der Zelllinien

Zu Beginn der Arbeit wurde das Wachstumsverhalten der verwendeten Zelllinien charakterisiert. Die kolorektalen Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} verhielten sich in ihrem Wachstum ähnlich, was sich unter anderem in ähnliche Verdopplungszeiten von 22,5 h und 22,1 h zeigte. Auch unter mikroskopischen Beobachtungen ergab sich im Wachstum der beiden Zelllinien kein Unterschied. Dies wurde auch schon bei der Etablierung der defizienten Linie beschreiben (Waldman et al., 1995). Brattain et al. (1981) konnten eine Verdopplungszeit der HCT116 Zellen von 21,2 h – 24,2 h bestimmen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den hier ermittelten Daten. Die für die Glioblastomzelllinie U87 ermittelte Verdopplungszeit von 25,5 h ist etwas länger als die der beiden anderen Linien, passt aber ebenfalls zu Daten aus der Literatur. So konnte von anderen Arbeitsgruppen Verdopplungszeiten von 26 h (Guha et al., 2000a) bzw. 27,5 h (Fellner et al., 2002) bestimmt werden. Aber auch Werte von 37 h oder mehr wurden schon gemessen (Denoyer et al., 2005). Diese Diskrepanzen könnten sich durch eine andere Medienzusammensetzung oder durch Veränderungen während des Passagierens der Zellen erklären.

Ebenfalls untersucht wurde das Überleben der Zellen nach Bestrahlung. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente hatten den Vergleich des Strahleneinflusses von Röntgen- und Schwerionenstrahlung zum Ziel. Dafür wurden die Zellen zum einen einer 250 keV Röntgenstrahlung oder zum anderen einem auf 1 cm ausgedehnten Bragg-Peak eines ^{12}C -Ionenstrahls (270MeV/u) ausgesetzt. Zur Bestimmung des Zellüberlebens nach

Bestrahlung kamen zwei Methoden zum Einsatz. HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen wurden sowohl in einem Koloniebildungstest als auch in einem kommerziell erhältlichen XTT-Test eingesetzt. Während der Koloniebildungstest ein Standardverfahren zur Bestimmung des klonogenen Überlebens von Zellen ist (Hall und Giaccia, 2005), wurde der photometrische XTT-Test durchgeführt, um das Überleben als metabolische Aktivität von U87 Zellen zu bestimmen, die hier keine Kolonien bildeten. Für diesen Test gibt es in der Literatur allerdings nur wenige Daten (Hovinga et al., 2005). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte zum gleichen Zeitpunkt nach Bestrahlung zu dem auch das klonogene Überleben ermittelt wurde. Die Messung beruhte auf der Annahme, dass zu diesem Zeitpunkt nur noch die Zellen Vitalität zeigten, die auch in einem Koloniebildungstest überlebt und eine Kolonie gebildet hätten. Ein Vergleich der erhaltenen Werte für die kolorektalen Zellen, zeigte eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Methoden im Bereich kleiner Dosen. Einzig nach 1 Gy und 3 Gy Schwerionenbestrahlung von HCT116 Zellen wurden Unterschiede zwischen beiden Testverfahren deutlich. Nahm allerdings die Anzahl überlebender/vitaler Zellen unter 10 % im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen ab, so waren die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden nicht mehr mit einander vergleichbar (Tabelle 17).

Tabelle 17: Daten des Zellüberlebens aus Koloniebildungstest (PE) und Zellvitalitätstest (XTT). Nach Bestrahlung der Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} mit 0 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy Röntgen- (Rö, 250 keV) oder Schwerionenstrahlung (SIS, 270 MeV/u), wurden die Zellen ausgesät und das Zellüberleben sechs Tage später bestimmt. Dazu wurde das klonogene Überleben ermittelt und die Zellvitalität mit einem kommerziellen XTT-Test photometrisch gemessen. Gezeigt sind relative, prozentuale Veränderungen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen.

	HCT116				HCT116 p21 ^{-/-}				U87	
	Röntgen		Schwerionen		Röntgen		Schwerionen		Rö	SIS
Gy	PE	XTT	PE	XTT	PE	XTT	PE	XTT	XTT	XTT
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	71,5	77,5	26,6	47,5	75,9	78,5	49	36,5	90,3	56,8
3	34,8	36	3,2	11,4	32,8	31,7	9,3	9,8	71,5	34,7
10	2,1	10,4	0,7	9,2	1,4	11,8	1,5	7,9	52,0	38,9

Dies ließ auf eine mangelnde Sensitivität des XTT-Tests schließen, welcher ab einer zu geringen Farbtintensität Unterschiede nicht mehr detektieren konnte. Für die hier verwendeten kleineren Dosen von 1 Gy und 3 Gy ließen die mit diesem Test erhaltenen Werte, aber durchaus eine Aussage über das Überleben der Zellen nach Bestrahlung zu, wie sie mittels klonogenem Überleben auch erhalten worden wäre.

Die ermittelten Daten zeigten anhand der Kurvenverläufe eine deutlich höhere Strahlenresistenz von U87 Zellen im Vergleich zu HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen. Dies war für beide untersuchten Strahlenarten der Fall. Wurde z.B. das zelluläre Überleben nach 3 Gy der drei

Zelllinien verglichen, so war zu erkennen, dass nach Röntgenbestrahlung etwa 30 – 35 % der kolorektalen Zelllinien noch überlebensfähig waren, während noch mehr als 70 % U87 Zellen überlebten. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind auch in Literaturdaten zu finden. So konnten für HCT116 Zellen nach konventioneller Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy ein prozentualer Anteil überlebender Zellen von etwa 40 % ($SF_2 \sim 0,4$) in verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt werden (Chendil et al., 2000; Flatmark et al., 2006). Für U87 werden in der Literatur Anteile überlebender Zellen von etwa 80 % nach einer Bestrahlung mit 2 Gy angegeben (Delmas et al., 2002; Zhang et al., 1996). Auch gegenüber Schwerionenstrahlung waren U87 Zellen im Vergleich zu HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen wesentlich resistenter. Dort überlebten nach einer Dosis von 3 Gy noch etwa 35 % U87 Zellen und nur etwa 10 % der Kolonkarzinomzellen. Der Anteil überlebender Zellen dieser Zelllinien nach einer Dosis von 2 Gy Schwerionen ist bislang nicht bekannt.

Ebenfalls auffällig waren die nur sehr geringen Unterschiede im Zellüberleben der beiden Kolonkarzinomzelllinien nach Röntgenbestrahlung. Dort konnten bei beiden Zelllinien nach einer Dosis von 3 Gy etwa 30 % klonogene Zellen ermittelt werden. Die p21-Defizienz der HCT116 p21^{-/-} Zellen scheint dabei keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zelllinie zu haben. Dies wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen festgestellt. So wurde 1997 in der Arbeitsgruppe um Wouters gezeigt, dass sich beide Zelllinie zwar in der Größe der apoptotischen Fraktion unterschieden, nicht aber in ihrem klonogenen Überleben (Wouters et al., 1997). Es ist bekannt, dass p21-defiziente Zellen nicht mehr in der Lage sind im Zellzyklus in der G1-Phase zu arretieren. Dort würden normalerweise entstandene DNA-Schäden vor Durchlaufen der S-Phase oder der Mitose repariert, oder aber die Apoptose der Zelle wird eingeleitet. Waldman et al. konnte zudem feststellen, dass in diesen Zellen die Synthesephase und die Mitose des Zellzyklus entkoppelt sind. Obwohl in diesen Zellen zum Teil keine Mitose stattfindet, wird die DNA weiter vermehrt. Dies führt zu stark erhöhten Chromosomensätzen und später zum Absterben der Zellen (Waldman et al., 1995). Dies erklärt die Tatsache, dass der Anteil überlebender Zellen in etwa gleich ist, obwohl HCT116 p21^{-/-} nicht durch einen G1-Arrest in die Apoptose gelangen. Die Zellen, in denen der DNA-Schaden nicht repariert werden kann, sterben im Gegensatz zur parentalen Zelllinie nicht durch Apoptose, sondern durch eine viel zu große Chromosomenzahl (Polyploidie).

Nach einer Behandlung der Zellen mit Schwerionen wurden allerdings Unterschiede sichtbar. So waren im Vergleich zu unbestrahlten Zellen nach 3 Gy ¹²C-Strahlung noch 3,2 % der HCT116 Zellen in der Lage Kolonien zu bilden, während 9,3 % HCT116 p21^{-/-} Zellen nach derselben Dosis noch Kolonie bildend waren. Die Tatsache, dass p21-defiziente Zellen nach Schwerionenbestrahlung eine größere Strahlenresistenz zeigen als Wild-Typ Zellen, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es lässt sich aber spekulieren, dass auch dies durch

eine fehlende Apoptoseinduktion erklärt werden könnte. Parentale HCT116 Zellen werden während des Zellzyklus in der G1-Phase arretiert und zum Großteil in die Apoptose überführt, da vermutlich die Mehrzahl der durch ^{12}C -Ionen induzierten Doppelstrangbrüche nicht korrekt repariert werden kann. Dies wird in p21-defizienten Zellen nicht passieren. Hier wird der Zellzyklus vollständig durchlaufen, wobei zusätzlich DNA-Schäden entstehen würden. Diese würden aufgrund der fehlenden Checkpoint Signale die Zellen aber nicht von weiteren Zellteilungen abhalten. Zur weiteren Klärung müsste das Aussehen der Chromosomensätze untersucht werden.

4.2 Migrationsversuche mit der Boydenkammer

Die Anzahl an Methoden zur Untersuchung der Zellmigration ist sehr groß. So kann diese sowohl in 2D- oder 3D-Versuchsaufbauten bestimmt werden, welche sich zudem in ihrer Aufwendigkeit und Annäherung an die *in vivo* Situation unterscheiden (Entschladen et al., 2005). Hier wurde die Tumorzellwanderung in sogenannten „Boydenkammern“ untersucht. Diese gehören zu einer Vielzahl von methodischen Ansätzen, die die Zellmigration durch den Durchtritt von Zellen durch einen Filter oder eine Membran beobachten. Ein großer Vorteil dieses Versuchsaufbaus ist die Möglichkeit, eine große Probenanzahl oder aber Mehrfachbestimmungen einer Probe unter identischen Bedingungen zu untersuchen. Dadurch erfolgt eine sehr gute statistische Absicherung der Ergebnisse, welche in anderen Versuchsaufbauten zum Teil nicht geleistet werden kann. Durch eine gute Standardisierung des Migrationsassays kann zudem eine hohe Vergleichbarkeit der Versuche erreicht werden. Nachteil eines solchen 2D-Ansatzes ist die Tatsache, dass die *in vivo* Situation nur bedingt wiedergegeben werden kann. Eine Einbettung der Zellen z.B. in eine Kollagenmatrix, wie sie in 3D-Versuchsansätzen durchgeführt wird, nähert sich diesen Bedingungen wesentlich besser an. Doch ist hier der Aufbau wesentlich komplexer und daher nicht geeignet, allgemeine Migrationsänderungen zu untersuchen. 3D-Ansätze eignen sich somit eher zur Untersuchung des Ablaufs des Migrationsprozesses (Entschladen et al., 2005). In der hier gewählten experimentellen Anordnung wurde versucht, durch Beschichtung des Filters eine *in vivo* nähere Situation zu simulieren. Das dafür verwendete Kollagen ist Teil der extrazellulären Matrix und steht den Zellen daher auch *in vivo* zur Verfügung. Der hier gewählte Versuchsaufbau ermöglichte nicht nur die Untersuchung der Tumorzellmigration, sondern setzte voraus, dass die ausgezählten Zellen die Barriere aus Kollagen durch Proteolyse durchdrungen haben. Der ermittelte Anteil wandernder Zellen ergibt sich somit aus den Zellen, die in der Lage waren sowohl invasiv als auch migratorisch durch die Poren des Filters zu gelangen. Ein weiterer Nachteil des hier gewählten Versuchsaufbaus ist die Tatsache, dass nur Zellen in die Auswertung eingehen, die mittels Migration auf die andere Seite des Filters gelangten. Zellen die während der Versuchsdauer von 16 Stunden nicht durch die Poren, sondern entlang der

Kollagen beschichteten Filterseite migrierten, konnten nicht detektiert werden. Da aber nur Unterschiede in der Migration einer Zelllinie verglichen wurden, sollte dieser Anteil in allen Versuchsansätzen in etwa gleichbleiben und keinen Einfluss auf die relativen Ergebnisse haben.

Um die oben erwähnte gute Vergleichbarkeit der Boydenkammerversuche zu gewährleisten bestand die erste Aufgabe in der zelllinienspezifischen Standardisierung und Optimierung des Versuchsaufbaus. Dazu gehörte die Bestimmung des Einflusses der Filterbeschichtung auf die Migration, die sich daraus ergebende Standardisierung der Beschichtung für die einzelnen Zelllinien, sowie die Bestimmung einer optimalen Zellzahl für die vor Versuchsbeginn ausgesäten Zellen. Für die verwendete computergestützte Auswertung war ein prozentualer Anteil migrierender Zellen von etwa 15 % optimal. Dies ermöglichte die Detektion von Zu- oder Abnahmen der Zellwanderung. Daher war das Ziel der Optimierung eine Zellmigration in diesem Prozentbereich unter Kontrollbedingungen zu erreichen. Für U87 Zellen wurde dies nicht durchgeführt. Diese Zelllinie zeigte mit den zu Beginn eingesetzten Zellzahlen, Aussaat: 1×10^4 Zellen/cm² drei Tage vor Versuchsbeginn und Einsaat: $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in die Boydenkammer, mit einem Anteil migrierender Zellen von knapp 20 % die gewünschte Zellwanderung. Eine systematische Untersuchung der optimalen Zellzahlen vor Versuchsbeginn erfolgte für die Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-}. Dabei ergab sich für beiden Zelllinien eine optimale Aussaat von 4×10^4 Zellen/cm² zwei Tage vor Versuchsbeginn. Diese Zellzahlen ergaben eine relative Migrationsrate von etwa 15 % im Bezug auf die in die Boydenkammer eingesäte Zellzahl.

Genau wie die Aussaat der Zellen vor Versuchsbeginn schien die Beschichtung der Filter einen entscheidenden Einfluss auf das Migrationspotential der Zellen zu haben. Zur Bestimmung der „richtigen“ Filterbeschichtung wurden die Zellen mit der zuvor bestimmten Zelldichte ausgesät und in die Boydenkammer eingesetzt. Dabei wurden parallel verschiedene Beschichtungen getestet. Es zeigten sich zelllinienspezifische Unterschiede in der Migration. So wanderten HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen besonders gut nach Beschichtung der Filter mit Rattenkollagen I. Eine Behandlung der Filter mit humanem Kollagen IV, EtOH/HCl und unbeschichtete Filter führten zu ähnlichen Anteilen wandernder Zellen. Diese waren allerdings geringer als nach Kollagen I-Beschichtung. U87 Zellen zeigten nach allen vier untersuchten Beschichtungen einen ähnlich hohen Anteil gewanderter Zellen. Schon diese Versuche deuten an, dass die Migration der untersuchten Zelllinien durch unterschiedliche Parameter bestimmt wird. Während U87 nach allen hier untersuchten Behandlungen des Filters gut migrierten, schienen HCT116 Zellen erst nach Bindung an Kollagen I eine gute Invasion bzw. Migration zu zeigen.

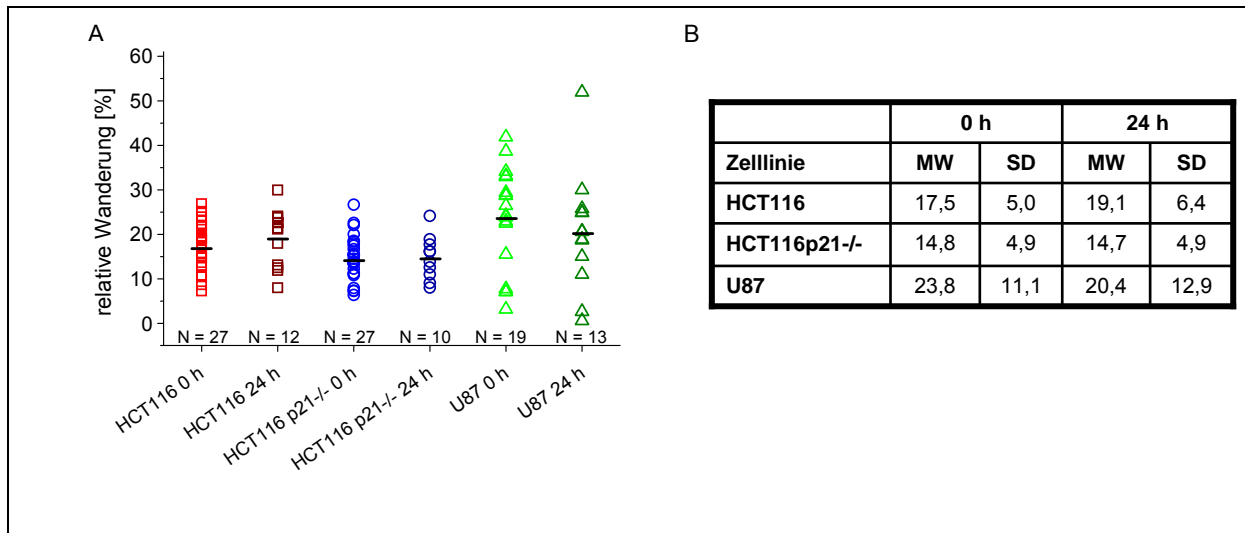


Abbildung 42: Vergleich der Zellwanderung unter Kontrollbedingungen.

Der Anteil gewanderter Zellen aller durchgeführten Boydenkammerversuche wurde zelllinien- und zeitpunktabhängig aufgetragen (A). Der Querbalken zeigt dabei den mittleren Wanderungsanteil. N = Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche. In der Tabelle (B) sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Versuche aufgeführt.

Abbildung 42 zeigt den Anteil wandernder Zellen aller durchgeführten Versuche unter Kontrollbedingungen. Dabei wurden zum einen alle Versuche die dem Zeitpunkt direkt nach Bestrahlung entsprachen und die Experimente die dem Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung entsprachen gruppiert und zusammen aufgetragen. Der in der Graphik gezeigte Querbalken zeigt den Mittelwert der Versuche an. Dieser lag für HCT116 Zellen bei 17,5 % direkt bzw. 19,1 % 24 Stunden nach Bestrahlung und zeigte somit nur geringe Unterschiede in dem mittleren Anteil gewanderter Zellen zu beiden Zeitpunkten. HCT116 p21-/- Zellen wurden Mittelwerte von 14,8 % (0 Stunden) bzw. 14,7 % (24 Stunden) bestimmt, welche somit etwas geringer aber näher beieinander lagen als bei der parentalen Zelllinien. Für U87 ergaben sich mittlere prozentuale Anteile gewanderter Zellen von 23,8 % (0 Stunden) bzw. 20,4 % (24 Stunden). Auch hier zeigten sich kleine Unterschiede in den Anteilen migrierender Zellen. Insgesamt lagen die Werte auch höher als bei beiden kolorektalen Zelllinien. Auffällig war zudem die Tatsache, dass die Messdaten von U87 Zellen wesentlich mehr streuten als für die der kolorektalen Zelllinien HCT116 und HCT116 p21-/-. Schon hier zeigte sich, dass die Standardisierung der Migration von U87 Zellen nicht vollständig möglich war. Die Streuung der Anteile migrierender Gliomzellen fiel mit mehr als 10 % um den Mittelwert deutlich höher aus als bei den untersuchten kolorektalen Zelllinien. Die hier ermittelte Standardabweichung von etwa 5 % zeigt, dass es durchaus möglich ist, die Versuchsanordnung so zu standardisieren, dass die Streuung der Versuche relativ gering ausfällt. Die hohe Streuung der U87 Zellen kann sowohl methodische als auch zelluläre Ursachen haben und ist weiter unten noch einmal ausführlicher diskutiert.

4.3 Migrationsmessungen und Bestrahlung

Alle Bestrahlungsversuche fanden in der GSI in Darmstadt statt. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben ausgesät, und die Zellkulturflaschen am Versuchstag komplett mit Medium gefüllt. Diese wurden dann in einer mit Zellstoff gepolsterten Styroporkiste im Auto nach Darmstadt transportiert. Nach Bestrahlung erfolgten der Rücktransport nach Mainz und die Aufarbeitung der Zellen für verschiedene Versuche. Lagerung und Transport stellten einen zusätzlichen Stress für die Zellen dar, der sich möglicherweise sowohl auf das Überleben als auch auf die Migration der Zellen auswirken kann. Es wurden daher auch immer unbestrahlte Kontrollzellen auf diese Weise behandelt. Da die Auswertung relativ zu dieser Kontrollgruppe durchgeführt wurde, sind die erhaltenen Ergebnisse und Unterschiede zwischen Kontrollen und bestrahlten Zellen allein auf den Einfluss der Bestrahlung zurückzuführen.

Die Zellmigration wird über die Expression und Aktivierung verschiedener Proteine gesteuert. Während die Aktivierung von Proteinen durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung in sehr kurzen Zeiten erfolgt, können Proteinexpressionsänderungen meist erst nach mehreren Stunden detektiert werden. Daher wurde der Bestrahlungseinfluss auf die Migration zu zwei Zeitpunkten, direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung untersucht. Dabei ergaben sich zu den untersuchten Zeitpunkten meist sehr unterschiedliche Ergebnisse.

Direkt nach Röntgenbestrahlung zeigten alle untersuchten Zelllinien eine Abnahme des Migrationspotentials im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Dabei waren die Änderungen nach 1 Gy und 3 Gy bei HCT116 Zellen bzw. bei 3 Gy und 10 Gy bei HCT116 p21^{-/-} Zellen signifikant; die relative Verminderung der Migration war mit 15 % jedoch deutlich geringer als die Abnahme der Migration von U87 Zellen mit bis zu 30 %. Letzteres galt ebenfalls für 1 Gy und 3 Gy. Nach Schwerionenstrahlung zeigten sich für die Kolonkarzinomzellen auch leichte Abnahmen der Migration. Diese waren nach 3 Gy (HCT116) bzw. 1 Gy (HCT116 p21^{-/-}) ebenfalls zum Teil signifikant. Für U87 Zellen hingegen konnten keine Schwerionen-induzierte Änderungen in der Migration ermittelt werden.

In der Literatur sind die hier dargestellten Einflüsse auf die Migration direkt nach Bestrahlung noch nicht beschrieben. Die von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Daten zeigen viel mehr nur Änderungen der Migration 24 Stunden oder sogar erst 48 h nach Bestrahlung. Dabei beschreiben die Literaturdaten vor allem für Gliomzelllinien nach Röntgenstrahlung ähnliche Ergebnisse wie sich auch hier gefunden wurden. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung der HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen mit Röntgenstrahlung 24 Stunden später zu einer dosisabhängige Abnahme des Migrationspotentials führt. Dabei waren Änderung nach 3 Gy (HCT116 und HCT116 p21^{-/-}) und 10 Gy (nur HCT116) signifikant. Hingegen wurde für U87 Zellen eine leichte Zunahme der Migration nach klinisch relevanten Dosen von 1 Gy und 3 Gy 24 Stunden nach Röntgenstrahlung de-

tektiert. Eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen führte im Gegensatz dazu bei allen drei untersuchten Zelllinien zu einer dosisabhängigen, signifikanten Reduktion des Migrationspotentials. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigten dementsprechend auch 24 Stunden nach Bestrahlung zelllinien- und strahlenspezifische Veränderungen in der Tumorzellmigration.

Ein Vergleich der Zellmigration nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung wurde bisher nur von zwei weiteren Arbeitsgruppen veröffentlicht. Takahashi et al. beschreiben für Endothelzellen nach klinisch relevanten Dosen Röntgenstrahlung eine Zunahme und nach ^{12}C -Ionenstrahlung eine Abnahme der Migration (Takahashi et al., 2003). Die zweite bisher veröffentlichte Arbeit, die sich mit der Migration von Zellen nach Schwerionenbestrahlung befasste, stammt von Ogata et al.. Diese Arbeitsgruppe konnte für Sarkomzellen bei einem Vergleich der Migration nach Röntgen- und ^{12}C -Strahlung das gleiche Muster wie Takahashi et al. (2003) feststellen (Ogata et al., 2005).

Die Arbeiten einiger anderer Arbeitsgruppen belegen ebenfalls, dass eine Migrationsinduktion nach Röntgenbestrahlung in verschiedenen Tumorzelllinien möglich ist. Für unterschiedliche Gliomzellen, unter anderem auch U87 Zellen, konnten Arbeiten von W. Wick und C. Wild-Bode zeigen, dass diese nach konventioneller Röntgenbestrahlung signifikant mehr migrieren (Wick et al., 2002; Wild-Bode et al., 2001).

Die Betrachtung der durchgeführten Einzelversuche 24 Stunden nach Bestrahlung zeigten ebenfalls zelllinienspezifische Unterschiede. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Kolonkarzinomzellen traten in den Versuchen mit U87 Zellen nach Röntgenbestrahlung große Unterschiede in den prozentualen Anteilen gewanderter Zellen auf. Dort zeigten sich zwei verschiedene Reaktionsmuster der Zellen infolge der Bestrahlung: Während bei einem Teil der Versuche signifikante Veränderungen beobachtet wurden, konnte bei dem anderen Teil der Experimente keinerlei Änderungen gemessen werden. Auffallend war, dass die Versuche bei denen eine signifikante Veränderung im Migrationspotential gezeigt werden konnte, die unbestrahlten Kontrollzellen einen prozentualen Anteil gewanderter Zellen von etwa 20 % oder weniger zeigten. Bei Durchgängen bei denen 25 % oder mehr Kontrollzellen migrierten, konnten hingegen keinerlei signifikante Veränderungen mehr beobachtet werden. Dies könnte auf eine Vorstimulation der Zellen hinweisen, die durch äußere Einflüsse von vornherein ein sehr hohes migratorisches Anfangspotential besaßen. Worauf diese Vorstimulation zurückzuführen war, ließ sich nicht klären. Ein möglicher Ansatz könnte im Transport und in der Dauer der Bestrahlung liegen, die abhängig von der Zahl der zu bestrahlenden Zellen variierten. Allerdings wurden auch in Experimenten in denen keine Bestrahlung stattfand (und daher auch kein Transport der Zellen) beobachtet, dass U87 Zellen zum Teil einen sehr hohen migratorischen Anteil zeigten. Zudem zeigten U87 Zellen nach Schwerionenbestrahlung nur leichter Schwankungen im Migrationsanteil unbestrahlter Zellen, was ebenfalls gegen die

Beeinflussung der Migration durch den Transport spricht. Daher ist zu vermuten, dass es eher ein zelllinienspezifisches Problem bei der Kultivierung der Zellen ist. So war es nicht möglich trotz Standardisierung der Aussaat vor Versuchsbeginn und der Einsaat in die Boydenkammer eine einheitliche Migration der Zellen zu gewährleisten. Für die verwendeten Kolonkarzinomzellen konnten ebenfalls Schwankungen im Anteil wandernder Kontrollzellen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich hier in fast allen Versuchen die Tendenz der Migrationsänderungen durch Bestrahlung, die auch nach Mittelwertbildung zelllinienspezifisch festgestellt wurde. Einzig Versuche, in denen mit einem sehr geringen Anteil wandernder Kontrollzellen begonnen wurde, konnten keinerlei Veränderungen detektiert werden. Dies ist allerdings auf die Empfindlichkeit der Methode zurückzuführen, die eine Unterscheidung von sehr kleinen Veränderungen nicht mehr erfasst.

Die hier gezeigten Änderungen in der Migration der Tumorzellen können nicht nur durch eine Veränderung der Proteinexpression oder Proteinaktivierung zu erklären sein. Vielmehr wäre es auch möglich, dass die durch Bestrahlung induzierten DNA-Schäden in der Zelle zu einem Absterben führen. Es könnte daher sein, dass ein Teil der Zellen während der 16stündigen Inkubation der Boydenkammer durch Apoptose sterben und so nur noch ein geringerer Anteil vitaler Zellen in den Versuch eingehen und noch in der Lage sind zu migrieren. Eine Induktion eines Absterbens der Zellen konnte zum Teil während der Zellzählungen vor Einsaat in die Boydenkammer beobachtet werden. Die dort vor Versuchsbeginn bestimmte Zellzahl schloss allerdings nur vitale Zellen ein, so dass vorausgesetzt werden konnte, dass zum Zeitpunkt der Einsaat in allen Versuchsansätzen der gleiche Anteil vitaler Zellen vorhanden war. Welche Reaktionen die Zellen allerdings während der Inkubationszeit zeigten konnte nicht ohne weiteres vorausgesagt werden. Um diese Frage in Ansätzen zu klären, wurden Zellen mit Röntgenstrahlung behandelt und direkt nach Bestrahlung oder aber 24 Stunden später in einer Boydenkammer-äquivalenten Zelldichte in Dreifachansätzen in 24-Well Platten ausgesät. 16 Stunden später wurde die Zellzahl erneut bestimmt. Diese sollte klären, ob ein erheblicher Anteil Zellen während dieser Zeitspanne abstirbt und das Migrationsergebnis verfälscht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 43 gezeigt. Auch wenn diese auf Grund einer anderen Beschichtung der 24-Well Platten nicht eins zu eins auf die Bedingungen in der Boydenkammer übertragen werden können, können Hinweise über das Zellüberleben gezogen werden. Zudem wurde parallel die Zellvitalität zu denselben Zeitpunkten getestet.

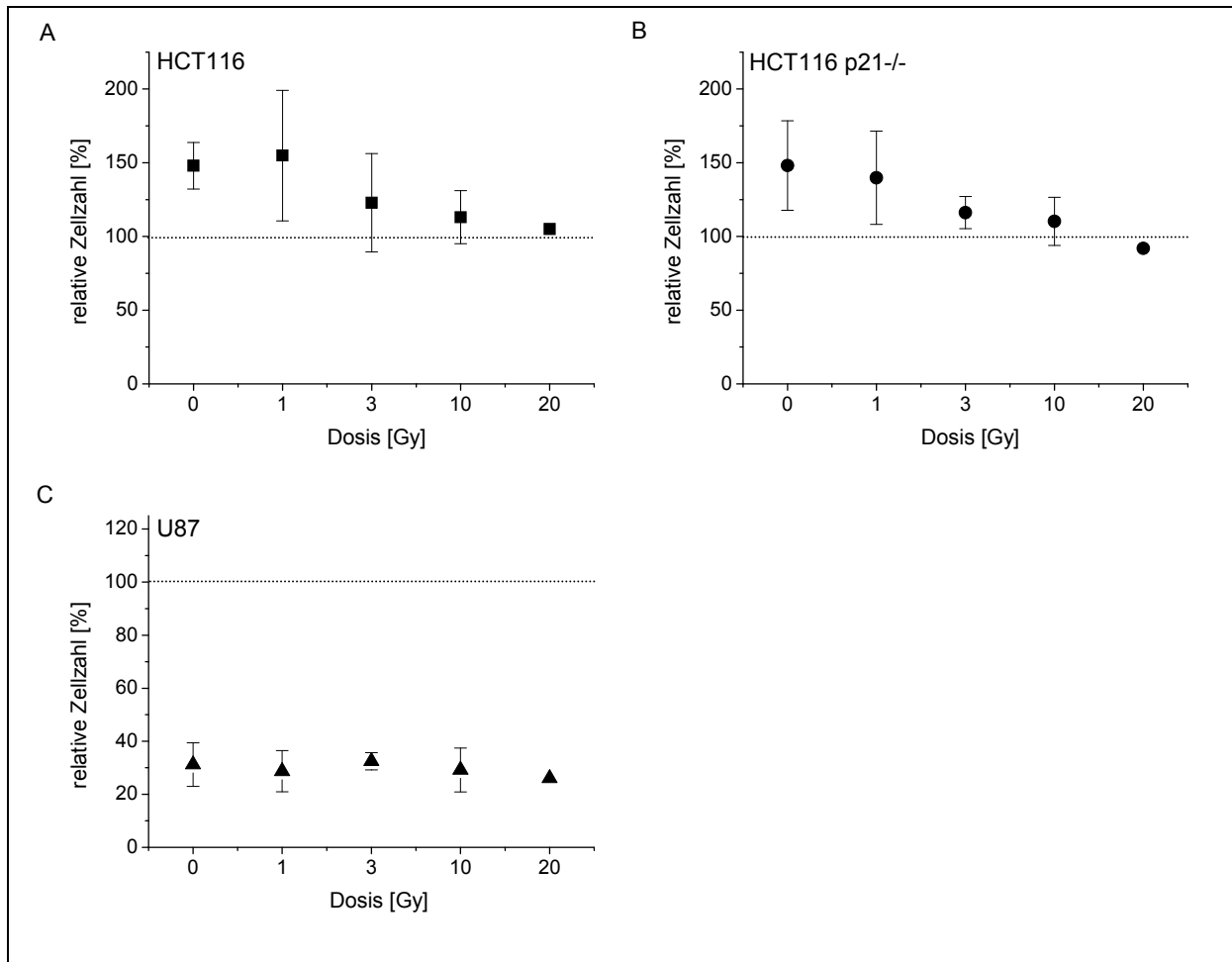


Abbildung 43: Relative Veränderungen der Zellzahl 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung.

Aufgetragen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen relativer Veränderungen der Zellzahlen der Zelllinien HCT116 (A), HCT116 p21^{-/-} (B) und U87 (C) gegen die Dosis in Gy. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung mit einer definierten Zellzahl in 24-Well Platten eingesät, 16 Stunden später abgelöst und erneut gezählt. Die prozentualen Angaben errechneten sich relativ zur eingesäten Zellzahl welche als 100 % gesetzt wurde. Jeder Punkt stellt Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen dar, die jeweils als Dreifachbestimmung gemessen wurden (N = 3; n = 9). Der Messpunkt bei 20 Gy entstammt einer Dreifachbestimmung eines einzelnen Versuchs.

Abbildung 43 zeigt die Veränderungen der Zellzahlen 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung. Dabei wurden die Zellen wie bisher auch mit einer Dosis von 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy bestrahlt. Zudem wurde jeweils eine Probe mit 20 Gy Röntgenstrahlung behandelt. Dies sollte unter Berücksichtigung eines RBW-Werts von etwa zwei für die verwendeten Zelllinien im Ansatz die Wirkung hochenergetischer Schwerionenstrahlung simulieren. Die ebenfalls durchgeführten Zellzählungen direkt nach Bestrahlung sind nicht gezeigt. Dort wurden für die kolorektalen Zelllinien nur sehr geringe Unterschiede in der Zellzahl im Vergleich zur Einsaat bestimmt. Die Zellzahlen für U87 Zellen konnten nicht ermittelt werden, da alle Zellen nach 16 Stunden in Suspension als ein Zellaggregat wuchsen. Für den Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung zeigten sich deutliche zelllinienspezifische Unterschiede in den ermittelten Zellzahlen. Für HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen konnte eine Erhöhung der relativen Zellzahl in fast allen untersuchten Proben festgestellt werden. Allerdings näherten sich diese mit zu-

nehmender Dosis, der eingesäten Zellzahl an. Daraus ließ sich schließen, dass während des Versuchszeitraums von 16 Stunden nur ein unwesentlicher Teil der Zellen absterben und die Berechnung des relativen Anteils nicht durch einen großen Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Bestrahlung mit hohen Dosen nach oben korrigiert werden muss. Wenn eine Korrektur der beobachteten Migrationsänderungen erfolgen muss, dann in unbestrahlten Kontrollen und Proben die mit niedriger Dosis bestrahlt wurden. Hier zeigten sich im Vergleich zur Einsaat höhere Zellzahlen, was auf eine Proliferation der Zellen hinweist. Dies würde den Anteil migrierender Zellen verringern, da theoretisch mehr Zellen in der Lage gewesen wäre zu wandern, als in die Berechnung mit eingegangen sind. Allerdings unterscheiden sich die hier beobachteten Zunahmen der Zellzahlen nicht signifikant ($p < 0,05$; t-test). Daher ist zu vermuten, dass die relativ geringen Änderungen der Zellwanderung nach Röntgenstrahlung vielleicht zum Teil auf einen Proliferationseffekt zurückzuführen sind. Die dosisabhängigen Abnahmen der Migration, die nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen induziert wurden, lassen sich aber nicht nur durch Zellteilung erklären, sondern sollten zum Großteil von einem Strahleneffekt erzeugt worden sein.

Für U87 Zellen sieht die Reaktion deutlich anderes aus. Hier konnten 16 Stunden nach Einsaat der Zellen in 24-Well Platten nur noch 30 % der eingesäten Zellen gezählt werden. Allerdings war dies sowohl in unbestrahlten als auch in mit unterschiedlichen Dosen bestrahlten Ansätzen zu beobachten. Dies lässt nicht auf einen Bestrahlungseffekt, sondern viel mehr auf ein zelllinienspezifisches Problem bei der Aussaat schließen. Zudem zeigte dieses Ergebnis, dass die beobachteten zelllinienspezifischen Migrationsänderungen nach Bestrahlung nicht durch apoptotische oder vermehrt proliferative Zellen zu erklären sind.

Neben der Verdopplung der Zellen im Zeitraum des Migrationsversuchs wurde auch die Zellvitalität gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung sind in Abbildung 44 gezeigt. Direkt nach Röntgenbestrahlung wurden keine Unterschiede in der Zellvitalität nach Dosen von 1 Gy, 3 Gy oder 10 Gy deutlich. Nur eine Bestrahlung mit 20 Gy führte in U87 Zellen zu einer erhöhten Zellvitalität. Da dieser Dosispunkt allerdings nur einfach bestimmt wurde, ist die Aussagekraft der Beobachtung sehr eingeschränkt. 24 Stunden nach Bestrahlung waren in allen behandelten Proben leicht erhöhte Zellvitalitäten zu messen. Diese Änderungen waren zwar nicht signifikant, lassen aber auf eine erhöhte Aktivität der Zelle schließen, die auf die Reparatur der entstandenen DNA-Schäden zurückzuführen ist. Diese könnte mit einer verringerten „Bereitschaft“ der Zellen einhergehen zu migrieren. Die Untersuchungen zeigen allerdings, ähnlich wie die Bestimmung der Zellzahlen zu Versuchsende, keine signifikanten Unterschiede. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass die Zellvitalität durch eine Bestrahlung so stark beeinflusst wurde, dass diese in die Berechnung der Anteile migrierender Zellen mit einzubeziehen wäre.

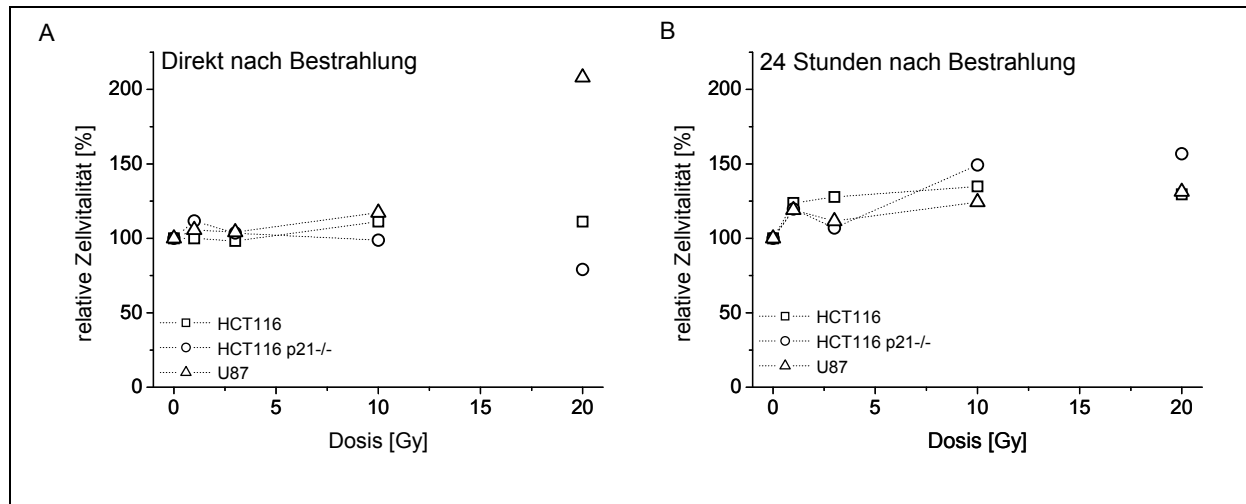


Abbildung 44: Zellvitalität nach Bestrahlung.

Gemessen wurde die Zellvitalität von HCT116 (Quadrat), HCT116 p21-/- (Kreis) und U87 Zellen (Dreieck) nach Röntgenbestrahlung. Die Zellen wurden direkt (A) bzw. 24 Stunden (B) nach Bestrahlung in 96-Well Platten ausgesät und 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels eines kommerziell erhältlichen XTT-Tests photometrisch in vierfach Messungen bestimmt. Neben den immer verwendeten Dosen von 1 Gy, 3 Gy und 10 Gy wurden die Zellen zudem mit 20 Gy bestrahlt. Dies sollte eine Bestrahlung mit Hoch-LET-Strahlung simulieren. Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche: (A) N = 2; (B) N = 3; (A) + (B) 20 Gy: N = 1.

4.3.1 Vergleich des Einflusses der Strahlenart

Um die erhaltenen Ergebnisse strahlenspezifisch einordnen zu können wurde die Wirkung von Röntgen- und ^{12}C -Ionenstrahlung auf die Zellwanderung verglichen. Dabei erfolgte der Vergleich der Strahlenwirkung auf die Migrationsänderung nach äquivalenten Dosen.

So zeigte sich direkt nach Bestrahlung für HCT116 und HCT116 p21-/- keine signifikanten Unterschiede in der Strahlenwirkung. U87 Zellen konnten direkt nach Bestrahlung effektiver durch Röntgenstrahlung in ihrer Migration gehemmt werden. Dementsprechend zeigte sich diese Strahlenart signifikant effektiver nach Dosen von 1 Gy und 3 Gy als äquivalente Dosen Schwerionen.

Auch 24 Stunden nach Bestrahlung konnten für HCT116 p21-/- keine signifikanten Unterschiede in der Strahlenwirkung von Röntgen- und Schwerionenstrahlung festgestellt werden, auch wenn ^{12}C -Ionen die Migration p21-defizienter HCT116 Zellen deutlicher reduzierten. HCT116 Zellen hingegen zeigten im Vergleich nach allen drei eingesetzten Dosen signifikant deutlichere Abnahmen der Migration nach Schwerionenstrahlung. Signifikante Unterschiede konnten auch bei U87 Zellen bestimmt werden. Hier war das migratorische Potential nach Bestrahlung mit 3 Gy und 10 Gy Schwerionenstrahlung deutlich effektiver inhibiert, als bei äquivalenten Dosen Röntgenstrahlung.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse könnten auch Konsequenzen für eine klinische Strahlentherapie haben. Da die Tumorzellmigration direkt an die Metastasierung von Tumoren gekoppelt ist, könnte eine erhöhte Zellmigration auch auf ein erhöhtes Risiko zur Metastasenbildung hindeuten. Versuche an Mäusen der Arbeitsgruppe Camphausen et

al. konnten zeigen, dass eine konventionelle Bestrahlung eines primären Lungentumors zu einer vermehrten Metastasenbildung führt (Camphausen et al., 2001). Von Rofstad et al. wurde eine erhöhte Metastasierung von Melanom-Xenografts nach Bestrahlung mit geringen Dosen Röntgenstrahlung veröffentlicht (Rofstad et al., 2004). Zwar lassen sich solche Aussagen aus reinen *in vitro* Versuchen nicht ziehen, doch birgt ein erhöhtes Migrationspotential auch das Risiko einer erhöhten Metastasierung *in vivo*. Für die hier untersuchten Zelllinien scheint das vor allem für die Gliomzelllinie U87 der Fall zu sein. Gliomzellen, welche von vornherein ein invasives Wachstum zeigen (Giese et al., 2003) könnten durch eine Röntgenbestrahlung vermehrt wandern und eine höhere Anzahl an Rezidiven bilden. Das Risiko einer strahleninduzierten Metastasenbildung scheint direkt nach Röntgenbestrahlung nicht deutlich zu werden, sondern auf verzögerte Mechanismen in der Zelle zu beruhen. Zu keinem Zeitpunkt nach einer Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen scheint ein Risiko zur Migrationsinduktion gegeben. Dort war nicht nur ein geringeres Überleben der Zellen zu verzeichnen, sondern es konnte auch eine Reduktion des Migrationspotentials beobachtet werden. Für HCT116 Zellen scheint dieses Risiko nach beiden untersuchten Strahlenarten nicht gegeben, da dort keine Induktion der Zellwanderung nach Bestrahlung zu detektieren war. Eine p21-Defizienz der Zellen veränderte dieses Ergebnis ebenfalls nicht.

Für die immer mehr in den Vordergrund tretende Therapievariante der Tumorbehandlung mit Kohlenstoffionen ist dies ein wichtiges Ergebnis. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Patienten erfolgreich mit dieser Art der Strahlentherapie behandelt (Schulz-Ertner et al., 2006; Schulz-Ertner et al., 2007a), allerdings sind mögliche langfristige Nebenwirkungen noch nicht hinreichend geklärt. Hier konnte nun erneut gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen nicht zu einer erhöhten Zellmigration in den untersuchten Zelllinien führt. Wohingegen eine solche Migrationsinduktion nach konventioneller Röntgenbestrahlung wenn auch zelllinienspezifisch durchaus möglich ist.

Für die therapeutische Behandlung von Kolonkarzinomen und Glioblastomen hätten die hier gezeigten Ergebnisse daher unterschiedliche Konsequenzen. Karzinome des Darms werden vorwiegend operativ entfernt, während die Strahlentherapie nur zur Verkleinerung des Tumorumfanges oder zur Entfernung noch vorhandenen Tumorgewebes eingesetzt wird (DKFZ, 2003). Die hier gezeigten Unterschiede in den Migrationsänderungen durch verschiedene Strahlenarten waren zwar 24 Stunden nach Bestrahlung auch in Bereichen klinisch relevanter Dosen signifikant, doch wäre die Nutzung von Schwerionen hier wenig sinnvoll. Das nicht begrenzende Tumorumfang und die Bewegungen des Darms erschweren den Einsatz einer Ionentherapie. Hier konnte zudem gezeigt werden, dass nach Röntgenbestrahlung keine Migrationsinduktion zu erwarten ist. Ein Risiko einer strahleninduzierten Bildung von Metastasen scheint daher nicht gegeben und eine konventionelle Bestrahlung ausreichend für eine Behandlung von kolorektalen Karzinomen. Andererseits ist die beste Mög-

lichkeit Glioblastome zu behandeln ist, trotz der hohen Radioresistenz der Tumoren und der Bildung von Rezidiven durch Einzelzellwanderung, die Radiotherapie (Bao et al., 2006). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass eine Röntgenbestrahlung in klinisch relevanten Dosisbereichen zu einer vermehrten Zellmigration führen kann und somit auch eine weitere Rezidivbildung der Glioblastome gefördert werden würde. Dies ist nach Schwerionenbestrahlung nicht zu beobachten gewesen. Daher könnte es für diese Tumorart durchaus vielversprechend sein, Patienten mit ^{12}C -Ionen zu behandeln. Die höhere biologische Wirksamkeit (RBW bei 10 % Überleben für U87 Zellen: 2,4 (Bohl et al., 2007)) dieser Strahlenart im Vergleich zur konventionellen Bestrahlung, die Tatsache, dass auf Grund der genauen Strahlanpassung an das Tumolvolumen weniger umliegendes empfindliches Normalgewebe getroffen wird und das signifikant verminderte Migrationsrisiko der Tumorzellen könnten in diesem Fall den hohen Kostenaufwand einer solchen Therapie rechtfertigen.

Welche molekularen Unterschiede für diese zelllinien- und strahlenspezifischen Änderungen in der Migration verantwortlich sind sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

4.4 Proteinexpression

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Proteine direkt und 24 Stunden nach Röntgen- oder Schwerionenbestrahlung bestimmt. Zu den untersuchten Proteinen gehörten die Integrine β_1 und β_3 sowie die Proteinkinase B-Isoformen Akt1 und Akt2. Die Beteiligung von Integrinen an der Zellmigration ist schon seit längerem bekannt, und eine Rolle an der Tumormetastasierung konnte für diese Proteine ebenfalls nachgewiesen werden (Guo und Giancotti, 2004). Für die Proteinkinase Akt, die eine zentrale Rolle in vielen Signalwegen einnimmt, wurden in letzter Zeit vermehrt Daten gewonnen, die eine isoformspezifische Beteiligung nicht nur am Überleben und der Proliferation von Zellen, sondern auch an der Zellmigration zeigen konnten (Stambolic und Woodgett, 2006).

Während für Integrine vermehrt Untersuchungen zur Expressionsänderung nach Röntgenbestrahlung vorhanden sind, ist dies für Akt nur bedingt der Fall. Von vielen Arbeitsgruppen wurde vor allem die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der Proteinkinase untersucht. Die vorliegenden Untersuchungen erfassen hingegen die Expressionsänderungen der genannten Proteine nach Bestrahlung. Zudem wurde parallel versucht, die Aktivierung über die Bestimmung der phosphorylierten Proteine zu ermitteln. Dies geschah für alle untersuchten Proteine über Western Blot Experimente, bei denen die immobilisierten Proteine mittels Peroxidase-gekoppelter Antikörper und eines ECL-Reagenzes als Banden auf einem Film detektiert wurden.

Bei den Auswertungen der Ergebnisse traten Probleme auf, die eine statistische Beurteilung der Signifikanz nicht zuließen. Das zur Detektion der Banden auf dem Film genutzte ECL-Reagenz hinterließ zum Teil eine starke Hintergrundfärbung auf den Filmen. Dadurch ver-

schwanden einzelne oder mehrere Banden eines Versuchsansatzes und waren nicht auswertbar. Eine mehrfache Bestimmung aller Proben wäre daher nötig gewesen. Da zum Teil von den Proben nur ein sehr geringes Volumen vorhanden war, war dies nicht möglich. Aus diesen Gründen konnten nicht alle Proteine zu allen Zeitpunkten in drei- oder mehrfach Bestimmungen untersucht werden. Eine Aussage über die Signifikanz konnte aber auch wegen der zum Teil sehr großen Standardabweichungen nicht getroffen werden. Die erhaltenen Ergebnisse spiegeln daher auch hauptsächlich Tendenzen der Expressionsänderung nach Bestrahlung wider.

Bei der Untersuchung der Aktivierung der Proteine ergaben sich weitere Probleme. Sowohl bei Integrinen als auch bei Akt wird die Aktivität der Proteine über die Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste durch spezifische Kinasen verändert. Während für Akt die beiden Aminosäurereste T308 und S437 als für eine vollständige Aktivierung wesentlich identifiziert wurden, ist dies für Integrine weniger eindeutig (Fagerholm et al., 2004). So besitzt der zytoplasmatische Teil der Integrine mehrerer mögliche Phosphorylierungsstellen; sechs für β_1 und zehn für β_3 Integrine. Über diese Aminosäurereste kann durch Phosphorylierung die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert und verschiedene Signalwege aktiviert werden. Auf Grund der vielfältigen Möglichkeiten Aminosäurephosphorylierungen zu kombinieren, ist es schwer über die Phosphorylierung einer einzelnen Aminosäure Aussagen über die Aktivität und Wirkung des Integrins zu treffen.

Während dieser Arbeit wurde in Western Blot Experimenten die Phosphorylierung der Integrine β_1 und β_3 untersucht. Dazu wurden Antikörper verwendet, die spezifisch die Phosphorylierung an einem (β_3 ; Y759) bzw. an zwei (β_1 ; T788/789) Aminosäureresten nachweisen sollte. Die detektierten Banden waren sehr dünn, und eine sehr lange Inkubationszeit des Filters auf der Membran war von Nöten, um diese Proteinbanden sichtbar zu machen. Dadurch wurde die Hintergrundfärbung vermehrt zu einem Problem. Auf Grund dessen wurden auch nur vereinzelt Proben der Zelllinien HCT116 und U87 gemessen. HCT116 p21^{-/-} Zellen wurden nicht auf die Phosphorylierung der Integrine untersucht. In fast allen untersuchten Proben (Ausnahme HCT116 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung) zeigten sich deutliche Zunahmen in der Integrinphosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine vermehrte Aktivität der Integrine hindeuten, welche sowohl einen Einfluss auf die Aktinfilamente, als auch auf eine Signalweiterleitung in die Zellen haben könnten. Auf Grund einer geringen Proteinausbeute gekoppelt mit dem Problem des schon beschriebenen Vorhandenseins vieler Phosphorylierungsstellen, stellte sich die Frage nach der möglichen Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse der Integrinphosphorylierung, welche daher auch nicht weiter untersucht wurden.

Die Untersuchung des Phosphorylierungstatus der Proteinkinase Akt stellte demgegenüber kein so großes Problem dar. In diesem Fall wurde die Phosphorylierung der Aminosäu-

re S473 der Proteinsequenz im Western Blot nachgewiesen. Für diese ist bekannt, dass eine Phosphorylierung über Autophosphorylierung des Proteins essentiell für eine vollständige Aktivierung ist. Da nur die aktive Akt-Form Signale in der Zelle weiterleitet und die Aminosäure S473 am Ende der Phosphorylierung steht (Toker und Newton, 2000), sind hier durchaus Möglichkeiten einer Interpretation der Ergebnisse gegeben.

Für alle untersuchten Proteine (β_1 und β_3 Integrine; Akt1, Akt2 und die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt (pAkt)) wurden zelllinien- und strahlenspezifische Änderungen nach Bestrahlung festgestellt. Dabei gab es zum Teil ebenfalls zeitliche Unterschiede in der Expression. Auffällig war die Tatsache, dass die untersuchte kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} kein β_3 Integrin exprimieren und dieses nur in der Gliomzelllinie U87 festgestellt werden konnte. Auf Grund der direkten Verbindung der Integrine mit der Zellmigration, lässt das zelllinienspezifische Expressionsmuster unterschiedliche Mechanismen und die Beteiligung verschiedener Proteine in der Migration der untersuchten Zelllinien vermuten. Friedl und Wolf beschrieben Migrationsmechanismen, bei denen Zellen nicht nur als Einzelzellen wandern können, sondern dies auch in Zellverbänden möglich ist. Zudem wurden verschiedene Formen der Einzellmigrationen dargestellt (Friedl und Wolf, 2003). Welchen Weg der Zellmigration Tumorzellen wählen hängt von der molekularen Expression verschiedener Proteine und dem Differenzierungsstatus der Zelle ab. So wird für Gliomzellen eine eher mesenchymale Einzellmigration vermutet, bei denen die Zellen eine spindelförmig Morphologie zeigen. Dabei sind die Zellen abhängig von einer Integrin-vermittelten Adhäsion. Für Kolonkarzinomzellen wird eher eine kollektive Wanderung von Zellen angenommen. Dies erfordert eine Koordination der Integrin- und Zytoskelettaktivität innerhalb des Zellkollektivs und somit nicht nur Adhäsionen an die extrazelluläre Matrix und zwischen den Zellen, sondern auch zelluläre Kommunikationen über „gap-junctions“ (Friedl und Wolf, 2003). Andere Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass Integrine in verschiedenen Zelllinien entgegen gesetzte Aufgaben erfüllen können. In kolorektalen Zellen konnte ein inhibierender Einfluss des Integrins β_1 auf die Zellmigration nachgewiesen werden, während dieses in Gliomzellen positiv mit der Wanderung der Zellen korreliert (Paulus et al., 1996; Schirner et al., 1998).

Die zelllinien- und strahlenspezifischen Unterschiede in der Expression der Isoformen Akt1 und Akt2 könnten durch die bisher entdeckten isoformspezifischen Aufgaben der Proteinkinase erklärt werden. Während für Akt1 die Regulation der Zellmigration als Aufgabe postuliert wird, scheint Akt2 eher die Proliferation und das Überleben der Zelle zu beeinflussen (Irie et al., 2005).

Um über den Einfluss der untersuchten Proteine auf die Zellwanderung eine Aussage treffen zu können, wurden die Migration mit der jeweiligen Proteinexpression verglichen. Die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse erfolgt im folgenden Abschnitt.

4.5 Vergleich von Migration und Proteinexpression

Aus der Literatur ist bekannt, dass Integrine eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration spielen (Guo und Giancotti, 2004). Für eine Vielzahl von Tumorarten konnte eine erhöhte Expression der Integrine β_1 und β_3 mit einem metastasierenden Phenotyp und einer erhöhten Invasion der Zellen assoziiert werden (Felding-Habermann, 2003). So konnte zudem von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch den Einsatz integrinspezifischer Antikörper die Zellmigration inhibiert werden kann. Für die Beteiligung von β_3 Integrine an der Migration von Gliomzellen zeigten dies unter anderem Cordes et al. (2003). Melchiori et al. konnten ähnliches in Melanomzellen für das Integrin β_1 nachweisen. Auch hier wurde die Migration der Tumorzellen durch Zugabe eines integrinspezifischen Antikörpers inhibiert (Melchiori et al., 1995). Die beobachteten Änderungen der Migration nach Röntgen- und Schwerionenstrahlung wurden daher mit den Expressionsänderung der untersuchten Proteine verglichen. Da große signifikante Änderungen der Migration erst nach 24 Stunden sichtbar wurden, wurde die Expression der Proteine nur zu diesem Zeitpunkt mit der Wanderung in Bezug gesetzt.

Dabei konnten lediglich bedingte parallele Veränderungen gezeigt werden, und die beobachteten Migrationsvariationen lassen sich daher auch nicht nur durch die Proteinexpression von β_1 und β_3 Integrinen erklären. So zeigten HCT116 Zellen nach Röntgenbestrahlung eine zur Migration gegenläufige β_1 Integrinexpression, welche mit dem inhibierenden Einfluss von β_1 Integrinen den andere Arbeitsgruppen beobachteten (Paulus et al., 1996), korrelierte. Zudem konnte Meineke et al. ebenfalls eine Zunahme von β_1 Integrinen in kolorektalen Zellen nach Röntgenstrahlung nachweisen (Meineke et al., 2002). Schwerionenbestrahlung hingegen führte zu parallelen Änderungen der untersuchten Parameter, welches den bisher veröffentlichten Daten widerspricht und auf unterschiedliche Regulationen der Proteinexpression nach den beiden getesteten Strahlenarten hindeutet. HCT116 p21^{-/-} Zellen zeigten ebenfalls strahlenspezifische Unterschiede. Obwohl für diese Zellen eine ähnliche Zellwanderung wie für die parentale Zelllinie nachgewiesen wurde, veränderte sich die β_1 Integrinexpression nach Röntgenstrahlung kaum und war nach Behandlung mit Schwerionen deutlich erhöht. Woher diese Unterschiede kommen ist unklar. Bisher konnte zelllinienspezifisch gezeigt werden, dass eine Veränderung der β_1 Integrinexpression die p21-Expression beeinflusst und so die Zellproliferation verändert (Li et al., 2005). In wieweit allerdings p21 die Expression von Integrinen verändert ist bisher nicht untersucht. Bekannt ist, dass HCT116 p21^{-/-} Zellen ein anderes Adhäsionsverhalten zeigen, als HCT116 Zellen (Mueller et al., 2000). Dies

ist auf eine über p21 regulierte und daher veränderte E-Cadherinexpression zurückzuführen, die nur das Wachstum angehefteter Zellen ermöglicht. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von Integrinen und p21 bestehen könnte, da HCT116p21^{-/-} Zellen sich bezüglich ihrer β_1 Integrinexpression nach Bestrahlung deutlich anders verhalten als parentale HCT116 Zellen.

U87 Zellen zeigten nach beiden Strahlenarten eine erhöhte β_1 und β_3 Integrinexpression. Diese verhielten sich im Vergleich zur Migration nach Röntgenstrahlung eher gleichsinnig, während nach Schwerionenstrahlung ein eher gegensinniges Verhalten zu beobachten war. Die gezeigten Änderungen nach Röntgenbestrahlung konnte schon von andern Arbeitsgruppen beobachtet werden. So konnten unter anderem Cordes et al. eine erhöhte Expression von β_1 und β_3 Integrinen nach Röntgenstrahlung nachweisen, welche mit einer erhöhten Invasionskapazität der untersuchten Gliomzellen korrelierte (Cordes et al., 2003). Zudem konnte für U87 Zellen gezeigt werden, dass die Inhibition von β_3 Integrinen zu einer Abnahme der Migration führte (Wild-Bode et al., 2001). Dies entspricht den erhaltenen Ergebnissen, doch deuten auch hier die Änderungen nach Schwerionenstrahlung auf unterschiedliche strahlenspezifische Regulationsmechanismen der Integrinexpression hin.

Die Proteinkinase Akt spielt in einer Vielzahl von zellulären Signalwegen eine Rolle und hat daher Einfluss auf Transkription, Translation, Proliferation, Wachstum und Überleben der Zelle (Osaki et al., 2004). Zudem konnten isoformspezifische Aufgaben für Akt1 und Akt2 in der Zellmigration nachgewiesen werden. Obwohl beide Isoformen die Migration von Tumorzellen beeinflussen können, scheinen sie dies gegensätzlich zu tun. *In vivo* Versuche in Mäusen konnten zeigen, dass eine Überexpression von Akt2, zum Teil abhängig von der β_1 Integrinexpression, ein erhöhtes metastasierendes Potential induzierte, während eine vermehrt aktive Akt1 Form zu einer verringerten Metastasenbildung führte (Stambolic und Woodgett, 2006). Zudem wurde in neuere Studien in einem *in vitro* Brustkrebs-Modell eine positive Beeinflussung der Proliferation und des zellulären Überlebens durch Akt2 nachgewiesen. Im selben Modell wurde ein negativer Einfluss von Akt1 auf die Zellwanderung deutlich (Irie et al., 2005). In Gliomzellen führte der Einsatz von antisense Akt2-cDNA zu einer verminderten Zellmigration und Invasion (Pu et al., 2004). Veränderungen der Akt1 und Akt2 Expression nach Bestrahlung und ein möglicher Einfluss auf die Zellwanderung wurden bisher allerdings nicht untersucht. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde daher nach den Integrinen auch die Expression von Akt1 und Akt2, sowie die Aktivierung der Proteinkinase untersucht und mit den erhaltenen Migrationsergebnissen verglichen.

Auch für den Vergleich der Migration mit der Akt-Expression und Phosphorylierung wurden zelllinien- und strahlenspezifische Änderung deutlich. Trotz Unterschieden in der Migration konnte für alle drei Zelllinien eine Zunahme der Akt1-Expression nach Röntgenstrahlung er-

mittelt werden. Damit entsprachen die erhaltenen Ergebnisse mit einem gegenläufigen Verhalten von Migration und Akt1-Expression der Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-} den oben beschriebenen Literaturdaten. U87 Zellen zeigten hingegen einen zum Teil gleichsinnigen Trend der beiden Parameter, welche eher auf einem positiven Einfluss von Akt1 auf die Migration hindeutet. Nach Schwerionenbestrahlung ändert sich diese Bild. Hier verändern sich die untersuchten Parameter in HCT116 und HCT116 p21^{-/-} eher gleichsinnig, während in U87 Zellen ein gegenläufiger Trend zu beobachten war. Während die Beobachtung der Gliomzelllinie mit der Theorie einer negativen Regulation der Migration durch Akt1 erklärt werden kann, ist dies für die kolorektalen Zellen nicht der Fall. Offensichtlich spielen auch hier nach ¹²C-Ionenbestrahlung noch andere Faktoren eine Rolle, welche zu den strahlenspezifischen Unterschieden führen.

Für die Proteinkinase Akt2 konnte das *in vivo* gezeigte Modell der Migrationsbeeinflussung durch Akt2 nur in HCT116 p21^{-/-} wiedergefunden werden. Hier zeigten sich nach beiden Strahlenarten parallel zur Abnahme der Migration auch eher verringerte Akt2-Expressionen. Für HCT116 Zellen wurde sowohl nach Röntgen- als auch nach Schwerionenstrahlung ein gegensinniger Verlauf von Migration und Akt2-Expression nachgewiesen. Die deutlichen Unterschiede zwischen diesen beiden kolorektalen Zelllinien deuten erneut auf zelllinienspezifische Veränderungen von Akt2 durch das Protein p21 hin. So scheint eine Regulation von Akt2 durch p21 möglich auch wenn diese bisher nicht untersucht wurde. Es lassen sich lediglich Daten finden, die eine Phosphorylierung von p21 sowohl durch Akt1 als auch Akt2 zeigen konnten (Manning und Cantley, 2007). Auch die erhaltenen Ergebnisse der Zelllinie U87 widersprechen den bisher bekannten Literaturdaten. Die veröffentlichte positive Beeinflussung der Migration durch Akt2 in Gliomzellen konnte hier nicht gezeigt werden (Pu et al., 2006). Während sich nach Röntgenstrahlung nur sehr geringe Änderungen zeigten, wurden nach Schwerionenbestrahlung deutlich gegenläufige Veränderungen sichtbar. Auch hier scheinen strahlenspezifische Einflüsse eine Rolle zu spielen, die die Migration effektiver beeinflussen.

Im Gegensatz zur Expression von Akt1 und Akt2 gibt es ein paar mehr Daten über die Phosphorylierung von Akt. Diese ist essentiell für Weiterleitung von Signalen über Akt und sollte daher Aufschluss über deren Aktivität geben. Abgesehen von U87 nach Röntgenbestrahlung zeigten alle Zelllinien sowohl nach Röntgen- als auch nach Schwerionenstrahlung eine Zunahme im Phosphorylierungsgrad von Akt. Diese verliefen in allen Fällen gegensinnig zur beobachteten Migration. Die Zunahme von pAkt nach Bestrahlung entspricht Ergebnissen die andere Arbeitsgruppen auch erlangt haben. So konnten Zingg et al. in Endothelzellen eine dosisabhängige Zunahme der Phosphorylierung über die Zeit zeigen (Zingg et al., 2004). U87 Zellen zeigten nach Röntgenstrahlung eine Abnahme der Phosphorylierung. Allerdings zeigt diese Reduktion im Vergleich zur Zellmigration einen ebenfalls gegensinnigen

Trend. Es kann daher vermutet werden, dass durch Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von Akt eine Aussage über das Migrationsverhalten nach Bestrahlung getroffen werden kann. Dies ist in diesem Fall sowohl zelllinien- als auch strahlenunabhängig. Da über den hier verwendeten Antikörper alle phosphorylierten Isoformen von Akt nachgewiesen werden, scheint ein Zusammenspiel von Akt1 und Akt2 zur Beeinflussung der Zellmigration möglich. Allerdings wären auf Grund einer sehr großen Standardabweichung auch andere Ergebnisse denkbar. Daher kann nur eine weiterführende Untersuchung, vielleicht auch über andere Methoden, Aufschluss über den zelllinienspezifischen Ablauf der strahleninduzierten Migrationsänderungen geben.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der radiobiologische Einfluss von Röntgen- und Schwerionenstrahlung auf die Migration von Tumorzellen untersucht. Dabei zeigten sich vor allem für die Zellwanderung deutliche zelllinien- und strahlenspezifische Unterschiede, welche wie erläutert einen Einfluss auf die klinische Behandlung von Tumoren der hier untersuchten Entitäten haben könnte. Zudem könnte die Anwendung fraktionierter Bestrahlungen von Patienten oder aber die gleichzeitige Gabe von Chemotherapeutika ebenfalls einen Einfluss auf die Migration zeigen. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen müssten weitere Studien durchgeführt werden, die unter einer besseren Annäherung an die Therapiebehandlungen und die *in vivo* Situation erfolgen müssten. Dies könnten zum einen 3D-Modelle, wie die Einwanderung von Zellen in Matrigel oder aber Tiermodelle sein. Festzuhalten bleibt allerdings, dass es eindeutige Unterschiede zwischen Röntgen- und Schwerionenstrahlung gab, welche vor allem in der Zellmigration zum Ausdruck kamen. Auf Grund dieser Ergebnisse können ^{12}C -Ionen als deutlich risikoärmer für eine therapieinduzierte Metastasierung von Tumoren eingestuft werden. Wo die mechanistischen Unterschiede in der Tumorzellmigration nach den beiden Bestrahlungsarten liegen, konnte nur unzureichend geklärt werden. Offensichtlich spielen nicht nur die hier untersuchten Proteine eine Rolle. Vor allem der Einfluss von Schwerionen ist noch sehr unzureichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Eine mögliche Proteingruppe die hier nicht untersucht wurde, sind Matrixmetalloproteasen (MMPs). Diese sind in der Zellinvasion für den Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich und somit ein ebenfalls entscheidender Faktor in der Zellmigration (Deryugina und Quigley, 2006). Eine Untersuchung dieser Proteinfamilie könnte daher neue Aufschlüsse über die Zellmigration nach Bestrahlung liefern. Insgesamt sind die gewonnenen *in vitro* Daten allerdings nicht ohne Vorbehalte in die *in vivo* Situation zu übertragen. Dies gilt vor allem für an der Migration beteiligte Proteine, welche durch viele pro- und anti-migratorischer Signale die in der Zelle und im Körper eine Rolle spielen noch zusätzlich beeinflusst werden und eine direkte Übertragung nur bedingt möglich machen (Wedlich, 2005).

5 Zusammenfassung

Die Bildung von Metastasen und Rezidiven stellt ein großes Problem für eine erfolgreiche Therapie solider maligner Tumoren dar. Dabei ist die Rolle der angewendeten Therapieverfahren in der Induktion metastasierender Zellen vor allem für eine Schwerionentherapie noch weitestgehend unklar. Die für die Metastasierung entscheidende Tumorzellmigration wurde daher unter dem Einfluss von Röntgen- und Schwerionenstrahlung untersucht. Dazu wurden drei humane Tumorzelllinien (Gliomzelllinie U87 und kolorektale Zelllinien HCT116 und HCT116 p21^{-/-}) unter standardisierten Bedingungen in einer Boydenkammer direkt und 24 Stunden nach Bestrahlung *in vitro* auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Um mögliche Änderungen migrationsrelevanter Proteine zu bestimmen, wurden zu denselben Zeitpunkten Zelllysate hergestellt und die Expression der Integrine β_1 und β_3 sowie der Proteinkinase B Isoformen Akt1 und Akt2 und deren Phosphorylierung untersucht.

Gezeigt werden konnten sowohl zelllinien- als auch strahlenspezifische Unterschiede in der Migration und der Proteinexpressionen. Dabei konnten die beobachteten Migrationsänderungen nur zum Teil (vor allem nach Röntgenbestrahlung) durch die veränderte Expressionen der untersuchten Proteine erklärt werden. Daher ist zu vermuten, dass den strahleninduzierten Veränderungen der Migration der verwendeten Zelllinien verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, die auf der Expression unterschiedlicher Proteine beruhen. Bestrahlungen mit ¹²C-Ionen scheinen prinzipiell andere Expressionsmuster zu induzieren als konventionelle Strahlung und die hier untersuchten Proteine in der Migration der Zellen daher nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auffällig waren die deutlich zelllinienspezifischen Unterschiede in der Migration nach Röntgenbestrahlung. Dort wurde ein zum Teil erhöhtes Migrationspotential nach klinisch relevanten Bestrahlungsdosen von U87 Gliomzellen festgestellt. Die Migrationsaktivität von kolorektalen Zelllinien hingegen nahm nach Bestrahlung ab. Nach Schwerionenbestrahlung wurden für alle Zelllinien signifikante Abnahmen der Migration festgestellt.

Die hier erhaltenen Ergebnisse können aufgrund einer Vielzahl pro- und antimigratorischer Signale im Tumorgewebe nicht direkt in die *in vivo* Situation übertragen werden, doch können sie durchaus als Hinweise für die Abschätzung eines veränderten Metastasierungsrisikos dienen. Für kolorektale Zellen, unabhängig von ihrem p21-Status scheint eine Behandlung mit Röntgenstrahlen eher nicht mit einem erhöhten Migrationsrisiko einherzugehen. Anders ist dies bei den hier untersuchten Gliomzellen U87. Hier kann ein strahleninduziertes Metastasierungsrisiko aufgrund der erzielten Ergebnisse keinesfalls ausgeschlossen werden. Aus dieser Sicht scheint eine Behandlung von Gliomen mit ¹²C-Ionen vorteilhafter, da eine sehr gute reproduzierbare strahlenvermittelte Migrationshemmung beobachtet wurde.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
¹² C	Kohlenstoff
μ	Mikro-
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
d	Tag
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemilumineszens
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronenspeicherring
EtOH/HCl	Ethanol-Salzsäure Gemisch
FBS	Fötales bovines Serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung
Gy	Gray
h	Stunde
HRP	Horseradish (Meerrettich) Peroxidase
IMPT	Intensitätsmodulierte Partikeltherapie
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
k	Kilo-
keV	Kiloelektronenvolt
l	Liter
LET	Linearer Energietransfer
m	Milli-

mA	Milliamper
MeV	Megaelektronenvolt
Mg	Magnesium
Monokl.	monoklonal
N	Anzahl unabhängig durchgeführter Versuche
n	Anzahl durchgeführter Einzelbestimmungen
n	Nano-
OD	optische Dichte
PBS	Phosphor buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Plating efficiency (Koloniebildungstest)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Polykl.	polyklonal
RBW	relative biologische Wirksamkeit
RGD	Tripeptidsequenz
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SF2	survival fraction 2 (Zellüberleben nach 2 Gy)
SIS	Schwerionensynchrotron
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline mit Tween20
UNILAC	Linearbeschleuniger
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

6.2 Puffer und Lösungen

PBS (10x):

Kaliumchlorid	27 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	15 mM
di-Natriumhydrogenphosphat	65 mM
Natriumchlorid	730 mM
pH: 7,3 – 7,4	

6.2.1 Zellkultur

Zellkulturmedium für HCT116 und HCT116 p21-/- Zellen:

DMEM (mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin)		
Zusatz von:	FBS Gold	10 %
	Natriumpyruvat (100 mM)	1 %
	Nicht-essentielle Aminosäuren	1 %
	HEPES (1 M)	2 %

Zellkulturmedium für U87 Zellen:

DMEM (mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin)		
Zusatz von:	FBS Gold	10 %
	Natriumpyruvat (100 mM)	1 %

Hank's Lösung:

Natriumchlorid	136,9 mM
Kaliumchlorid	5,36 mM
di-Natriumhydrogenphosphat	0,28 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,44 mM
HEPES	27,43 mM

pH: 7,2; autoklavieren; Lagerung 4 °C

Vor Gebrauch (à 500 ml):

Glukose	0,5 g
EDTA Tetranatriumsalz Dihydrat	4,75 g

Beides in etwas steriler Hank's Lösung lösen; anschließend sterilfiltriert in die Flasche überführen

Tabelle 18: Verwendete Zellkulturgefäße und Medienvolumen.

Zellkulturgefäß	Fläche [cm ²]	Mediumvolumen insgesamt [ml]	Hank's Lösung [ml]	Trypsin [ml]
Zellkulturflasche	25	5	3	0,5
Zellkulturflasche	75	10	4	1
6-Well Platte	9,8/Well	2,5	1	0,3
24-Well Platte	1,8/Well	0,5	0,5	0,2-0,5
96-Well Platte	0,2/Well	0,2	-	-

Methylenblau:

0,1 % in Aqua dest.

6.2.2 Boydenkammer**Rattenkollagen I-Stammlösung (Rattenschwanz):**

Kollagen-Lyophilisat 50 mg
60 % Ethanol 5 ml
1 M Salzsäure 50 µl
über Nacht bei 4 °C lösen; Lagerung: -20 °C

Rattenkollagen I-Gebrauchslösung:

Rattenkollagen I-Stammlösung 1 ml
60 % Ethanol 5,66 ml
gut vortexen; Lagerung: 4 °C

Humanes Kollagen IV-Stammlösung (Plazenta):

Kollagen-Lyophilisat 25 mg
60 % Ethanol 2,5 ml
1 M Salzsäure 25 µl
über Nacht bei 4 °C lösen; Lagerung: -20 °C

Humanes Kollagen IV-Gebrauchslösung:

Humanes Kollagen IV Stammlösung 0,5 ml
60 % Ethanol 2,83 ml
gut vortexen; Lagerung: 4 °C

Gelatinelösung (10x):

Gelatine	100 mg
Aqua dest.	100 ml
Eisessig	120 µl
Bei 60 °C für 60 Minuten lösen und à 10 ml aliquotieren	
Lagerung: -20°C	

Puffer nach Weise:

Puffertablette	1
Aqua dest.	300 ml
Nach lösen auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen	

Reinigungslösung (Tergazym):

Tergazym	1 % in Aqua dest.
Bei 56 °C lösen	

6.2.3 Western Blot

Lysepuffer:

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ –Puffer (pH 7)	10 mM
Natriumfluorid	50 mM
EDTA	10 mM
Triton X 100	1,2 %

Direkt in Probe:

Phosphatase Inhibitor	10 µl / 300 µl Lysepuffer
Proteinase Inhibitor	10 µl / 300 µl Lysepuffer

Trenngel (10 %):

Aqua dest.	1,9 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	1,7 ml
Tris (1,5 M; pH 8,8)	1,3 ml
SDS (10 % in Aqua dest.)	50 µl
APS (10 % in Aqua dest.)	50 µl
Temed	2 µl

Sammelgel (5 %):

Aqua dest.	1,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	330 µl
Tris/HCl (1,0 M; pH 6,8)	250 µl
SDS (10 % in Aqua dest.)	20 µl
APS (10 % in Aqua dest.)	20 µl
Temed	2 µl

SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer (1x):

Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 %

SDS-Ladepuffer:

SDS (10 %)	20 ml
Glycerin	10 ml
Tris/HCl (1,0 M; pH 6,8)	8 ml
Aqua dest.	62 ml
Bromphenolblaulösung (0,1 %)	8 ml

Transferpuffer

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	1,3 mM

TBS (10x):

Tris	500 mM
Natriumchlorid	3 M
pH: 7,6	

TBST:

TBS	1x
Tween20	0,01 %

Glycin-HCl-Puffer:

Glycin	100mM
Ansäuern mit HCl (konz.): pH 1,2 (250 µl auf 50 ml Puffer)	

6.2.4 Sonstige Lösungen

TBE (5x):

Tris	445 mM
Borsäure	445 mM
EDTA (0,5 M pH 8,0)	10 mM

6.3 Marker

PeqLab Gold IV	PeqLab	Erlangen, Deutschland
DNA-Marker pUC19/Mspl	Roth	Karlsruhe, Deutschland

6.4 Kits

Mykoplasmen-Detektionskit Venor Gem	Minerva Biolabs	Berlin, Deutschland
XTT – Zellzytotoxizitätstest (Tox2)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland

6.5 Antikörper

Verdünnung der Primärantikörper:

p21	1:500
β_1 Integrin, β_3 Integrin	1:1000
$p\beta_1$ Integrin, $p\beta_3$ Integrin	1:1000
Akt1	1:1000
Akt2, pAkt	1:1000
Aktin	1:1000

Verdünnung der Sekundärantikörper:

Anti-Maus	1:10000
Anti-Kaninchen	1:5000
Anti-Ziege	1:2500

Durchschnittliche Belichtungszeiten:

p21	10 Minuten
β_1 Integrin, β_3 Integrin	10 – 15 Minuten
$p\beta_1$ Integrin, $p\beta_3$ Integrin	30 – 45 Minuten
Akt1	10 Minuten
Akt2, pAkt	15 – 20 Minuten
Aktin	10 Minuten

p21 (187)	Santa Cruz Biotech.	Heidelberg, Deutschland
Maus (monokl.) human CD29 (β_1 Integrin)	Biosource	Nivelle, Belgien
Maus (monokl.) β_3 Integrin (CD61)	Biosource	Nivelle, Belgien
Kaninchen (polykl.) Integrin β_1 Rezeptor [pTpT ^{788/789}]		Biosource; Nivelle, Belgien
Kaninchen (polykl.) β_3 Integrin [pY ⁷⁸⁵]	Biosource	Nivelle, Belgien
Maus (monokl.) Akt1 (2H10)	Cell Signaling	Frankfurt, Deutschland
Kaninchen (monokl.) Akt2 (5B5)	Cell Signaling	Frankfurt, Deutschland
Kaninchen Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling	Frankfurt, Deutschland
Aktin	Santa Cruz Biotech.	Heidelberg, Deutschland
HRP-konjugiert Anti-Maus	Dianova	Hamburg, Deutschland
HRP-konjugiert Esel Anti-Kaninchen	Santa Cruz Biotech.	Heidelberg, Deutschland
HRP-konjugiert Esel Anti-Ziege	Santa Cruz Biotech.	Heidelberg, Deutschland

6.6 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
BSA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
CasyClean	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Casy [®] ton	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
DMEM high glucose (4,5 g/l)	PAA	Cölbe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
DNA-Ladepuffer (6x)	Promega	Mannheim, Deutschland
ECL-Reagenz	Amersham	München, Deutschland
	Santa Cruz Biotech.	Heidelberg, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland

Anhang

Eisessig	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Entwicklerlösung	Tetenal	Norderstedt, Deutschland
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
FBS Gold	PAA	Cölbe, Deutschland
Fixierlösung	Tetenal	Norderstedt, Deutschland
Gelatine	Calbiochem, Merck	Darmstadt, Deutschland
Glukose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Hämacolor Lösung 2 + 3	Merck	Darmstadt, Deutschland
HEPES	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Humanes Kollagen IV (Plazenta)	Fluka, Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Immersionsöl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Promega	Mannheim, Deutschland
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Methylenblau	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Nagellack	Rossmann	Burgwedel, Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Serva	Heidelberg, Deutschland
Natriumfluorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Appllichem	Darmstadt, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Puffertablette „Puffer nach Weise“	Merck	Darmstadt, Deutschland
Rattenkollagen I (Rattenschwanz)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Roti [®] -Block	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (1 M)	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Temed	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tergazym	Sigma-Aldrich	Schnelldorf, Deutschland

Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich	Schnellendorf, Deutschland
Trypsin EDTA (1x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich	Schnellendorf, Deutschland

6.7 Material und Geräte

96-Well Platten	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Absauganlage	Neuberger	Freiburg, Deutschland
Agarosegelelektrophoresekammer	Pharmacia Biotech	Wien, Österreich
Boydenkammer (AP48)	NeuroProbe	Gaithersburg, MD, USA
Casy [®] 1 TT	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Einfrierbehälter	Nalge Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	VWR	Darmstadt, Deutschland
Dosimeter SN4	PTW	Freiburg, Deutschland
Einmal-Pipetten	Greiner	Frickenhausen, Dtl.
Film (Western Blot)	GE Healthcare	München, Deutschland
Flow Clean Air CA/Rev3	Clean Air	Minneapolis, MN, USA
Geldokumentationsanlage	Intas	Göttingen, Deutschland
Glasgefäße	Schott	Mainz, Deutschland
Inkubator	Heraeus	Hanau, Deutschland
Kamera Nikon D100	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nalge Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Mikroplate-Reader UV-3550	BioRad	München, Deutschland
Mikroskope		
Axiophot	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Olympus IM	Olympus	Hamburg, Deutschland
Objektträger	Menzel	Braunschweig, Dtl.
PCTE-Filter (0,8 µm Porengröße)	NeuroProbe	Gaithersburg, MD, USA
pH-Meter	Schott Geräte	Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner	Frickenhausen, Dtl.
Pipettus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
PVDF Membran (Immobilon [™] -P)	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Reaktionsgefäße		
50 ml, 15 ml	Greiner	Frickenhausen, Dtl.
2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
0,2 ml	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Röntgenröhre Isovolt DS1	Seifert	Ahrensburg, Deutschland

Scanner	Epson	Meerbusch, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresesystem	BioRad	München, Deutschland
Spannungsgerät	BioRad	München, Deutschland
Sterilfilter (0,1 µm Porengröße)	PALL	Dreieich, Deutschland
Biotherm Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	GeneCraft	Köln, Deutschland
Thermocycler	Biometra	Goettingen, Deutschland
Vortexer	Bender + Hobein	Bruchsal, Deutschland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Wattestäbchen	dm-drogerie markt	Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturgefäße	Greiner	Frickenhausen, Dtl.
Zentrifugen		
Biofuge 15, Rotor 3042	Heraeus	Hanau, Deutschland
Megafuge 1,0R, Rotor 2252	Heraeus	Hanau, Deutschland

6.8 Programme

Excel, PowerPoint, Word	Microsoft	München, Deutschland
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda, MD, USA	
MicroplateManager 4.0	BioRad	München, Deutschland
Nikon Capture Control	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
OriginLab 7G	OriginLab	Northampton, MA, USA
Photoshop 6, Photoshop CS2	Adobe Systems	München, Deutschland
STATISTICA	StatSoft	Hamburg, Deutschland

7 Referenzen

- Abdollahi, A, Griggs, DW, Zieher, H, Roth, A, Lipson, KE, Saffrich, R, Grone, HJ, Hallahan, DE, Reisfeld, RA, Debus, J, Niethammer, AG, Huber, PE; Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res* 11(17): 6270-6279, 2005.
- Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, and Watson, JD; *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland Publisher, Inc., New York, NY, 1994.
- Amaldi, U und Kraft, G; European developments in radiotherapy with beams of large radiobiological effectiveness. *J Radiat Res (Tokyo)* 48 Suppl A A27-A41, 2007.
- Bao, S, Wu, Q, McLendon, RE, Hao, Y, Shi, Q, Hjelmeland, AB, Dewhirst, MW, Bigner, DD, Rich, JN; Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444(7120): 756-760, 2006.
- Bohl, J., Combs, S. E., Debus, J., Elsaesser T., Schulz-Ertner, D., and Weyrather WK; Carbon ion irradiation of glioblastoma cell lines combined with chemotherapy. GSI scientific report 2006. Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH: S. 302, 2007.
- Boyden, S; The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115 453-466, 1962.
- Brattain, MG, Fine, WD, Khaled, FM, Thompson, J, Brattain, DE; Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41(5): 1751-1756, 1981.
- Camphausen, K, Moses, MA, Beecken, WD, Khan, MK, Folkman, J, O'Reilly, MS; Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res* 61(5): 2207-2211, 2001.
- Chendil, D, Oakes, R, Alcock, RA, Patel, N, Mayhew, C, Mohiuddin, M, Gallicchio, VS, Ahmed, MM; Low dose fractionated radiation enhances the radiosensitization effect of paclitaxel in colorectal tumor cells with mutant p53. *Cancer* 89(9): 1893-1900, 2000.
- Coffer, PJ und Woodgett, JR; Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201(2): 475-481, 1991.
- Cordes, N, Hansmeier, B, Beinke, C, Meineke, V, Van Beuningen D.; Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br J Cancer* 89(11): 2122-2132, 2003.
- Debus, J; *Einrichtung einer klinischen Therapieanlage zur Krebsbehandlung mit Ionenstrahlen*. Seltersdruck, Selters, 1998.
- Delmas, C, Heliez, C, Cohen-Jonathan, E, End, D, Bonnet, J, Favre, G, Toulas, C; Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer* 100(1): 43-48, 2002.

Denoyer, D, Perek, N, Le, JN, Cornillon, J, Dubois, F; Correlation between ^{99m}Tc-(V)-DMSA uptake and constitutive level of phosphorylated focal adhesion kinase in an in vitro model of cancer cell lines. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32(7): 820-827, 2005.

Deryugina, EI und Quigley, JP; Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25(1): 9-34, 2006.

DKFZ, Dickdarmkrebs: Diagnose, Therapie, Nachsorge - Informationen für Betroffene, ihre Angehörige und Freunde. Stand: 29.08.2003.
<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/index.php>; Zugriff: 22.03.8 A.D.

DKFZ, Hirntumoren: Krebserkrankungen in der "Schaltzentrale" des Menschen. Stand: 14.10.2006. <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/hirntumoren.php>; Zugriff: 22.03.8 A.D.

DKFZ, Behandlungsverfahren bei Krebs: Eine Übersicht. Stand: 21.11.2007.
<http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/behandlung/index.php>; Zugriff: 12.03.2008.

Entschladen, F, Drell, TL, Lang, K, Masur, K, Palm, D, Bastian, P, Niggemann, B, Zaenker, KS; Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* 307(2): 418-426, 2005.

Fagerholm, SC, Hilden, TJ, Gahmberg, CG; P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions. *Trends Biochem Sci* 29(9): 504-512, 2004.

Felding-Habermann, B; Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 20(3): 203-213, 2003.

Fellner, S, Bauer, B, Miller, DS, Schaffrik, M, Fankhanel, M, Spruss, T, Bernhardt, G, Graeff, C, Farber, L, Gschaidmeier, H, Buschauer, A, Fricker, G; Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 110(9): 1309-1318, 2002.

Flatmark, K, Nome, RV, Folkvord, S, Bratland, A, Rasmussen, H, Ellefsen, MS, Fodstad, O, Ree, AH; Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiat Oncol* 1 25-2006.

Fresno Vara, JA, Casado, E, de, CJ, Cejas, P, Belda-Iniesta, C, Gonzalez-Baron, M; PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30(2): 193-204, 2004.

Friedl, P und Wolf, K; Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3(5): 362-374, 2003.

Giancotti, FG und Ruoslahti, E; Integrin signaling. *Science* 285(5430): 1028-1032, 1999.

Giese, A, Bjerkvig, R, Berens, ME, Westphal, M; Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21(8): 1624-1636, 2003.

GSI; Von den Grundbausteinen zur komplexen Materie. Gesellschaft für Schwerionenforschung, Darmstadt, 2001.

GSI, Wo die schweren Ionen herkommen. Stand: 11.08.2003.

<http://www.gsi.de/portrait/Broschueren/Wunderland/10.html>; Zugriff: 16.03.2008.

Guha, C, Guha, U, Tribius, S, Alfieri, A, Casper, D, Chakravarty, P, Mellado, W, Pandita, TK, Vikram, B; Antisense ATM gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumors. *Gene Ther* 7(10): 852-858, 2000b.

Guha, C, Guha, U, Tribius, S, Alfieri, A, Casper, D, Chakravarty, P, Mellado, W, Pandita, TK, Vikram, B; Antisense ATM gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumors. *Gene Ther* 7(10): 852-858, 2000a.

Guo, W und Giancotti, FG; Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 816-826, 2004.

Hall, EJ und Giaccia, AJ; *Radiobiology for the Radiologist*. 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.

Hanahan, D und Weinberg, RA; The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70, 2000.

Heilmann, J, Taucher-Scholz, G, Haberer, T, Scholz, M, Kraft, G; Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34(3): 599-608, 1996.

Hood, JD und Cheresch, DA; Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2(2): 91-100, 2002.

Hovinga, KE, Stalpers, LJ, van, BC, Donker, M, Verhoeff, JJ, Rodermond, HM, Bosch, DA, van Furth, WR; Radiation-enhanced vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in glioblastoma multiforme cell lines--a clue to radioresistance? *J Neurooncol* 74(2): 99-103, 2005.

Hynes, RO; Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6): 673-687, 2002.

Irie, HY, Pearline, RV, Grueneberg, D, Hsia, M, Ravichandran, P, Kothari, N, Natesan, S, Brugge, JS; Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 171(6): 1023-1034, 2005.

Jones, PF, Jakubowicz, T, Pitossi, FJ, Maurer, F, Hemmings, BA; Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(10): 4171-4175, 1991.

Koolman, J und Röhm, K-H; *Taschenatlas der Biochemie*. 2. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.

Kraft, G; Radiotherapy with heavy ions: radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt. *Tumori* 84(2): 200-204, 1998.

Kraft, G; Tumor therapy with heavy charged particles. *Progress in Particle and Nuclear Physics* 45(Supplement 2): S473-S544, 2000.

Kraft, G; Tumorthherapie mit schweren Ionen. Verein zur Förderung der Tumorthherapie mit schweren Ionen e.V., Darmstadt, 2005.

Lauffenburger, DA und Horwitz, AF; Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3): 359-369, 1996.

Li, N, Zhang, Y, Naylor, MJ, Schatzmann, F, Maurer, F, Wintermantel, T, Schuetz, G, Mueller, U, Streuli, CH, Hynes, NE; Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J* 24(11): 1942-1953, 2005.

Lu, KV, Jong, KA, Kim, GY, Singh, J, Dia, EQ, Yoshimoto, K, Wang, MY, Cloughesy, TF, Nelson, SF, Mischel, PS; Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem* 280(29): 26953-26964, 2005.

Ludwig, T; Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *Bioessays* 27(11): 1181-1191, 2005.

Manning, BD und Cantley, LC; AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7): 1261-1274, 2007.

Meineke, V, Gilbertz, KP, Schilperoort, K, Cordes, N, Sandler, A, Moede, T, Van Beuningen D.; Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression and adhesion of COLO-320 cells to collagen and fibronectin in vitro. *Strahlenther Onkol* 178(12): 709-714, 2002.

Melchiori, A, Mortarini, R, Carlone, S, Marchisio, PC, Anichini, A, Noonan, DM, Albini, A; The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion. *Exp Cell Res* 219(1): 233-242, 1995.

Mueller, S, Cadenas, E, Schonthal, AH; p21WAF1 regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression. *Cancer Res* 60(1): 156-163, 2000.

NeuroProbe Inc.; Produktkatalog, Gaithersburg, MD, 2003.

Ogata, T, Teshima, T, Kagawa, K, Hishikawa, Y, Takahashi, Y, Kawaguchi, A, Suzumoto, Y, Nojima, K, Furusawa, Y, Matsuura, N; Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. *Cancer Res* 65(1): 113-120, 2005.

Osaki, M, Oshimura, M, Ito, H; PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9(6): 667-676, 2004.

Park, CM, Park, MJ, Kwak, HJ, Lee, HC, Kim, MS, Lee, SH, Park, IC, Rhee, CH, Hong, SI; Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res* 66(17): 8511-8519, 2006.

Paulus, W, Baur, I, Beutler, AS, Reeves, SA; Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest* 75(6): 819-826, 1996.

Pu, P, Kang, C, Li, J, Jiang, H; Antisense and dominant-negative AKT2 cDNA inhibits glioma cell invasion. *Tumour Biol* 25(4): 172-178, 2004.

Pu, P, Kang, C, Li, J, Jiang, H, Cheng, J; The effects of antisense AKT2 RNA on the inhibition of malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. *J Neurooncol* 76(1): 1-11, 2006.

Robert Koch-Institut; Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeit und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, 2008.

Rofstad, EK, Mathiesen, B, Galappathi, K; Increased metastatic dissemination in human melanoma xenografts after subcurative radiation treatment: radiation-induced increase in fraction of hypoxic cells and hypoxia-induced up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer Res* 64(1): 13-18, 2004.

Schirner, M, Herzberg, F, Schmidt, R, Streit, M, Schoning, M, Hummel, M, Kaufmann, C, Thiel, E, Kreuser, ED; Integrin alpha5beta1: a potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin Exp Metastasis* 16(5): 427-435, 1998.

Schulz-Ertner, D, Jakel, O, Schlegel, W; Radiation therapy with charged particles. *Semin Radiat Oncol* 16(4): 249-259, 2006.

Schulz-Ertner, D, Karger, CP, Feuerhake, A, Nikoghosyan, A, Combs, SE, Jakel, O, Edler, L, Scholz, M, Debus, J; Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68(2): 449-457, 2007a.

Schulz-Ertner, D, Nikoghosyan, A, Hof, H, Didinger, B, Combs, SE, Jakel, O, Karger, CP, Edler, L, Debus, J; Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67(1): 171-177, 2007b.

Stambolic, V und Woodgett, JR; Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 16(9): 461-466, 2006.

Statistisches Bundesamt; Todesursachen in Deutschland 2004. Fachserie 12 / Reihe 4. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2005.

Takahashi, Y, Teshima, T, Kawaguchi, N, Hamada, Y, Mori, S, Madachi, A, Ikeda, S, Mizuno, H, Ogata, T, Nojima, K, Furusawa, Y, Matsuura, N; Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose. *Cancer Res* 63(14): 4253-4257, 2003.

Tannock, IF, Hill, RP, and Bristow, RG; *The Basic Science of Oncology*. 4th Edition. Tannock, Ian F. und Hill, Richard P., McGraw-Hill, Inc., New York, 2005.

Toker, A und Newton, AC; Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275(12): 8271-8274, 2000.

Toker, A und Yoeli-Lerner, M; Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 66(8): 3963-3966, 2006.

van der Flier, A und Sonnenberg, A; Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305(3): 285-298, 2001.

Waldman, T, Kinzler, KW, Vogelstein, B; p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55(22): 5187-5190, 1995.

Wedlich, D; *Cell Migration in Development and Disease*. Wedlich, D., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

Wick, W, Wagner, S, Kerkau, S, Dichgans, J, Tonn, JC, Weller, M; BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440(3): 419-424, 1998.

Wick, W, Wick, A, Schulz, JB, Dichgans, J, Rodemann, HP, Weller, M; Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res* 62(6): 1915-1919, 2002.

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

Wouters, BG, Giaccia, AJ, Denko, NC, Brown, JM; Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res* 57(21): 4703-4706, 1997.

Zhang, W, Anker, L, Law, RE, Hinton, DR, Gopalakrishna, R, Pu, Q, Gundimeda, U, Weiss, MH, Couldwell, WT; Enhancement of radiosensitivity in human malignant glioma cells by hypericin in vitro. *Clin Cancer Res* 2(5): 843-846, 1996.

Zingg, D, Riesterer, O, Fabbro, D, Glanzmann, C, Bodis, S, Pruschy, M; Differential activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt survival pathway by ionizing radiation in tumor and primary endothelial cells. *Cancer Res* 64(15): 5398-5406, 2004.