

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen
Abteilung Radioonkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg
Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung
Leiter: Professor Dr. H. P. Rodemann

**Untersuchungen zum Einfluss des Strahlenprotektors
Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor auf die
Signaltransduktionskaskade der SAPK**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jasmin Susann Hermann
aus Stuttgart**

2004

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Professor Dr. C. D. Claussen

Professor Dr. H. P. Rodemann

Professor Dr. C. Garbe

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Die Strahlenexposition des Menschen	6
1.2	Die Strahlenantworten der Zelle	8
1.2.1	UV-induzierte Signaltransduktionskaskade.....	10
1.3	Radioprotektoren	11
1.3.1	Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor (BBI)	12
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	Material	15
2.1	Zellen.....	15
2.2	Chemikalien.....	15
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	15
2.4	Antikörper	16
2.5	Enzymaktivatoren und -inhibitoren	16
2.5.1	Aktivator	16
2.5.2	Inhibitoren	16
2.6	Lösungen, Puffer und Medien.....	17
2.6.1	Zellkultur	17
2.6.2	Fixier-und Färbelösungen	18
2.6.3	Elektrophorese-und Blottinglösungen	18
2.6.4	Sonstige Lösungen	19
2.7	Geräte.....	20
3	Methoden	21
3.1	Zellkultur	21
3.2	Bestrahlung	21
3.3	Proliferationskinetik	21
3.4	Klonogener Assay	22
3.4.1	BBI	22
3.4.2	Anisomycin	23
3.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Blotting.....	23
3.5.1	Probengewinnung	23

3.5.2	Bestimmung der Proteinmenge.....	24
3.5.3	PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese).....	24
3.5.4	Western Blot	26
3.5.5	Chemolumineszenz-Detektion	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Dosis-Wirkung-Kurve für UVB-Strahlung.....	28
4.2	Wirkung von BBI auf Fibroblasten	29
4.3	Einfluss von UVB-Strahlung auf die SAPK in Fibroblasten.....	32
4.4	Einfluss des Anisomycins auf Fibroblasten.....	33
4.4.1	Proliferationskinetik.....	34
4.4.2	Klonogener Assay	35
4.5	Einfluss einer Anisomycin-Präinkubation auf die klonogene Aktivität der Fibroblasten nach UVB-Bestrahlung	36
4.6	Einfluss von BBI auf die SAPK der Fibroblasten	39
5	Diskussion	43
5.1	Radiosensitivität der Fibroblasten.....	43
5.2	BBI als Strahlenprotektor.....	43
5.3	UVB-Strahlung und SAPK	44
5.4	Wirkung von Anisomycin auf Fibroblasten.....	46
5.5	Einfluss einer SAPK-Aktivierung auf die Strahlen-sensitivität von Fibroblasten.....	48
5.6	Einfluss des BBI auf die SAPK	48
5.7	Schlussfolgerung	54
6	Zusammenfassung.....	56
7	Literaturverzeichnis	57
8	Abkürzungen	64

1 Einleitung

1.1 Die Strahlenexposition des Menschen

Der Mensch ist im Laufe seines Lebens unterschiedlichster Strahlung ausgesetzt. Diese Strahlung ist einerseits natürlichen Ursprungs, wie kosmische, terrestrische und die von der Sonne emittierte elektromagnetische Strahlung, und andererseits künstlichen Ursprungs, wie zum Beispiel die in der Medizin, im Haushalt, in Technik und Forschung angewandte Strahlung.

Diese Strahlung kann für den Menschen gleichermaßen Nutzen wie auch erhebliche Gefahren mit sich bringen. In der Medizin können beispielsweise einige Tumore strahlentherapeutisch behandelt werden. Gleichzeitig kann jedoch das den Tumor umgebende gesunde Gewebe im Rahmen der Behandlung nachhaltig geschädigt werden, wie es sich bei der Fibrosierung des gesunden Lungengewebes im Rahmen einer therapeutischen Bestrahlung eines Lungenkarzinoms zeigen kann.

Eine natürliche Strahlungsquelle, die für den Menschen besonders relevant ist, ist die Sonne. Die von ihr ausgehende elektromagnetische Strahlung wird nach Wellenlänge und Frequenz in unterschiedliche Bereiche eingeteilt:

- Infrarote Strahlung im Wellenbereich 1000-780 nm,
- sichtbares Licht im Wellenbereich von 780- 400 nm,
- ultraviolettes Licht A im Wellenbereich von 400-315 nm,
- ultraviolettes Licht B im Wellenbereich von 315-280 nm und
- ultraviolettes Licht C im Wellenbereich von 280 bis 100 nm.

Hierbei haben vor allem die UVA- und UVB-Strahlung biologische Relevanz für den Menschen, da sie von der Atmosphäre gar nicht (UVA) beziehungsweise nur teilweise (UVB) abgeschirmt werden und die menschliche Haut in unterschiedlichem Ausmaß penetrieren.

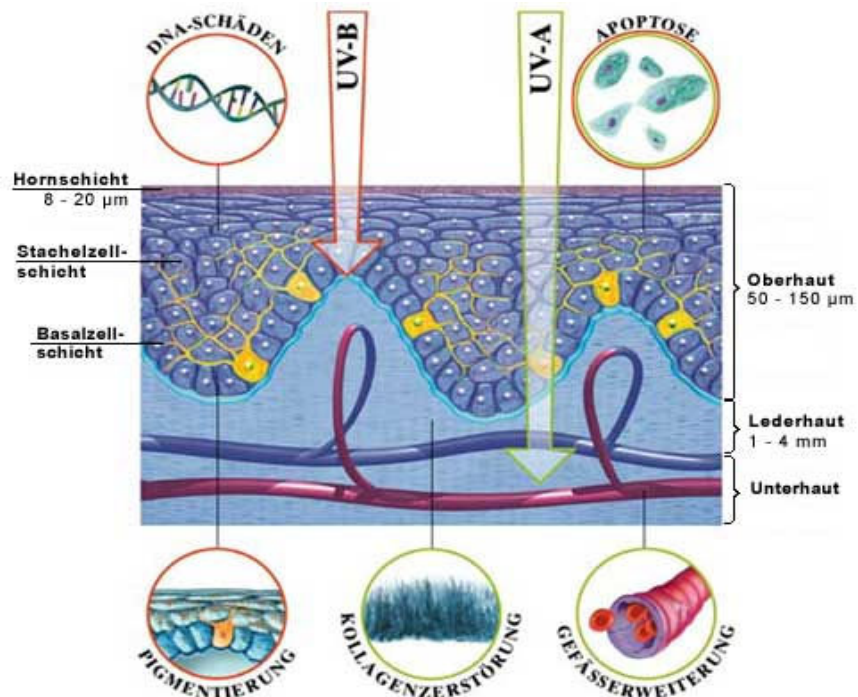


Abb.1: Schematische Darstellung der Haut. UVA- und UVB-Strahlung unterscheiden sich in der Eindringtiefe und in einigen ihrer Folgen für die Haut. Quelle: www.unsererahut.de

Als Folge einer Bestrahlung der Haut laufen unterschiedlichste Reaktionen ab: Als positiver Effekt ist hier der Einfluss der Strahlung auf den Vitamin-D₃-Stoffwechsel der Haut zu nennen, der zur Vorbeugung einer Rachitis von Bedeutung ist (Holick et al., 1980). Auch die Pigmentierung der Haut als Schutz vor sonneninduzierter Hautkrebsentstehung (Gilchrest, 1996) stellt einen positiven Effekt der Sonnenstrahlung dar.

Ein negativer Effekt der UV-Strahlung kann neben der Initiierung von DNA-Schäden eine lokal und systemisch immunsuppressive Wirkung sein, wodurch wichtige Schutzmechanismen ausgeschaltet werden und somit die Entstehung von Hautkrebs begünstigt wird (Ananthaswamy and Pierceall, 1990). Weiterhin kann UVB-Strahlung auch zu Haut-Erythemen (Pentland et al., 1990) und vorzeitiger Hautalterung (Fisher et al., 1996) führen.

UVB-Strahlung ist unter anderem zu über 90% für Hautkrebs verantwortlich (Mukhtar et al., 1995). Die Zahl der Hautkrebskranken steigt derzeit deutlich an. Etwa alle fünf Jahre verdoppelt sich die Inzidenz des malignen Melanoms. In Deutschland kommen auf 100.000 Einwohner jährlich 12 Neuerkrankungen an

malignem Melanom, 25 an Plattenepithelkarzinom und 80 an Basalzellenkarzinom. Auch die Letalität des Hautkrebses nimmt zu. Pro Jahr sterben über 3.000 Menschen daran. Weltweit ist es die am häufigsten auftretende Krebsart.

Mit der zunehmenden Zerstörung der Ozonschicht der Stratosphäre erreicht immer mehr Strahlung mit mutagenem Potenzial die Erde. Bereits heute wurde der UV-Filter der Atmosphäre um nahezu 20 Prozent geschwächt und in jedem weiteren Jahr nimmt er um zusätzliche 0,5 Prozent ab.

Angesichts dieser Tatsachen gewinnt in den letzten Jahren vor allem die Ausschaltung beziehungsweise größtmögliche Minimierung der Gefahren und somit eine Maximierung des Nutzens der Strahlung durch sogenannte Radioprotektoren zunehmend an Interesse.

Um die Wirkungsweisen solcher Radioprotektoren zu verstehen und möglicherweise regulierend in durch Strahlung hervorgerufene Zellreaktionen einzugreifen, ist es zunächst von Interesse, die Strahlenantwort von Zellen zu betrachten.

1.2 Die Strahlenantworten der Zelle

Zellen reagieren auf UV-Bestrahlung wie auf jedes andere schädigende Agens in unterschiedlichster Weise. Dabei können zum Beispiel durch Strahlung entstandene Schäden von der Zelle repariert werden oder es kommt, ist die Reparatur nicht möglich, zur Einleitung der Apoptose, das heißt des programmierten Zelltodes, oder zum Absterben der Zellen im Sinne einer Nekrose (Kerr und Harmon 1991). Eine weitere Möglichkeit der Zelle, auf Bestrahlung zu reagieren, ist die frühzeitige terminale Differenzierung (Rodemann et al., 1991). Außerdem sind Strahlenschäden für die Karzinogenese der Zelle von Bedeutung.

Diese unterschiedlichen Antworten kommen dadurch zustande, dass eine Zelle hinsichtlich Ihrer Reaktion nicht nur die Art des jeweils auftreffenden schädigenden Agens berücksichtigt, sondern auch die Situation in der sie sich aktuell befindet beziehungsweise Einflüsse, die sie zusätzlich zu der

Schädigung erfahren hat. Man muss also, um Zellantworten zu verstehen, die Zelle, ihren aktuellen Zustand und sämtliche äußeren Einflüsse als ein komplexes System untersuchen.

Die molekularen Mechanismen, die diesen Reaktionen innerhalb eines solchen Systems zugrunde liegen, sind kompliziert und vielfältig und noch lange nicht vollständig verstanden. Bisherige Einblicke in die molekularen Strahlungsreaktionen der Zellen zeigen, dass Strahlung verschiedene Veränderungen wie dauerhafte DNA-Schäden, Zellzyklus-Verzögerung und die Aktivierung bestimmter Reparaturmechanismen bewirkt.

Diese Veränderungen können zum Beispiel auf direktem Wege initiiert werden. Dabei entstehen durch Strahlung Radikale, die mit der DNA interagieren und zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen. Daraufhin kann es zur Aktivierung einer DNA-Proteinkinase (Andersen 1993) kommen, was unter anderem die Aktivierung von TP53 zur Folge hat (Cox et al 1996). Das TP53 spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Schadenskontrolle der Zelle (Lane et al., 1992; Kinzler et al., 1996; Smith et al., 1996). Die Aktivierung von TP53 führt zum Zellzyklusarrest in der Zellzyklusphase G1 oder G2 (Agarwal et al., 1995). In dieser Zeit können DNA-Schäden repariert (Kastan et al. 1994; Kuerbitz et al., 1992) oder der Zelltod eingeleitet werden (Clarke et al., 1993; Lowe et al. 1993a). Neben dem TP53 werden noch eine Vielzahl anderer Substrate wie SP1, Fos, Jun und Myc aktiviert, die ihrerseits Einfluss auf die Aktivierung und Regulation von Genprogrammen nehmen, die unter anderem für Reparaturprozesse oder Apoptose verantwortlich sind.

Eine weitere Möglichkeit der Zelle, kernunabhängig innerhalb dieses Systems auf Strahlung zu reagieren ist, sogenannte Signaltransduktionskaskaden im Zytoplasma in Gang zu setzen. Dies geschieht durch die Aktivierung eines membranständigen Rezeptors, über den das Strahlungssignal in die Zelle geleitet wird. Dabei ist eine Phosphorylierung des Membranrezeptors an einer definierten Stelle gleichbedeutend mit seiner Aktivierung (Knebel et al., 1996).

1.2.1 UV-induzierte Signaltransduktionskaskade

Im Falle von UV-Strahlung haben bisherige Untersuchungen gezeigt, dass solche Rezeptoren Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie der „epidermal growth factor receptor (EGF) (Sachsenmaier et al., 1994) ebenso wie membranständige Cytokin-Rezeptoren (Rosette et al., 1996) sein können. Durch eine Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung von Ras (Derijard et al., 1994; Weiss et al., 1997), einem molekularen Schalter der Zelle. Von Ras können unter anderem der Signalweg der MAPK (mitogen-activated kinase) und somit seine Untergruppen, die ERK's (extracellular regulated kinases) (Price et al. 1996), SAPK (stress activated protein kinase) (Derijard et al. 1994) und p38 (Wang et al., 1996) getriggert werden.

Dabei ist vor allem eine SAPK-Aktivierung in Zusammenhang mit UV-Strahlung zu nennen. Eine solche Aktivierung findet auch durch andere Arten von Zellstress wie Hitze, osmotischer Schock, den Tumor Nekrose Faktor alpha und ionisierende Strahlung statt (Derijard et al, 1994; Kallunki et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Westwick et al., 1994; Gupta et al., 1995; Adler et al., 1996; Chen et al., 1996). Letztlich werden durch diese Signaltransduktion Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Jun-Fos-Dimer) (Devary et al., 1992), SRF (serum responsive factor) (Sachsenmaier et al., 1994) und NF-kappa-B (Devary et al., 1993) aktiviert. Die Aktivierung des AP-1 findet durch eine Phosphorylierung an spezifischer Serinen (63 und 73) (Pulverer et. al., 1991) des c-jun (Derijard et al., 1994) durch die c-jun-N-terminale Kinase (SAPK) statt. Außerdem kommt es über Ras zur Phosphorylierung des TP53-Proteins (Fuchs et al., 1998). Der Weg zu dieser TP53-Phosphorylierung kann über die SAPK-Kaskade führen (Fuchs et al., 1998).

Die biologischen Antworten der Zelle, die durch die Signaltransduktionskaskade der SAPK vermittelt werden, sind sehr unterschiedlich. So kann es zu einem Zellzyklusarrest kommen. Auch Programme zur Reparatur oder zur Apoptose der Zelle können eingeleitet werden (Xia et al., 1995). Zum Beispiel schützt das von der aktivierten SAPK phosphorylierte c-jun Zellen vor dem Zelltod und kooperiert mit NF-kappa-B, um der Apoptose der Zelle vorzubeugen, die durch den Tumor Nekrose Faktor alpha induziert würde (Wisdom et al. 1999). C-jun

schützt ebenfalls menschliche Tumorzellen vor Apoptose, die durch DNA-Schäden verursacht wurden (Potapova et al. 2001). Außerdem sind SAPK zum einen mit Zell-Überleben bei UV-Bestrahlung (Devary et al., 1992) und zum anderen mit Zell-Tod bei Gamma-Bestrahlung (Chen et al., 1996) in Zusammenhang gebracht worden.

An diesen Beispielen zeigt sich, welche vielfältigen Strahlungsreaktionen durch An- und Ausschalten solcher Kaskaden möglich sind.

1.3 Radioprotektoren

Aus strahlentherapeutischer Sicht stellt sich nun die Frage, ob es Möglichkeiten gibt, strahleninduzierten Signaltransduktionswege zu beeinflussen, um die Zellantwort in einer gewünschten Richtung manipulieren zu können. Substanzen mit radioprotektiver Wirkung liefern erste Ansätze dazu, denn sie sind in der Lage in solche Abläufe einzugreifen und der Zelle ein verbessertes Überleben nach Bestrahlung zu ermöglichen.

Die genauen, dieser schützenden Eigenschaft zugrundeliegenden Mechanismen, sind bisher jedoch nur zum Teil erforscht. Die bekannten Radioprotektoren lassen sich in 4 Gruppen einteilen.

- Zur Gruppe der *Radikalfänger* zählen die zellulären Thiole (Littlefield et al., 1993) und Vitamine (Yoshimura et al., 1993, Rana et al., 1993). Ihnen ist es möglich, eine Schädigung zellulärer Moleküle durch strahleninduzierte Radikale zu verhindern.
- Die zweite Gruppe ist die *der Zytokine und Wachstumsfaktoren*. Einige dieser Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF zeigen je nach Zelltyp und Versuchsansatz einerseits einen radioprotektiven (Howard et al., 1995) und andererseits einen sensitivierenden (Bonner et. al., 1994; Howard et al., 1995) Effekt. Andere Substanzen zeigen nur in bestimmten Zellsystemen radioprotektive Eigenschaften. Aufgrund dieser Unterschiede wird von einem Einsatz solcher Substanzen zur Radioprotektion eher abgesehen.

- Eine weitere Gruppe ist die der *Entzündungsmediatoren*, wie z.B. Glukokortikoide, die in der Lage sind die Akutreaktion des Gewebes nach Bestrahlung zu modulieren.
- Die vierte Stoffklasse der Radioprotektoren ist die der *Proteaseinhibitoren*. Neben dem Chymotrypsininhibitor (Billings et al., 1987) und Papain (Kennedy et al., 1981) gehört der aus der Sojabohne stammende Bowman-Birk Proteaseinhibitor (BBI) (Kennedy et al., 1981, Yavelow et al., 1985).

1.3.1 Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor (BBI)

Bei dem Bowman-Birk Proteinase Inhibitor handelt sich um eine Polypeptid aus 71 Aminosäuren, das über 7 Disulfidbrücken eine kompakte Tertiärstruktur bildet. Das Molekül besitzt zwei aktive Zentren aus jeweils zwei 9-Aminosäuren enthaltenden Ringen, die für die chymotrypsin- beziehungsweise trypsin-inhibitorische Wirkung als notwendig beschrieben sind (Maeder et al., 1992).

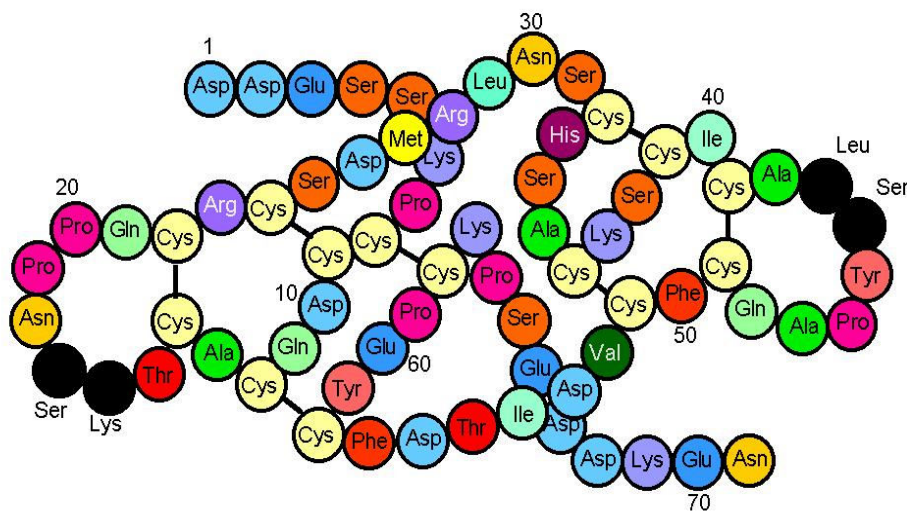


Abb.2: BBI-Polypeptid aus 71 Aminosäuren

BBI besitzt eine antikarzinogene Wirkung, die sowohl in vitro (St. Clair 1991, Billings et al., 1997) als auch in vivo im Tiermodell (von Hofe et al., 1991, Billings et al 1990) nachgewiesen werden konnte. Es schützt zum Beispiel vor strahleninduzierter Karzinogenese (Kennedy AR, 1994). Seine radioprotektive Wirkung vermittelt es einerseits durch Zunahme der Strahlen-Widerstandsfähigkeit der Zellen und somit Erhöhung der klonogenen Aktivität und andererseits durch eine Abnahme der Apoptose und der terminalen Differenzierung der Fibroblasten nach Bestrahlung (Dittmann et al., 1995). Da BBI diese schützende Wirkung allerdings nur auf normale, nicht aber auf transformierte Fibroblasten ausübt (Dittmann et al. 1995), ist der molekulare Wirkmechanismus, der dem zugrunde liegt, von großem Interesse. Bekannt ist, dass die radioprotektive Eigenschaft des BBI nicht in Zusammenhang mit seiner antitrypsin/antichymotrypsin-inhibitorischen Wirkung (Güven et al., 1998a) steht, denn es konnte gezeigt werden, dass ein von BBI abstammendes Nonapeptid, das keine derartige proteaseinhibitorische Potenz mehr besitzt, ebenfalls radioprotektive Wirkung aufweist (Güven et al., 1998a). Es zeigt sich, dass durch BBI-Präinkubation der Zellen eine EGF-Rezeptor Aktivierung stattfindet (Güven et al. 1998b). Außerdem lässt sich nach einer BBI-Präinkubation eine TP53-Phosphorylierung und Erhöhung der TP53-Proteinmenge (Dittmann et al., 1998b) nachweisen. Letztlich werden die TP53-induzierbaren Reparaturgene Gadd45 (Z), p21(Z) und ERCC3(Z) beeinflusst. Für alle drei Gene findet sich eine erhöhte Transkription und ein entsprechend erhöhter Nachweis der Proteine nach BBI-Präinkubation (Dittmann et al., 1998b).

Diese Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass BBI die strahleninduzierte Signaltransduktion modulieren kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Durch Strahlung wird eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden induziert. Bisher ist es jedoch nur teilweise gelungen, solche Kaskaden zu identifizieren und ihnen die damit verknüpften biologischen Reaktionen der Zelle zuzuordnen. Die strahlenprotektive Substanz BBI ist wahrscheinlich in der Lage eine solche strahleninduzierbare Signaltransduktionskaskade zu beeinflussen. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Signaltransduktionswege der radioprotektive Bowman-Birk Protease Inhibitor beeinflusst. Wäre die Wirkungsweise des BBI bekannt, könnte möglicherweise einer derjenigen Signaltransduktionswege identifiziert werden, dessen Aktivität zur zellulären Radioprotektion notwendig ist. Da BBI seine radioprotektive Eigenschaft nur auf Normalgewebe und nicht auf Tumorgewebe ausübt und die Anwendung des BBI im Tiermodell außer einer erhöhten Funktion der Bauchspeicheldrüse (Oreffo et al., 1991; Madar et al., 1974) keine Nebenwirkungen zeigt, ist ausgehend von diesen Erkenntnissen außerdem ein Einsatz des BBI in der strahlentherapeutischen Klinik denkbar. Durch seine Anwendung könnten zum Beispiel die erheblichen Nebenwirkungen einer Strahlentherapie auf Normalgewebe vermindert und somit Schutz auf das den Tumor umgebende dosislimitierende Gewebe ausgeübt werden. Hinsichtlich der zunehmenden Gefahren, die die verstärkte Sonneneinstrahlung mit sich bringt, wäre ebenfalls ein Einsatz des BBI als strahlenprotektive Substanz im Alltag denkbar.

2 Material

2.1 Zellen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich an diploiden menschlichen Hautzellen durchgeführt. Sie entstammen dem Hautfibroblastenstamm HSF1 aus der Leistengegend eines Kleinkindes und sind in der Sektion für Strahlenbiologie der Universität Tübingen etabliert worden.

2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt stammten alle verwendeten Chemikalien von den Firmen GibcoBCL, Seromed, Merck, Sigma, Roth, Boehringer Mannheim und Bio Rad.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Zellkulturmaterialien	Falcon
Nitrozellulosemembran OPTITRAN BA-S 83	Schleicher & Schuell
Filterpapier GB 002	Schleicher & Schuell
Cell Scraper	Costar
Curix HC1.000 Röntgenfilm	AGFA
Molekulargewichtsmarker, 10 kDA Protein-Ladder	GIBCO BCL
Pyruvat Kinase (Pre stain)	Sigma
ECL (Detektion Kit)	Amersham

2.4 Antikörper

Zur Detektion der untersuchten Antigene sind folgende Antikörper verwendet worden:

Antigen	Antikörper	Firma	Verdünnung in Blockingpuffer	Art
Ph-SAPK	#9251S	Biolab	1 : 1000 1 : 500	Kaninchen polyclonal
Gesamt-SAPK	#9252S	Biolab	1 : 1000	Kaninchen polyclonal
Anti-Rabbit IgG	A 9919	SIGMA	1 : 10000	alkal. Phosphatase konjugiert
Anti-Rabbit IgG		Amersham	1 : 1000 1 : 2000	HR-Peroxidase konjugiert

2.5 Enzymaktivatoren und -inhibitoren

2.5.1 Aktivator

der SAPK (stress activated protein kinase). Es liegt als weiße kristalline Substanz vor. Für Versuchszwecke wurde es in DMSO gelöst und mit Aqua bidest die benötigten Verdünnungen hergestellt. Die Substanz wurde von der Firma Calbiochem **Anisomycin** entstammt den *Streptomyces griseolus* und ist ein starker Aktivator (Katalog-Nr. 176880) bezogen.

2.5.2 Inhibitoren

Der **Bowman-Birk-Protease-Inhibitor** (BBI) der Firma SIGMA wurde in PBS gelöst und in einer Konzentration von 10µM eingesetzt.

Der im Lysepuffer verwendete „**Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II**“ (SIGMA) wurde in einer Verdünnung von 1 : 1000 angewandt. Er enthielt folgende Bestandteile: Natriumvanadat, Natriummolybdat, Natriumtartrate und Imidazol.

Das **Natrium Vanadat** der Firma SIGMA ist ebenfalls ein Phosphatase-Inhibitor, der zusätzlich zum Phosphatase-Inhibitor-Cocktail in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt wurde.

Außerdem wurden dem Zellysepuffer als Proteaseinhibitoren **PMSF** (Phenylmethylsulfonylfluorid) und **Pefabloc SC** (Firma Roth) in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt.

2.6 Lösungen, Puffer und Medien

2.6.1 Zellkultur

- *Kulturmedium*

Zur Herstellung des Mediums wurden 12,04 g DMEM, 3,7 g NaHCO₃, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin in einem Liter Aqua bidest gelöst. Nach der Sterilfiltration wurde das Medium mit 10% fötalem Kälberserum (Boehringer) versetzt.

- „*Phosphate-buffered-Saline*“ (PBS)

Zur Herstellung des PBS wurden in 1000 ml destilliertem Wasser 0,8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g NaHPO₄ und 0,2 g KH₂PO₄ gelöst. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

- *Trypsinlösung:*

0,25 % Trypsinstammlösung wurde 1:5 oder 1:10 mit PBS verdünnt.

- *DAPI-Stammlösung:*

5 µg Diamidino-2-phenylindol/ ml Methanol

2.6.2 Fixier-und Färbelösungen

- *Formaldehydlösung (3,7%):* 37%iges Formaldehyd wurde 1:10 mit PBS verdünnt.
- *Coomassie-Blau-Lösung:* 200 ml Methanol, 75 ml Eisessig und 0,5 g Coomassie G250 wurde auf 1000 ml Wasser aufgefüllt.
- *Sörensen A:* 9,078 g KH_2PO_4 auf 1000 ml Wasser.
- *Sörensen B:* 11,876 g NaHPO_4 auf 1000 ml Wasser.
- *Giemsa-Färbelösung:* 38,8 ml Sörensen-A-Puffer, 61,2 ml Sörensen-B-Puffer und 4,0 ml Giemsa-Lsg. wurden gemischt.

2.6.3 Elektrophorese-und Blottinglösungen

- *Acrylamid-Lösung 30%ig (37,5:1):* 30 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid wurden in 100 ml Aqua bidest gelöst.
- *Trenngelpuffer (4x):* 18,17 g Tris base und 4 ml 10%iges SDS wurden auf 100 ml Wasser aufgefüllt und mit HCl auf pH 8,8 eingestellt.
- *Sammelgelpuffer:* 6,06 g Tris base und 4 ml 10%iges SDS in 100 ml Wasser auf pH 6,8 eingestellt.
- *10%ige SDS Stammlösung:* 50 g SDS in 500 ml Aqua bidest.
- *Probenpuffer:* SÄPU-Puffer:
2 ml Glycerol,
2 ml 10%iges SDS,
2,5 ml Sammelgel-Puffer,
0,5 ml Mercapto und
0,25 mg Bromphenolblau
wurde auf 10 ml Aqua bidest. aufgefüllt.

- *Laufpuffer (10x):* 0,5 M (30 g) Tris base,
3,8 M (144 g) Glycin und
100 ml 10% SDS
wurden in 1000 ml Wasser gelöst.
- *Transferpuffer:* Dieser bestand aus einem *Anoden-* und
einem *Kathoden-Puffer:*
Je 50 mM Borsäure (pH 9) mit
für die Anode: 20% Methanol
für die Kathode: 5% Methanol

2.6.4 **Sonstige Lösungen**

- *Lyse-Puffer:* Als Stammlösung wurde verwendet:
150 mM NaCl,
50 mM Tris base,
20 mM Glycerophosphat,
0,5% Triton-X,
0,5% NP-40
gelöst in Wasser und auf pH 7,4 eingestellt.
Frisch zugegeben wurde :
10 mM NaF,
1 mM DTT,
1 mM PefaBlock,
Phosphatase Inhibitor Cocktail II,
1:500 Orthovanadat (gesättigte Lösung) und
1:1000 PMSF (gesättigte Lösung)
- *Blocking-Puffer:* 5% Milchpulver (Rapolait) in PBS
- *Waschpuffer:* 0,1% Tween-20 in PBS
- *POX-Detection-Kit:* ECL-Western-Blotting-System (Amersham)
- *CSPD:* 1,2 Dioxetan Chemolumineszenz-Substrat für
alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim)

2.7 Geräte

Brutschrank:	Haereus 6000
Sterilbank:	BDK, Luftraum-Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl
UV-Lampe	<p>Es wurde eine UV-Lampe der Firma Bioblock Scientific verwendet. Diese Lampe ist mit zwei 6 Watt UV-Röhren, eine für UVA-Strahlung (365 nm) und eine für UVB-Strahlung (312 nm) ausgestattet. Vor jeder Bestrahlung wurde die Energiedosis mittels des Kompaktdosimeters RM21 (Dr.Göbel, UV-Elektronik GmbH, Ettlingen) neu ermittelt. Die Bestrahlung fand in einem Abstand von 10 cm statt.</p> <p>Die UVC-Bestrahlung fand unter der Sterilbank direkt unterhalb des Quecksilber Niederdruckstrahlers statt. Vor der Bestrahlung wurde mittels des Kompaktdosimeters die Energiedosis bestimmt. Der Abstand zur Lampe bei Bestrahlung betrug 20 cm.</p>
Elektrophoresekammer:	SE 600 SERIES Electrophoresis Unit, Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco mit Glasplatten von Pharmacia Biotech
Semi-dry Blotting-Apparatur:	Semi-Phor, Hoefer Sientific Systems
Elisa-Reader:	anthos htll, anthos labtec instruments

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die gesamte Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden sämtliche Lösungen und Puffer mittels Druckfiltration über sterile Membranfilter (0,2 µm Zelluloseacetatfilter) filtriert oder autoklaviert und in sterilen Flaschen bei 4°C aufbewahrt. Vor ihrer Verwendung wurden die Lösungen im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kultur der Hautfibroblasten (HSF1) wurde bei 37°C und 6,8% CO₂ in wasserdampfgesättigten Brutschränken durchgeführt. Die Zellen wurden einmal wöchentlich passagiert. 4 Stunden nach der Passage fand ein Mediumwechsel statt.

Zellpassage: zur Zellpassage wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin von dem Zellkulturgefäß gelöst. Die Zellen wurden dann mit einer Glaspipette vereinzelt und konnten je nach Bedarf wieder ausgesät werden.

3.2 Bestrahlung

Nach entsprechender versuchsabhängiger Vorbehandlung der Zellen wurden die konfluenten Zellen mit einer Dosis von 200 J/m² UVB-Strahlung der Wellenlänge 312 nm bzw. 30 J/m² UVC-Strahlung bestrahlt. Dazu wurden die adhärenen Zellen zunächst mit PBS (37°C warm) gewaschen, dann bestrahlt und mit dem konditionierten Medium wieder in den Brutschrank überführt.

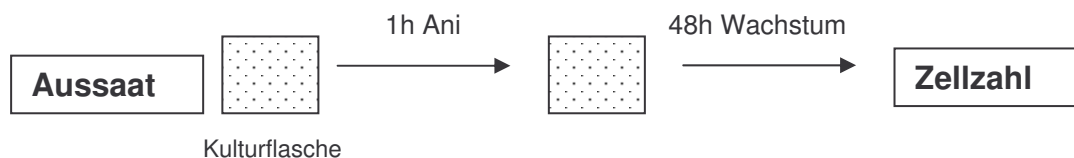
3.3 Proliferationskinetik

Als Analyseparameter diente die Zellzahl. Damit war es möglich, den Einfluss von Anisomycin auf die Zellproliferation zu testen. Die Untersuchung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Nach subkonfluenter Aussaat einer gleichen Anzahl an Zellen in T-25-Flaschen, wurde einen Tag später für eine Stunde der Enzymaktivator Anisomycin in unterschiedlichen Konzentrationen in das Medium gegeben. Nach dieser einstündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen

und für weitere 48 h mit frischem Medium kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen abtrypsiniert, vereinzelt und mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer konnte die Zellzahl bestimmt werden.

Schematische Darstellung:



Versuchsaufbau zur Bestimmung der Proliferationskinetik der HSF bei Anisomycinbehandlung (Ani)

3.4 Klonogener Assay

Die Bestimmung der klonogenen Aktivität ist ein Maß der Zellvitalität nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Chemikalien oder sonstigen physikalischen Stimuli. Für die Bestimmung der klonogenen Aktivität nach Bestrahlung in Kombination mit BBI bzw. Anisomycin galt:

3.4.1 BBI

Den in $3,7 \text{ cm}^2$ großen Schalen konfluent gewachsenen Zellen wurde BBI-Stammlösung in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt. Nach 16-stündiger BBI-Präinkubation folgte die UVB-Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 200 J/m^2 . Nach weiteren 8h wurden pro Bedingung 1500 Zellen in 10 cm große Petrischalen ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer. Das Medium enthielt 20% FCS. Nach 12 bis 14 Tagen Wachstumszeit konnten die Zellen fixiert und anschließend mit Coomassie-Blau und Giemsa-Lösung angefärbt werden. Unter dem Mikroskop konnte die Anzahl der entstandenen Klone ausgezählt werden und damit die klonogene Aktivität bestimmt werden. Nur Klone mit 10 und mehr Zellen kamen zur Auswertung. Pro Bedingung wurde dabei eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Fixierung: Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde für je 10 Minuten mit 3,7%iger Formaldehydlösung und 70%igem Ethanol fixiert.

Färbung: Zunächst 1-4 Minuten Färbung mit Coomassie-Blau und nach gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser, für eine weitere Stunde mit frisch angesetzter Giemsa-Lösung.

3.4.2 Anisomycin

Die Zellkulturbedingungen entsprachen dem klonogenen Assay mit BBI. Die Anisomycin-Vorbehandlung hatte eine Dauer von 1 Stunde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Bestrahlung wurde in der oben beschriebenen Weise durchgeführt. Alle weiteren Schritte nach der UVB-Bestrahlung sind mit Punkt 3.3.1 identisch.

3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Blotting

Die PAGE ist eine Methode, Proteine aus Zellextrakten in einem Acrylamidgel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dazu wird eine bestimmte Menge Protein mit einem speziellen Probenpuffer in dafür vorgesehene Geltaschen aufgetragen. Der SDS-haltige Probenpuffer überdeckt die Eigenladung der Proteine und verleiht der Probe eine negative Ladung. Das Acrylamidgel wird dann in einen Stromkreis eingebunden. Die Proteine wandern nun Richtung der Anode und werden entsprechend ihrem Molekulargewicht und der Porengröße des Gels aufgetrennt. Anschließend ist es möglich, die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu blotten, um sie mit entsprechenden Antikörpern zu detektieren. Mittels fluoreszierenden Zweitantikörpern können diese dann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. So ist es möglich, die Menge eines Proteins mit bekanntem Molekulargewicht zu beurteilen.

3.5.1 Probengewinnung

Die Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 70 µl des Lysepuffers wurden die Zellen auf Eis mit einem Cellscrapper von ihrer Unterlage abgekratzt. Zusätzlich wurde das Zellysat in einer Pipettenspitze durch mehrmaliges Aufziehen mechanisch zerkleinert. Nach 15-minütiger

Inkubation auf Eis wurde die Zellprobe bei 14.000 x g 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand konnte für die Gelelektrophorese verwendet werden.

3.5.2 Bestimmung der Proteinmenge

Um möglichst gleiche Mengen an Protein auf das Gel aufzutragen, wurde der Proteingehalt der Probe mittels des Bio-Rad-Systems bestimmt. Hierzu wurden je 3 µl der Proben mit je 25 µl der Lösung A (Lösung A= 20µl Lösung S in 1000µl Lösung C) und 200 µl der Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Extinktion der Proben mit einem Elisa-Reader gemessen. Durch gleichzeitiges Messen einer Eichreihe mit bekanntem Proteingehalt (BSA: 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml) wurde eine Eichkurve erstellt. Mit der Funktion $f(x)$ der Eichkurve konnte der Proteingehalt (x) der unbekanntenen Proben berechnet werden.

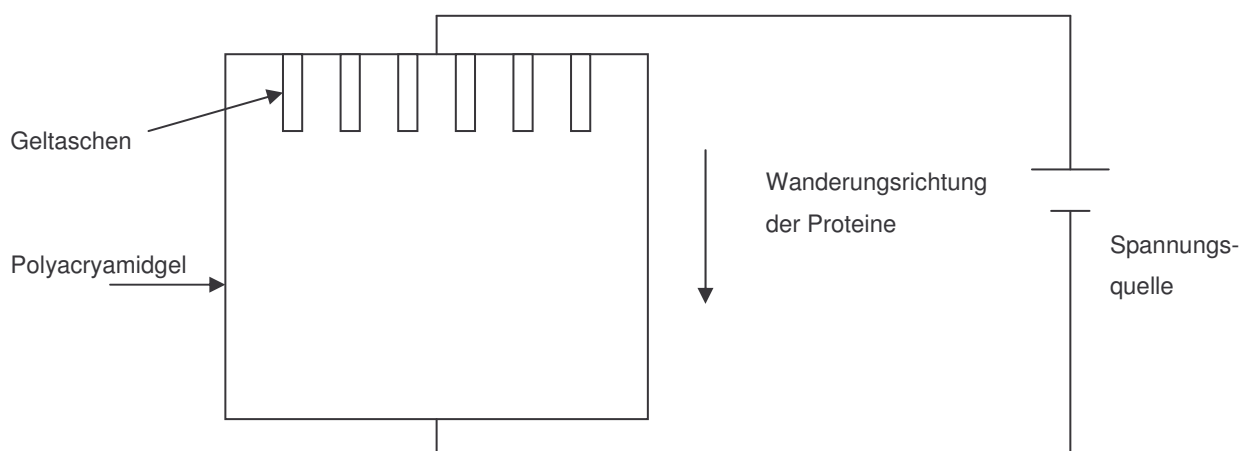
Funktion: $f(x) = ax+b$

$$\rightarrow x = (y-b)/a$$

Es wurden Proteinmengen zwischen 80 µg und 200 µg für die PAGE eingesetzt.

3.5.3 PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Der Versuchsaufbau einer PAGE sieht folgendermaßen aus:



Die Porengröße des Trenngels ist durch unterschiedlich wählbare Polyacrylamidgelkonzentrationen variabel. Je nach Gelkonzentrationen verändert sich dann das Auftrennungsverhalten der Proteine.

Für die Auftrennung der Proteine mit 46 kDa und 54 kDa wurden 15%ige beziehungsweise 12%ige Trenngele mit 4,5%igen Sammelgelen verwendet.

Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

Trenngel (z.B.15%): 5 ml Trenngel-Puffer,
 5 ml Wasser,
 10 ml Acrylamidsg.,
 100 µl APS (10%ig) und
 10 µl TEMED

Nach dem Einbringen des Trenngels in die Gießvorrichtung, wurde mit Isopropanol überschichtet und ca. 60 Minuten polymerisiert.

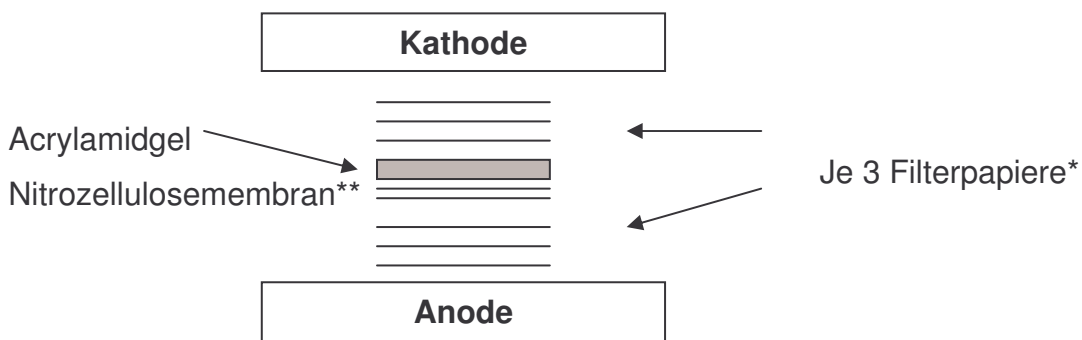
Sammelgel (4,5%): 1,25 ml Sammelgel-Puffer,
 3 ml Wasser,
 750 µl Acrylamidsg.,
 100µl APS und
 5µl TEMED.

Das Sammelgel wurde mit eingesetztem Kamm gegossen und ca. 30 Minuten polymerisiert. Vor dem Einbringen der Proben in das Gel wurde die benötigte Menge Protein mit Probenpuffer 1:4 versetzt, 5 Minuten gekocht und kurz zentrifugiert.

Nach Ausspülen der Geltaschen konnten die Proben eingebracht und die Apparatur mit dem eingefüllten Laufpuffer nach Vorschrift gestartet werden. Die Elektrophorese wurde mit 5 mA bis 7 mA über Nacht durchgeführt.

3.5.4 Western Blot

Mit einer semidry Blotting-Apparatur konnten die, von der PAGE aufgetrennten Proteine mittels elektrophoretischem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran überführt werden. Das Polyacrylamidgel wurde dazu zwischen je 3 mit den entsprechenden Puffern getränkte Filterpapiere gelegt. Zusätzlich befand sich zwischen den Filterpapieren der „Anodenseite“ und dem Gel eine Nitrocellulosemembran. Dieses „Sandwich“ wurde dann zwischen die Elektroden gelegt und bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ ca. 2h geblottet.



* Filterpapier wurde jeweils mit Anoden-bzw. Kathodenpuffer getränkt.

** Nitrozellulosemembran in Anodenpuffer getränkt.

3.5.5 Chemolumineszenz-Detektion

Um eine Detektion mit möglichst wenigen unspezifischen Bindungen zu ermöglichen, wurde die Nitrocellulosemembran zunächst 1h bei RT mit Blocking-Puffer inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation über Nacht mit dem primärem Antikörper bei 4°C . Der Blot wurde dann 3×10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss folgten eine weitere Inkubation mit dem entsprechenden spezifischen Sekundärantikörper für ca. 45 Minuten und ein erneuter Waschvorgang für 3×10 Minuten mit Waschpuffer. Abschließend wurde die Chemolumineszenz-Detektion durchgeführt.

Zwei Möglichkeiten standen zur Verfügung:

3.5.5.1 mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpern

Nach Verwendung eines mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers wurde der Blot mit einer frisch angesetzten Mischung der Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 für 5 Minuten benetzt. Nachdem er in Plastikfolie gelegt und die Luftblasen ausgestrichen worden waren, konnte ein Röntgenfilm zwischen 5 und 60 Minuten exponiert werden.

3.5.5.2 mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörpern

Als Sekundärantikörper wurden mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper verwendet. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde ein CSPD-Substratpuffer verwendet. Nach 5-minütiger Inkubation mit diesem Puffer wurde der Blot ohne Luftblasen in Plastikfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm bis zu 48 Stunden exponiert.

4 Ergebnisse

4.1 Dosis-Wirkung-Kurve für UVB-Strahlung

Die Strahlensensitivität von Zellen unterscheidet sich je nach verwendeter Strahlung beziehungsweise Zellstamm. Bei der in den folgenden Untersuchungen eingesetzten Strahlung handelte es sich um UVB-Strahlung der Wellenlänge 312 nm. Um die Wirkung unterschiedlicher Energiedosen dieser UVB-Strahlung auf die verwendeten menschlichen Hautfibroblasten bezüglich ihrer klonogenen Aktivität zu testen, wurde mit Dosen von 0 bis 400 J/m^2 ein klonogener Assay durchgeführt. Zur Auswertung des Assays, wurde die Anzahl der Klone der unbestrahlten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Klonanzahl der bestrahlten Zellen darauf bezogen. Dies ergab die sogenannte Überlebensfraktion der Zellen. Sie ist definiert als Quotient der Anzahl der gebildeten Klone mit und ohne Bestrahlung. Die hier entstandene Dosis-Wirkungskurve zeigt eine exponentielle Abnahme der Überlebensfraktion mit zunehmender Strahlungsdosis, wobei bei einer Dosis von 400 J/m^2 nur noch 2,6% der Zellen überleben (Abb. 3).

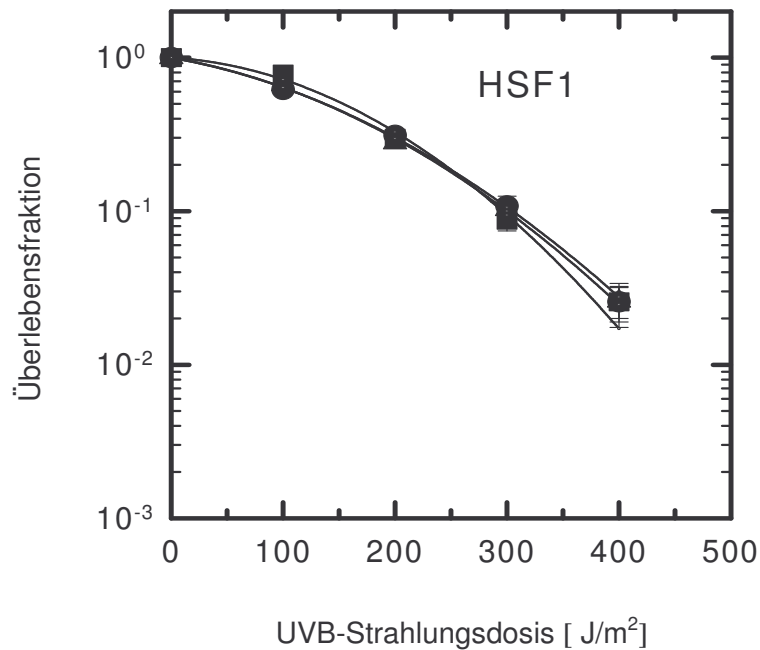


Abb. 3 : Klonogener Assay mit HSF1-Zellen nach Bestrahlung mit 100, 200, 300 und 400 J/m² UVB-Licht. 8 Stunden nach Bestrahlung wurden die Klonkulturen ausgesät (delayed plating) und nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus je drei Einzelwerten. Gezeigt sind die Kurven von 3 unabhängigen Experimenten (n=3).

Die entstandene Dosis-Wirkungskurve gab Aufschluss darüber, welche Energiedosis für weitere Versuche gewählt werden sollte. Die Dosis von 200 J/m² entsprach den Anforderungen. In diesem Dosisbereich zeigten die Fibroblasten einerseits schon eine starke Reaktion auf die UVB-Strahlung und somit eine Reduktion in Ihrem Überleben, wiesen andererseits aber noch eine Überlebensfraktion von 30 Prozent auf.

4.2 Wirkung von BBI auf Fibroblasten

Im Weiteren sollte die Wirkung einer BBI-Behandlung mit und ohne UVB-Bestrahlung auf die Überlebensfraktion von Fibroblasten untersucht werden. Dazu wurde ein klonogener Assay durchgeführt (Abb. 4). In der

graphischen Darstellung ist auf der Ordinate die Überlebensfraktion in Prozent aufgetragen. Eine alleinige BBI-Präinkubation der Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne BBI hatte keine wesentliche Änderung der Koloniebildungsfähigkeit zur Folge. Mit einer BBI-Präinkubation der bestrahlten Zellen konnte hingegen eine Zunahme der Überlebensfraktion beobachtet werden.

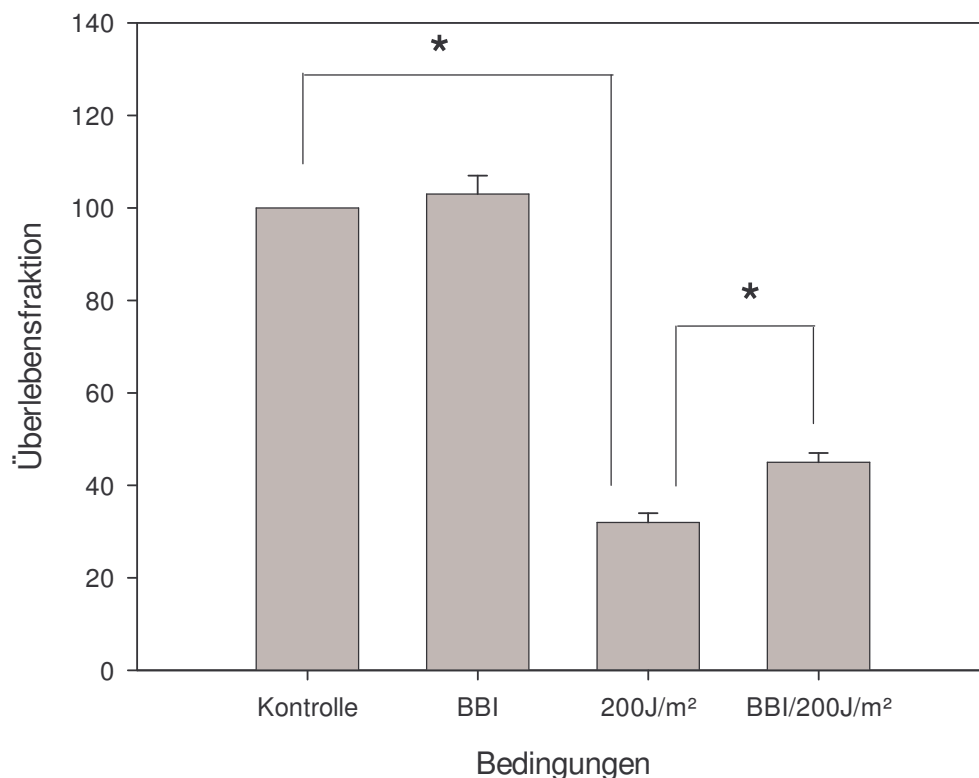


Abb. 4 : Klonogener Assay mit HSF1-Zellen nach 16-stündiger Vorbehandlung mit 10 μ M BBI in Kombination mit und ohne UVB-Bestrahlung in einer Dosis von 200 J/m². 8 Stunden nach Bestrahlung wurden die Klonkulturen ausgesät (delayed plating) und nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten (n=3).

Nach Durchführung des t-Tests zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied der Koloniebildungsfähigkeit der bestrahlten Zellen im Sinne einer Strahlenprotektion durch BBI-Präinkubation. Eine Zunahme der Klonanzahl der mit BBI vorbehandelten Zellen von 38 Prozent konnte beobachtet werden (Abb. 5).

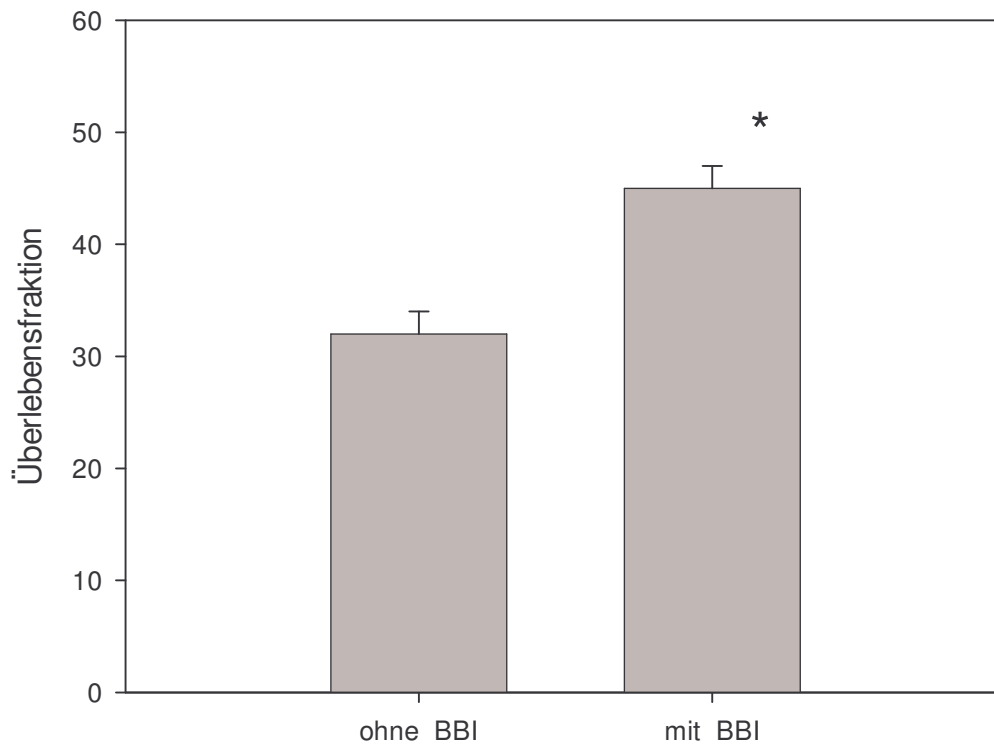


Abb. 5: Zunahme der Überlebensfraktion der bestrahlten Zellen (200 J/m^2) um 38 % nach 16-stündiger BBI-Präinkubation ($p^*=0,001$).

Auch die makroskopische Betrachtung der gefärbten Klone in den Kulturschalen lässt bereits den strahlenprotektive Effekt des BBI erkennen (Abb. 6).

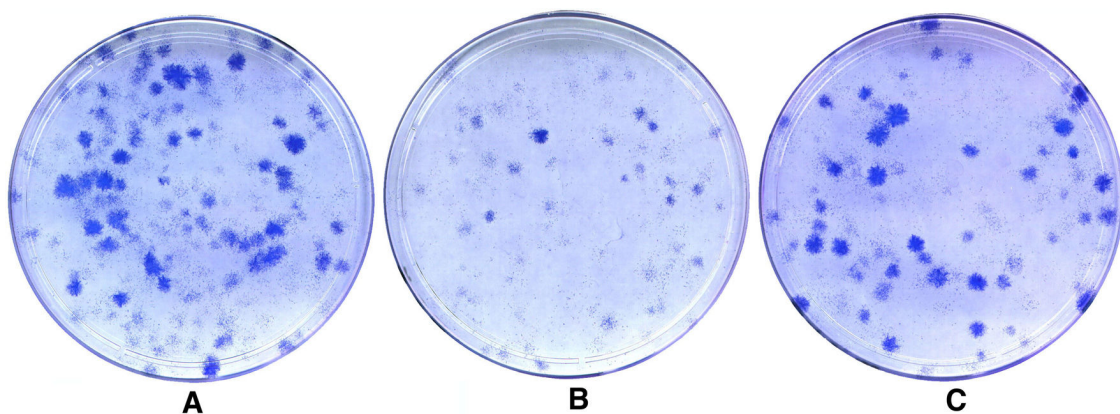
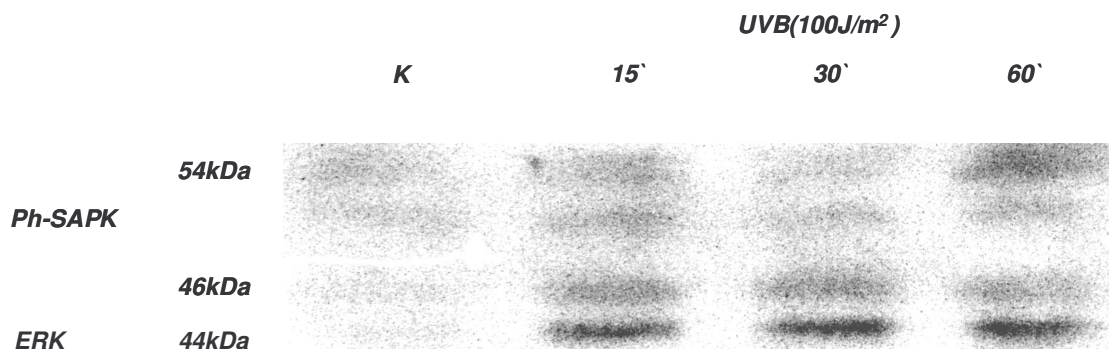


Abb. 6: A: unbehandelte und nichtbestrahlte Kontrolle, B: mit 200 J/m^2 UVB-Licht bestrahlte Zellen und C: bestrahlte Zellen (200 J/m^2) nach 16-stündiger BBI-Präinkubation.

4.3 Einfluss von UVB-Strahlung auf die SAPK in Fibroblasten

Stress activated protein kinases (SAPK) werden in verschiedenen Zelllinien durch Strahlung aktiviert. Eine Aktivierung der SAPK durch UVB-Strahlung konnte hier mittels Western Blot für normalen humanen Hautfibroblasten (HSF1) gezeigt werden (Abb. 7). In der unbestrahlten Kontrolle lässt sich eine leichte Basalaktivität der SAPK erkennen. 15 Minuten nach der Bestrahlung mit 100 J/m^2 ist eine Steigerung in der Aktivität der beiden Isoformen der SAPK sichtbar. Vor allem die 46 kDa Bande zeigt eine etwa konstante Aktivität der SAPK ab 15 Minuten bis mindestens 60 Minuten nach UVB-Bestrahlung. Die 56 kDa Bande zeigte ebenfalls nach 15 Minuten eine leichte SAPK-Aktivierung, die nach 60 Minuten ein Maximum erreicht.



rel. Expression 54 kDa	1,0	1,07	0,75	1,46
rel. Expression 46 kDa	1,0	2,11	2,23	1,61
UVB	-	+	+	+
Zeit (min.)	0	15	30	60

Abb. 7: Kinetik der Aktivität der SAPK in normalen Fibroblasten nach UVB-Bestrahlung (oberste Bande und zweite Bande von unten). Kinetik der ERK (44kDa) nach Bestrahlung (unterste Bande). Die Fibroblasten wurden mit 100 J/m^2 bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten Zelllysate hergestellt. Die Proteine wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt, das Ph-SAPK-Antigen mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und mit einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Die Filmschwärzung wurde densitometrisch erfasst.

Zur Ladekontrolle wurde auf demselben Blot ein Antikörper verwendet, der unabhängig vom Phosphorylierungszustand die Gesamtmenge der SAPK bei 54 kDa und 46 kDa detektiert. Damit konnte festgestellt werden, ob

vergleichbare Mengen an Protein auf das Polyacrylamidgel aufgetragen wurden und somit ein Vergleich der Banden gerechtfertigt ist. Es zeigte sich hier eine gute Übereinstimmung in der aufgetragenen Proteinmenge (Abb. 8).

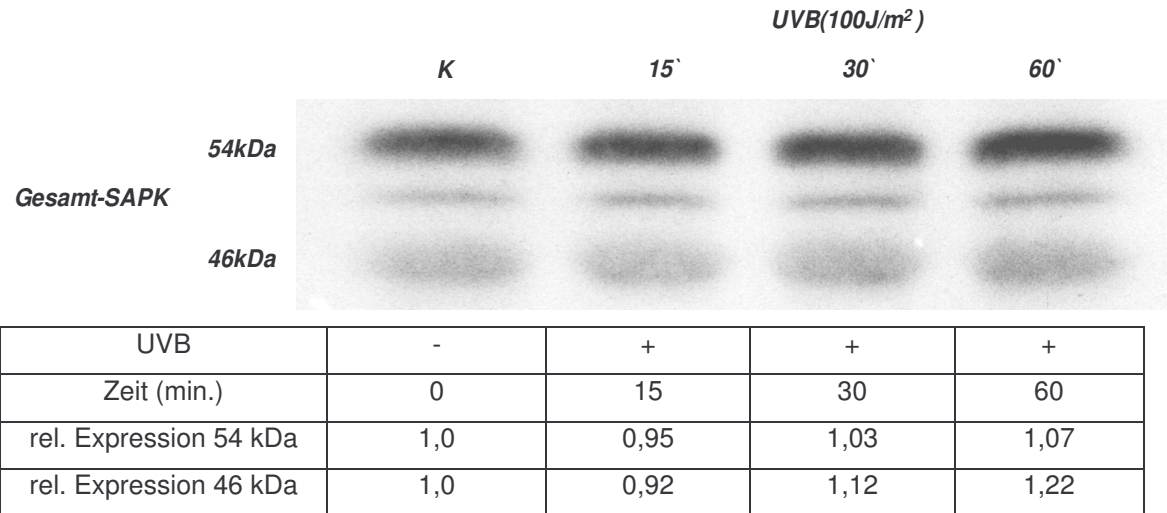


Abb. 8: Gesamt-SAPK-Kontrollen: Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen durch Verwendung eines Antikörpers, der sowohl die aktivierte als auch die inaktivierte Form der SAPK erkennt; densitometrischen Auswertung der Filmschwärzung.

Die densitometrische Auswertung dieses Western Blots bestätigt den optischen Eindruck. Die aufgetragenen Proteinmengen stimmen weitgehend überein und rechtfertigen somit einen Vergleich der Banden.

4.4 Einfluss des Anisomycins auf Fibroblasten

Als eine Reaktion der Zelle auf Strahlung werden SAPK aktiviert. Auch Anisomycin ist ein Aktivator der SAPK. In einem klonogenen Assay sollte nun untersucht werden, ob eine solche Aktivierung der SAPK durch Anisomycin vor Bestrahlung zu Veränderungen der Überlebensfraktion der bestrahlten Fibroblasten führen kann. Um die Substanz in einer solchen Untersuchung einsetzen zu können, musste jedoch zunächst ihr Einfluss bezüglich der Proliferation und des klonogene Überlebens der Fibroblasten ermittelt werden.

4.4.1 Proliferationskinetik

Zunächst wurde der Einfluss des Anisomycins auf die Proliferation der Fibroblasten getestet. Dem Kulturmedium wurde dazu Anisomycin in den Konzentrationen 0 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 100 μM und 500 μM zugesetzt. Da zu erwarten war, dass Anisomycin ein starker Enzymaktivator ist und die SAPK rasch aktiviert werden, wurde eine Inkubationszeit von einer Stunde gewählt. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 10 μM Anisomycin im Medium eine Verringerung der Zellproliferation um ca. 15 % im Vergleich zur Kontrolle nach sich zog. Mit zunehmender Konzentration nahm die Proliferation weiterhin ab (Abb. 9).

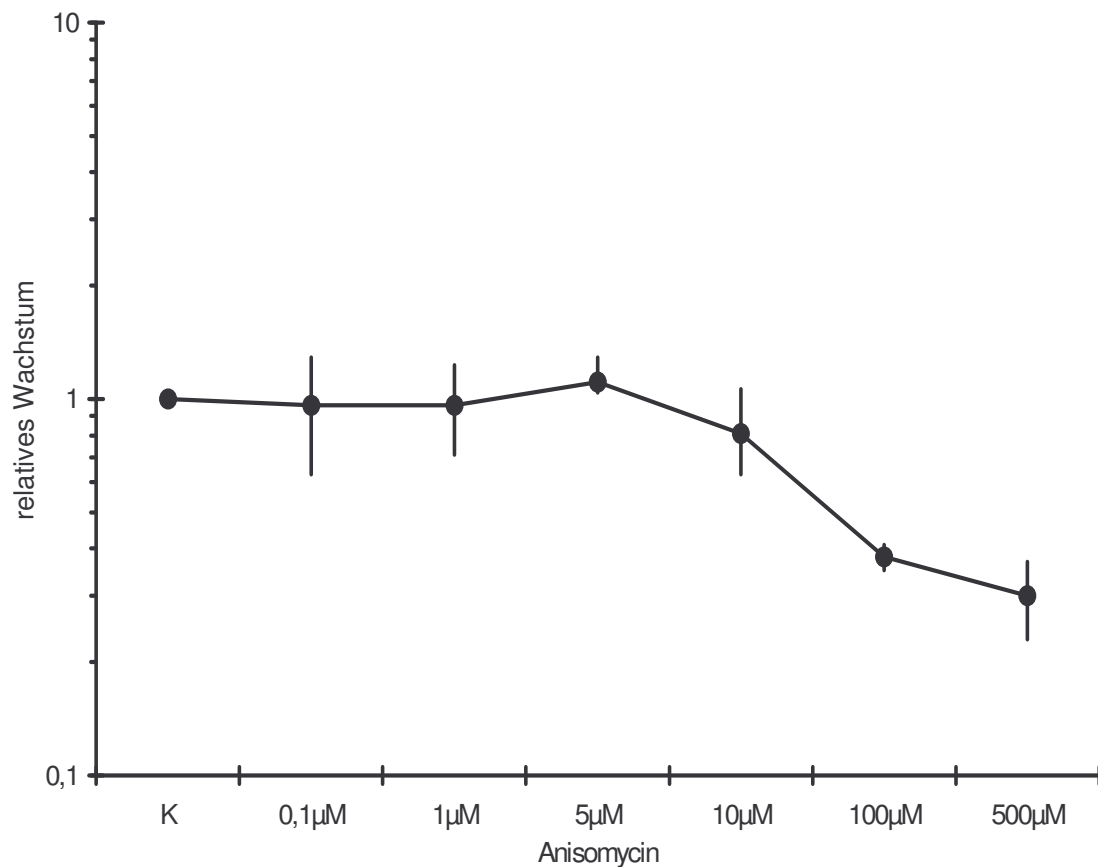


Abb. 9: Proliferationsverhalten von normalen Fibroblasten nach Anisomycin-Inkubation. Die identische Anzahl an Zellen wurde für 1 Stunde mit verschiedenen Konzentrationen Anisomycin behandelt. Nach Waschung der Zellen und Mediumwechsel wurde 48 Stunden nach der Behandlung eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus bis zu 5 Einzelwerten aus voneinander unabhängigen Versuchen.

4.4.2 Klonogener Assay

Im Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob die mit Anisomycin behandelten Zellen sich in 12-14 Tagen Wachstumszeit erholen würden, oder ob durch das Anisomycin ein bleibendes Wachstumsdefizit entstanden war. Dazu wurde mit den Zellen, die den Anisomycin-Konzentrationen 0 μM , 10 μM , 100 μM und 500 μM ausgesetzt waren, ein klonogener Assay durchgeführt (Abb. 10). Es kam zu keiner Erholung der Zellen. Die mit Anisomycin inkubierten Zellen hatten ein Defizit gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei der Konzentration von 10 μM Anisomycin, zeigte sich in diesem Assay eine Reduktion der Überlebensfraktion von ca. 22 Prozent.

Da das Anisomycin in DMSO gelöst worden war, wurde eine zusätzliche Kontrolle angesetzt, die einen möglichen Einfluss des DMSO's auf die Zellen untersuchen sollte. Hierzu wurden die Zellen mit einer DMSO-Konzentration inkubiert, die der 500 μM -Anisomycin-Bedingung entsprach. In der verwendeten Konzentration wurde kein Einfluss auf die klonogene Aktivität der Fibroblasten beobachtet. Der Unterschied im Überleben ist somit alleinig dem Anisomycin zuzuordnen.

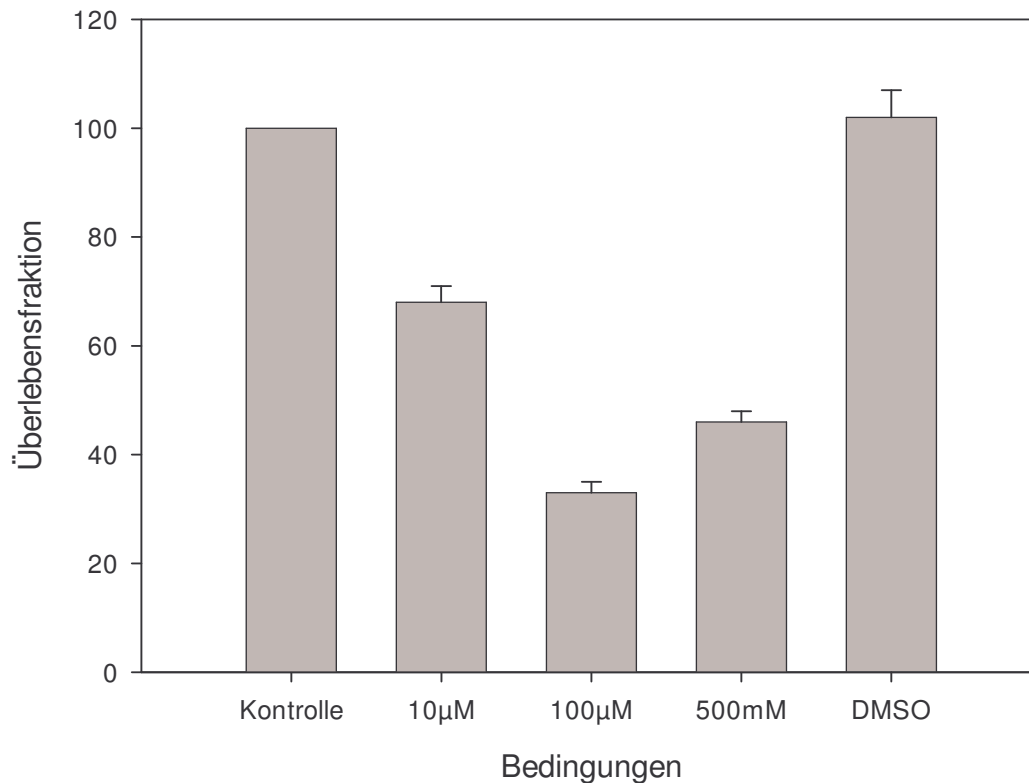


Abb. 10: Klonogener Assay mit HSF1-Zellen nach einstündiger Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen Anisomycin beziehungsweise DMSO. Nach einer 14-tägigen Wachstumszeit wurden die Zellen fixiert und die Klonanzahl bestimmt. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten (n=2).

Für weitere Versuche sollte eine Anisomycin-Konzentration gewählt werden, die zwar eine SAPK-Aktivierung in den Fibroblasten hervorruft, jedoch noch keine bzw. nur geringfügige Proliferationshemmung oder Verringerung der klonogenen Aktivität verursachen sollte. Um dies zu erreichen, wurden zukünftig Konzentrationen kleiner gleich 10 μ M verwendet.

4.5 Einfluss einer Anisomycin-Präinkubation auf die klonogene Aktivität der Fibroblasten nach UVB-Bestrahlung

In dieser Untersuchung sollte nun überprüft werden, ob eine SAPK-Aktivierung durch Anisomycin-Inkubation vor Bestrahlung, einen Effekt auf die klonogene

Aktivität hat. Dazu wurde ein weiterer klonogener Assay mit Konzentrationen von 1 μM , 5 μM und 10 μM Anisomycin durchgeführt. Bei den Konzentrationen 1 μM bzw. 5 μM zeigte sich in der Gruppe der mit Anisomycin behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung keinen Einfluss auf die Überlebensfraktion (Abb. 11 und Abb. 12). Des Weiteren konnte auch im Vergleich der Überlebensfraktion der Kombination Anisomycin und UVB-Bestrahlung zu der bestrahlten Kontrolle keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

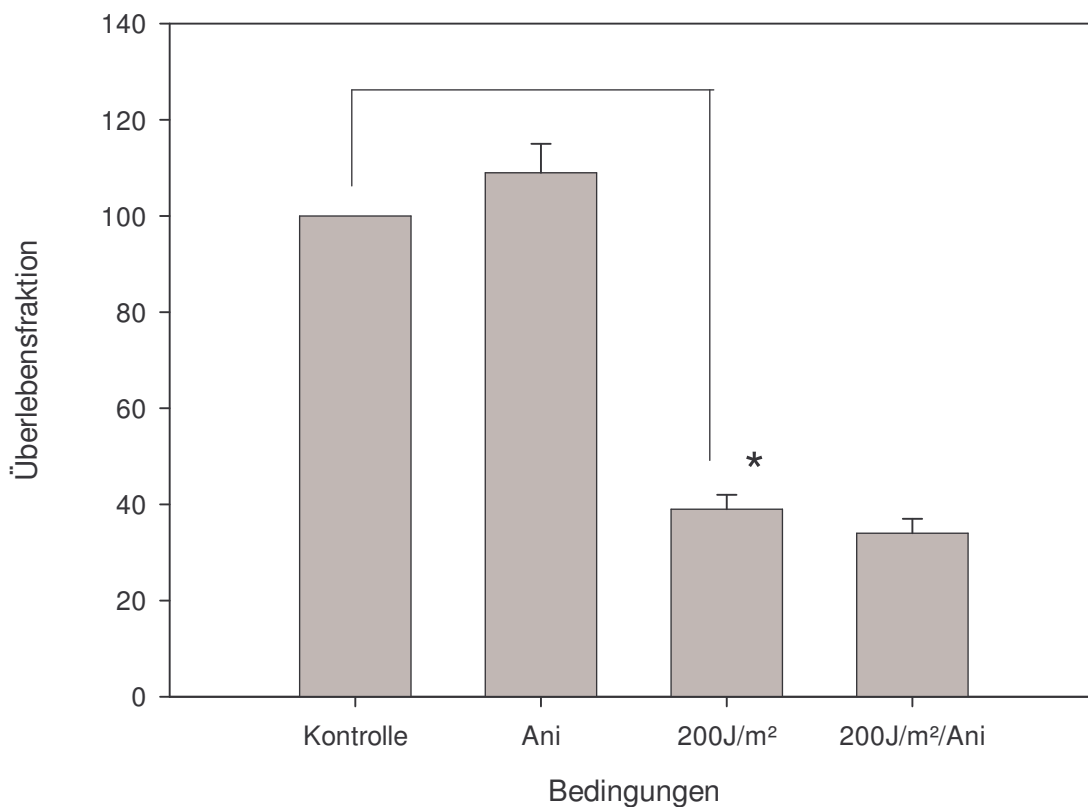


Abb. 11: Klonogener Assay mit HSF1-Zellen nach einstündiger Vorbehandlung mit 1 μM Anisomycin mit und ohne UVB-Bestrahlung (200J/m²). Nach einer 14-tägigen Wachstumszeit wurden die Zellen fixiert und die Klonanzahl bestimmt. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten (n=3; p*=0,006).

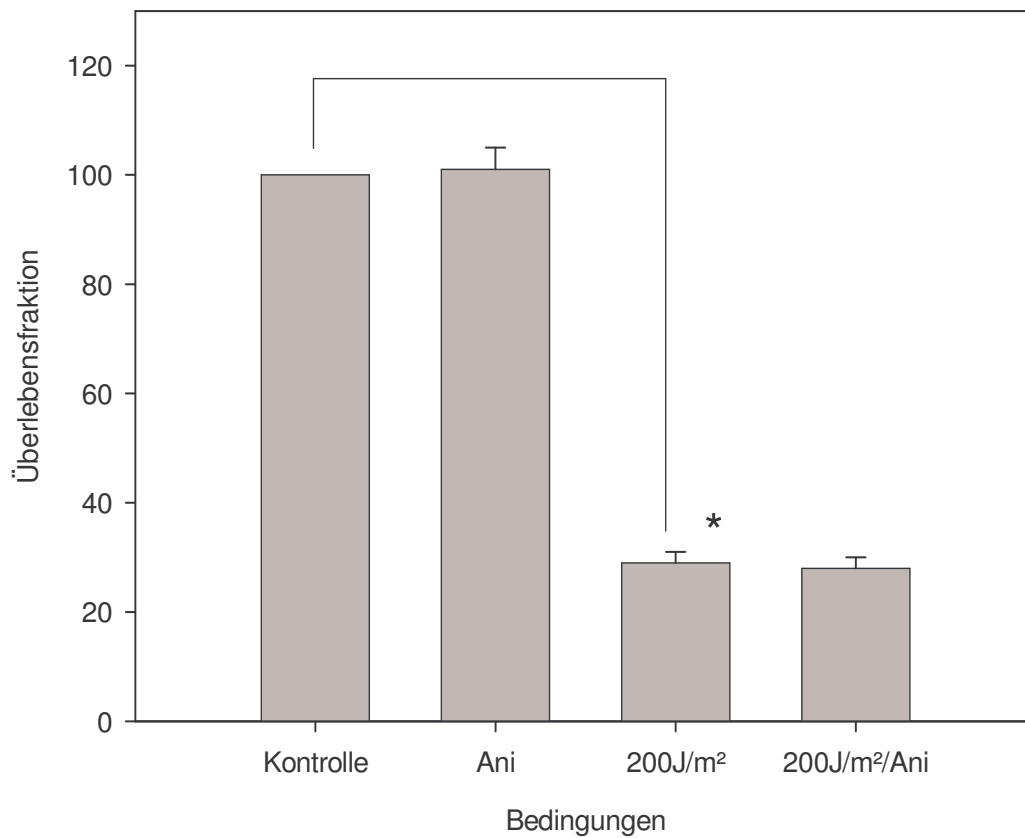


Abb. 12: Klonogener Assay mit HSF1-Zellen nach einstündiger Vorbehandlung mit **5 μ M** Anisomycin mit und ohne UVB-Bestrahlung (200J/m²). Nach einer 14-tägigen Wachstumszeit wurden die Zellen fixiert und die Klonanzahl bestimmt. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten (n=3; p*=0,006).

Eine Inkubation der unbestrahlten Zellen mit 10 μ M Anisomycin verursachte eine signifikante Verringerung der Überlebensfraktion der Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen. In den bestrahlten Zellen zeigt sich ebenfalls eine signifikante Verringerung durch Anisomycin-Inkubation (Abb. 13).

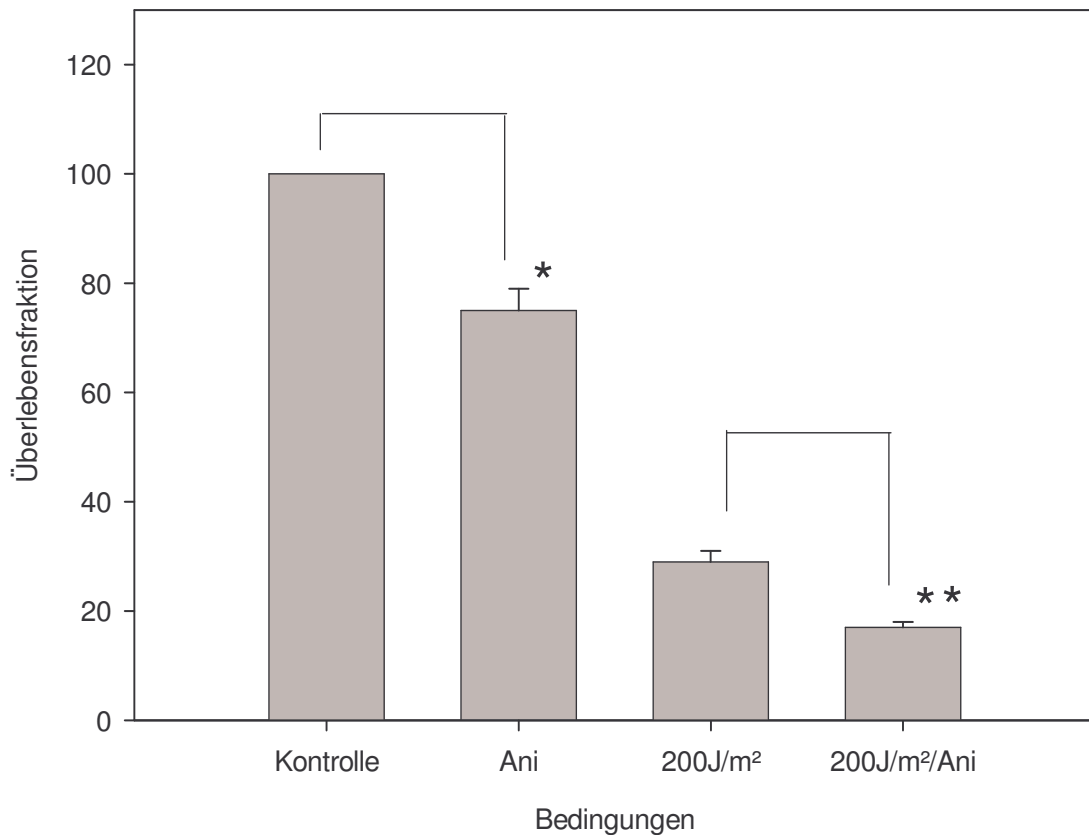


Abb. 13: Klonogener Assay mit HSF1-Zellen nach einstündiger Vorbehandlung mit 10 μM Anisomycin mit und ohne UVB-Bestrahlung (200J/m²) (n=3; p*=0,003, p**=0,002).

4.6 Einfluss von BBI auf die SAPK der Fibroblasten

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass in unbestrahlten Zellen durch eine BBI-Behandlung der EGF-Rezeptor aktiviert wird. Es sollte hier nun weiterhin untersucht werden, welchen Einfluss BBI außerdem auf molekularer Ebene auf die Fibroblasten ausübt. Dabei sollten speziell überprüft werden, ob die Aktivität der SAPK, die zu einer Signaltransduktionskaskade downstream des EGF-Rezeptors gehören, von BBI beeinflusst wird. Dazu wurden Western Blots durchgeführt. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit BBI behandelt und wie oben beschrieben nach bestimmten Zeitpunkten aufgearbeitet und für die Durchführung eines Western Blots vorbereitet. Als Sekundärantikörper wurde diesmal ein mit Peroxidase konjugierte Antikörper mit dem entsprechenden Substrat verwendet. Es wurde zunächst der Zeitraum

zwischen 5 und 30 Minuten nach BBI-Zugabe gewählt (Abb. 14, Abb. 16 und Abb. 18). Anisomycin diente als Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit einer Anisomycin-Konzentration von 5 μM führte bereits nach 15 Minuten zu einer starken Aktivierung der SAPK. Bei den als weitere Kontrolle verwendeten mit UVB bestrahlten Zellen, zeigte sich nach 15 Minuten eine sehr schwache Aktivität der SAPK entsprechend dem obigen Versuch (Abb. 14). Auch eine Steigerung auf 45 Minuten nach UVB-Bestrahlung erhöhte die Expression nicht wesentlich (Abb. 16). Es konnte dabei für die mit BBI behandelten Zellen in dem untersuchten Zeitraum keine den Kontrollen vergleichbare Aktivierung der SAPK nachgewiesen werden (Abb. 14 und Abb. 16).

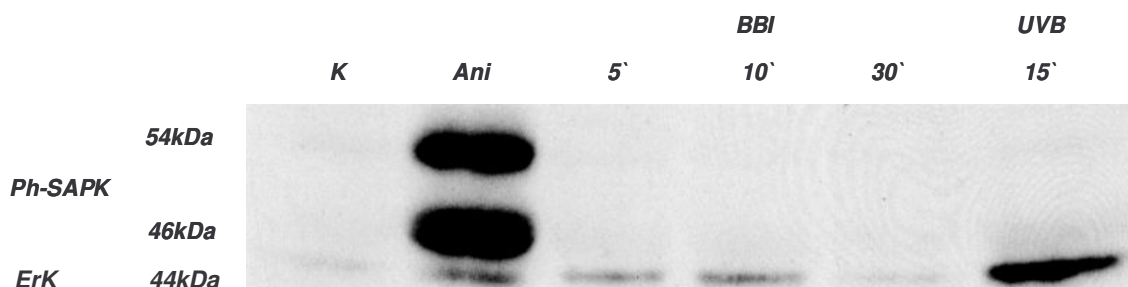


Abb. 14: Kinetik der Aktivität der SAPK in normalen Fibroblasten nach Behandlung der Zellen mit Anisomycin (5 μM für 15 min), BBI mit den Inkubationszeiten 5, 10 und 30 Minuten und UVB-Bestrahlung (200J/m²) (oberste Bande und zweite Bande von unten). Kinetik der ERK (44 kDa, unterste Bande). Die Fibroblasten wurden mit 200 J/m² bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten Zelllysate hergestellt. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und das Ph-SAPK-Antigen mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und mit einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

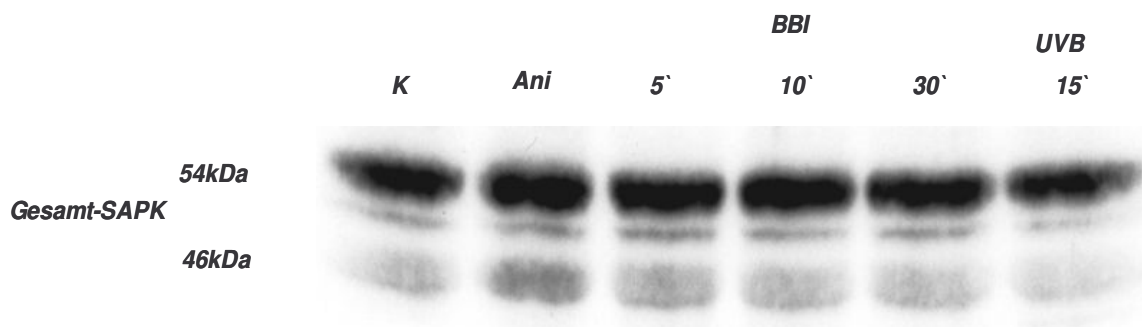


Abb. 15: Gesamt-SAPK-Kontrollen: Detektion des Blots aus Abb. 14 mit einem Gesamt-SAPK-Antikörper zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

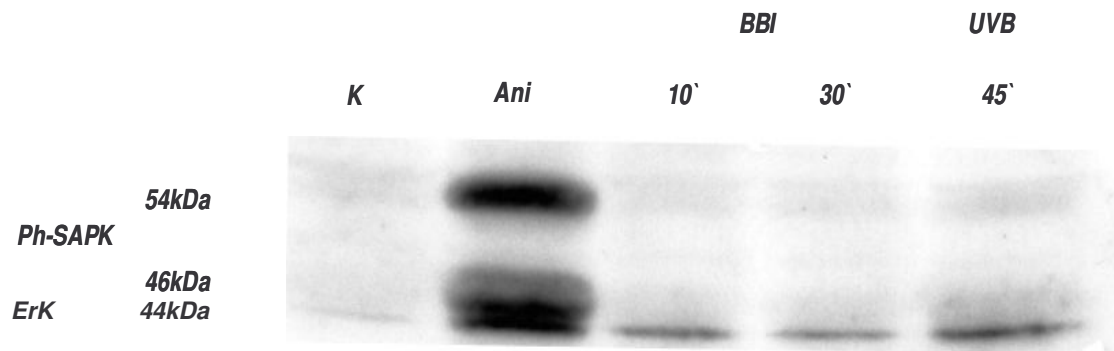


Abb. 16: Kinetik der Aktivität der SAPK in normalen Fibroblasten nach Behandlung mit Anisomycin (5 μ M), BBI mit den Inkubationszeiten 10 und 30 Minuten und UVB-Bestrahlung (200 J/m^2) (oberste Bande und zweite Bande von unten). Kinetik der ERK (44 kDa, unterste Bande). Die Proteine aus den Zelllysaten wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und das Ph-SAPK-Antigen mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und mit einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

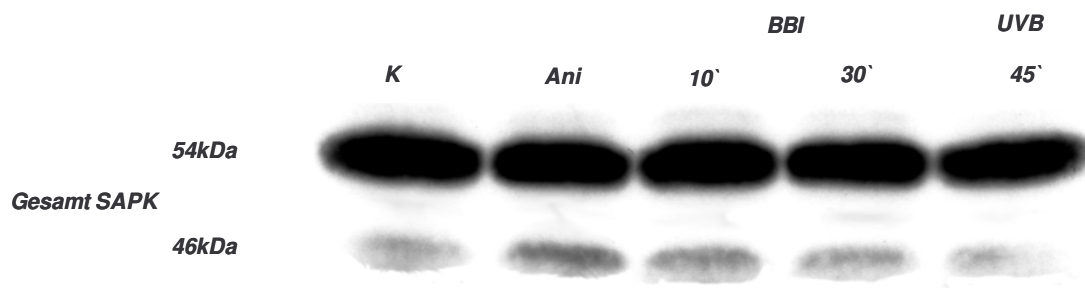


Abb. 17: Gesamt-SAPK-Kontrollen: Detektion des Blots aus Abb. 16 mit einem gesamt-SAPK-Antikörper zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Aufgrund der verhältnismäßig schwachen Aktivierung der SAPK durch UVB Strahlung (Abb. 14, Abb. 16) wurden in einem weiteren Versuch als Kontrolle UVC-bestrahlte (30 J/m^2) Zellen verwendet (Abb. 18). Es zeigt sich, dass UVC-Strahlung ein deutlich besserer Aktivator der SAPK in Fibroblasten ist als UVB-Strahlung. Die Konzentration des Anisomycin-Kontrolle wurde aufgrund der hohen Intensität des Signals in den vorigen Versuchen auf $1\mu\text{M}$ gesenkt. Es zeigte sich dadurch eine geringere Aktivierung der SAPK. Bezüglich des Einflusses des BBI auf die Fibroblasten konnte jedoch wiederum eine der Kontrolle vergleichbare SAPK-Aktivierung durch BBI nicht gefunden werden.

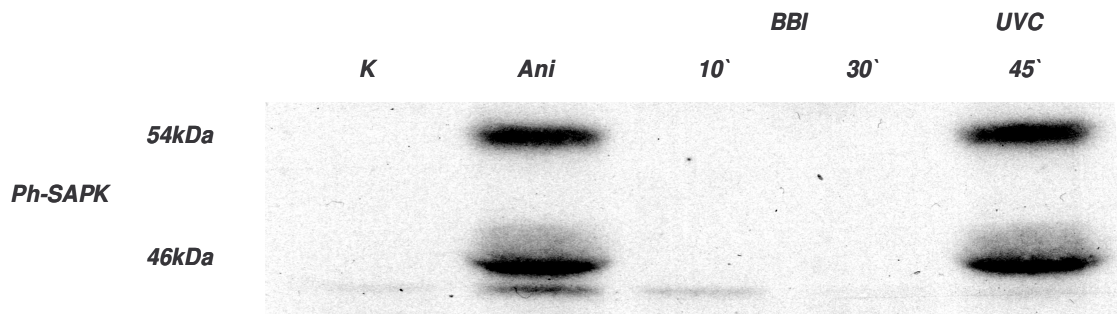


Abb. 18: Kinetik der Aktivität der SAPK in normalen Fibroblasten nach Behandlung mit Anisomycin (1 μM für 15 min), BBI mit den Inkubationszeiten 10 und 30 Minuten und UVC-Bestrahlung (200 J/m^2) (oberste Bande und zweite Bande von unten). Kinetik der ERK (44 kDa, unterste Bande. Die Proteine aus den Zelllysaten wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und das Ph-SAPK-Antigen mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und mit einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

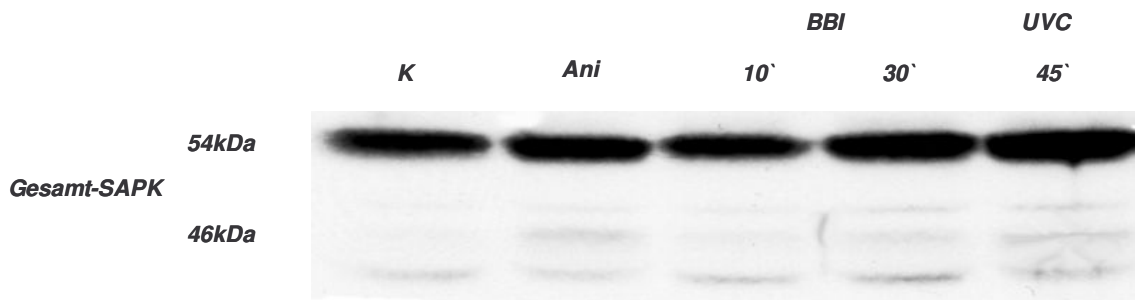


Abb. 19: Gesamt-SAPK-Kontrollen: Detektion des Blots aus Abb. 18 mit einem gesamt-SAPK-Antikörper zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die der strahlenprotektiven Wirkung zugrundeliegenden molekularen Mechanismen des Bowman-Birk Proteinase-Inhibitors (BBI) untersucht werden. Dazu wurde der Einfluss des BBI auf die strahleninduzierte Signaltransduktion der Zelle betrachtet. Im Mittelpunkt standen klonogene Assays und molekulare Untersuchungen auf Proteinebene mittels Western Blots an normalen humanen Hautfibroblasten.

5.1 Radiosensitivität der Fibroblasten

Verschiedene Zellsysteme beziehungsweise Zellstämme zeigen eine individuelle Strahlenempfindlichkeit. Diese wiederum ist zum einen von der Qualität der Strahlung und zum anderen vom Zelltyp, dem Alter der Zellen und vielen weiteren Umwelteinflüssen abhängig. Die Strahlenempfindlichkeit der für die Untersuchungen verwendeten menschlichen Hautfibroblasten bezüglich der UVB-Strahlung zeigte sich in einer exponentiellen Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 4). Die klonogene Aktivität der Fibroblasten nimmt dabei mit der Erhöhung der Strahlendosis exponentiell ab.

5.2 BBI als Strahlenprotektor

Durch eine BBI-Präinkubation der Fibroblasten konnte eine Herabsetzung der Strahlenempfindlichkeit erreicht werden. Es zeigte sich eine Zunahme der klonogenen Aktivität nach Bestrahlung und somit eine Verringerung der Sensitivität der Hautfibroblasten gegenüber der UVB-Strahlung (200 J/m^2) (Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6). Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen, die bereits für ionisierende Strahlung (Dittmann et al., 1995) und für eine UVB-Dosis von 100 J/m^2 (Dittmann et al., 2001) an anderen Fibroblasten-Zellstämmen eine protektive Wirkung des Bowman-Birk Proteinase Inhibitors zeigen konnten.

Der molekulare Mechanismus, der dieser strahlenprotektiven Wirkung zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand derzeitiger Forschungen.

5.3 UVB-Strahlung und SAPK

Um die molekularen Mechanismen einer strahlenprotektiven Substanz verstehen zu können, ist es von Bedeutung die Strahlenantwort von Zellen zu kennen. Eine der schnellsten Reaktionen der Zelle auf molekularer Ebene auf Bestrahlung ist die Induktion bestimmter Signaltransduktionskaskaden. Hier werden im Zytoplasma Prozesse in Gang gesetzt und Genprogramme im Kern angeschaltet, die eine Zellantwort bedingen. Im Zusammenhang mit UV-Strahlung ist vor allem die Signaltransduktionskaskade der SAPK (stress activated protein kinase) zu nennen (Derijard et al., 1994). In den verwendeten menschlichen Hautfibroblasten ist eine Phosphorylierung, d. h. Aktivierung der SAPK durch UVB-Strahlung nachweisbar (Abb. 7). Diese ist jedoch vergleichsweise schwach ausgeprägt. Eine deutlich stärkere Aktivierung lässt sich durch Bestrahlung mit UVC erreichen (Abb. 18). Diese Unterschiede in der Ausprägung der SAPK-Aktivierung abhängig von der Wellenlänge der UV-Strahlung sind bereits bekannt (Dhanwada et al., 1995; Adler et al., 1996a). In Keratinocyten zeigte sich beispielsweise ebenfalls eine solche Abhängigkeit (Dhanwada et al., 1995). Dabei konnte die stärkste Aktivierung der SAPK durch kurzwellige, hochenergetische UV-Strahlung erreicht werden (UVC mit 254 nm), während Bestrahlung mit einer Einzeldosis UVB (280-320 nm) nur eine geringe Aktivierung von SAPK gezeigt hat. Durch Exposition der Zellen gegenüber vielfachen Dosen UVB-Strahlung konnte die Induktion der SAPK hingegen gesteigert werden ($3 \times 200\text{J/m}^2$) (Ramaswamy et al., 1998). Dabei ist die Antwort auf UVB schnell und kurzlebig, während die UVC-Strahlungsreaktion länger andauernd ist (Ramaswamy et al., 1998). In Fibroblasten konnte bisher ebenfalls eine signifikante Aktivierung von SAPK durch vielfache Bestrahlung mit UVB-Strahlung gezeigt werden (Adler et al., 1996a).

Ursächlich für die schwächere Ausprägung der SAPK-Aktivierung durch eine Einzeldosis UVB-Strahlung als durch UVC-Strahlung in den Fibroblasten könnte die niedrigere Energie der UVB-Strahlung sein. Durch eine Mehrfachbestrahlung mit UVB addiert sich die Energiedosis, die dann eine gesteigerte SAPK-Aktivierung hervorrufen könnte. Weiterhin könnte Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge von verschiedenen Sensoren auf der

Zellmembran erkannt werden und somit Einfluss auf die Intensität der Aktivierung der SAPK haben. Eine weitere Erklärung wäre, dass einzelne Bestrahlungen gleicher Wellenlänge verschiedene Signalwege aktivieren, die eine unterschiedlich starke Aktivierung der SAPK zur Folge hat.

Die Aktivierung der SAPK ist ebenfalls vom Zelltyp abhängig (Dhanwada et al., 1995; Mendrano et al., 1995). Und auch innerhalb eines Zelltyps kann es zu Unterschieden in der Intensität der SAPK-Aktivierung kommen, denn es besteht weiterhin eine Abhängigkeit von der Zellkonfluenz (Pfarr et al., 1994; Lallemand et al., 1998). Die menschlichen Fibroblasten wurden in konfluentem Zustand bestrahlt. Bereits in Mausfibroblasten konnte gezeigt werden, dass in konfluenten Zellen die SAPK-Aktivierung nach Bestrahlung abgeschwächt oder ganz gehemmt wird (Lallemand et al., 1998). Die Regulation der SAPK-Aktivierung wird somit durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte beeinflusst.

Außerdem Einfluss auf die Ausprägung der SAPK Aktivierung können das Alter und die Passagen-Anzahl der Zellen haben (Adler et al., 1996c). In normalen menschlichen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass eine SAPK-Aktivierung nach UVC-Bestrahlung in Zellen aus älteren Passagen weniger stark ausgeprägt war als in Zellen aus jungen Passagen (Adler et al., 1996c).

Um ein stärkeres Ansprechen der Zellen auf externe Reize zu erhalten, wird von vielen Arbeitsgruppen kurz vor Versuchsbeginn eine „Stavierung“ der Zellen, d. h. eine Inkubation der Zellen unter Reduktion von Nährstoffen im Medium, vorgenommen. Dies führt meist zu überdurchschnittlich starker Reaktion der Zellen auf externe Reize. In den vorliegenden Untersuchungen wäre dadurch eventuell ebenfalls eine stärker ausgeprägten Aktivierung der SAPK durch eine Einzeldosis UVB-Strahlung zustande gekommen. Da dies aber einen äußerst unphysiologischen Zustand der Zelle darstellt, wurde hier bewusst auf eine Stavierung verzichtet.

Die Fähigkeit der Zellen zur SAPK-Aktivierung ist somit von dem Zelltyp, der Wellenlänge, dem Zellalter und den Wachstumsbedingungen abhängig und für unterschiedlichste Umweltfaktoren relativ anfällig.

Das gezeigte Ergebnis einer nur relativ schwachen Aktivierung der SAPK durch eine Einzeldosis UVB-Strahlung in den verwendeten Hautfibroblasten (Abb. 7) lässt sich daher gut in diese Zusammenhänge einreihen.

Somit ist festzuhalten, dass die verwendeten Fibroblasten ein sehr charakteristisches Muster zeigen auf UV-Strahlung bezüglich der SAPK Aktivierung zu reagieren.

5.4 Wirkung von Anisomycin auf Fibroblasten

Bisherige Ergebnisse führen zu der Überlegung, dass BBI möglicherweise über eine Beeinflussung der SAPK seine radioprotektive Wirkung vermittelt. Es sollte daher untersucht werden, ob eine frühzeitige exogene Aktivierung der SAPK, noch vor einer Bestrahlung, einen Einfluss auf die Strahlensensitivität der Zellen hat und somit der BBI-Effekt simuliert werden kann. Dazu wurde das von *Streptomyces griseolus* stammende Antibiotikum Anisomycin (Sobin et al., 1954) eingesetzt. Anisomycin besitzt in höheren Konzentrationen eine proteinsynthesehemmende Wirkung. Außerdem ist von Anisomycin bekannt, dass es ein starker Aktivator der Stress-aktivierten-Protein-Kinase-Kaskaden (SAPK und p38) ist (Mahadevan et al. 1991; Cano et al., 1994). Zur Überprüfung des Einflusses einer vorzeitigen SAPK-Aktivierung auf die Strahlensensitivität sollten die Zellen nach einer Anisomycin-Präinkubation mit UVB bestrahlt und die klonogene Aktivität der Zellen getestet werden.

In bisherigen Untersuchungen zeigte sich, dass höhere, die Proteinsynthese hemmende Konzentrationen von Anisomycin, in einigen Zellen zur Apoptose führen können (Töröcsik et al., 2000a). Dabei spielt wahrscheinlich eine translationshemmende Wirkung des Anisomycins eine wesentlichere Rolle als der Effekt auf die Signaltransduktion der Zellen (Töröcsik et al., 2000a). Andere Forschungen ergaben, dass niedrige Konzentrationen Anisomycin, die noch zu keiner Hemmung der Proteinsynthese führen, eine starke Aktivierung der SAPK in verschiedenen Zellsystemen bewirken, ohne dabei deren Zelltod zu verursachen (Toeröcsik et al., 2000b).

Von Interesse war daher zunächst, wie sensitiv die menschlichen Fibroblasten auf Anisomycin reagieren, bevor sie einer zusätzlichen Bestrahlung ausgesetzt

würden. Die hier vorliegenden Untersuchungen bestätigen Beobachtungen, die eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der Proliferation und des Überlebens von Zellen bei Behandlung mit Anisomycin beschreiben (Abb. 9). Die menschlichen Hautfibroblasten zeigten ab einer Konzentration von 10 μM (2,6 $\mu\text{g/ml}$) Anisomycin im Medium eine deutliche Proliferationshemmung im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen. Zwischen 1 μM (260 ng/ml) und 5 μM (1300 ng/ml) beeinflusste das Anisomycin die Proliferation der Zellen noch nicht signifikant. Diese Beobachtung deckt sich tendenziell mit Untersuchungen, die nachweisen, dass hohe Konzentrationen, ab 1000 ng/ml Anisomycin, zu einer DNA-Fragmentierung, als Zeichen der Apoptose, führen (Törocsic et al., 2000a), während niedrige Konzentrationen bis 100 ng/ml keine DNA-Fragmentierung in den behandelten Zellen zeigen. Die Abweichungen in den verwendeten Konzentrationen sind dabei höchstwahrscheinlich auf die generell individuelle Empfindlichkeit verschiedener Zellsysteme zurückzuführen.

Auch im klonogenen Assay, der eine sensitivere Methode zum Nachweis von Modulationen der Wachstumseigenschaften von Zellen darstellt, konnte ein Wachstumsdefizit der den höheren Konzentrationen von Anisomycin ausgesetzten Zellen beobachtet werden (Abb. 10).

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass höhere Konzentrationen von Anisomycin die Zellen nachhaltig schädigen und somit toxisch wirken, während niedrigere Konzentrationen die Zelle diesbezüglich nicht beeinflussen.

Da eine Zellschädigung der Zellen durch Anisomycin für die nachfolgenden Untersuchungen der Strahlensensitivität nicht wünschenswert waren, erwies sich somit eine Konzentration unterhalb der wachstumsbeeinflussenden Konzentration von 10 μM als zweckmäßig.

In dieser Größenordnung war bereits eine SAPK-Aktivierung zu erwarten (Mahadevan et al., 1991). Dies bestätigte sich in den vorliegenden Untersuchungen, bei denen eine SAPK-Aktivierung bereits bei 1 μM nach 15 Minuten beobachtet werden konnte (Abb. 18).

5.5 Einfluss einer SAPK-Aktivierung auf die Strahlensensitivität von Fibroblasten

In einem weiteren klonogenen Assay wurde nun der mögliche Zusammenhang zwischen einer frühzeitigen Aktivierung des Signalweges der SAPK und einer strahlenprotektiven Wirkung auf die Zellen untersucht .

Da sich Anisomycin wie ein echter Agonist zur UV-Strahlung bezüglich der SAPK-Aktivierung verhält (Hazzalin et al., 1998), konnte untersucht werden, wie eine frühzeitige, der Strahlung vorweggenommene SAPK-Aktivierung durch Anisomycin auf die Strahlensensitivität der Zellen wirkt. Im klonogenen Assay zeigte eine Aktivierung der SAPK durch unterschiedliche Konzentrationen Anisomycin vor Bestrahlung bezüglich der Strahlensensitivität der Fibroblasten keinen radioprotektiven Effekt (Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13). In niedriger Konzentration (1 μM und 5 μM) (Abb. 11 und Abb. 12) verhielten sich die bestrahlten, sowie die unbestrahlten mit Anisomycin vorbehandelten Fibroblasten wie ihre zugehörigen unbehandelten Kontrollen. Bei der höheren Konzentration von 10 μM (Abb. 13) zeigt sich der toxische Effekt des Anisomycins, der bereits in vorigen Versuchen festgestellt wurde. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass eine SAPK Aktivierung, wie sie in diesem Versuchsaufbau durch Anisomycin erzielt wurde, per se die Zelle nicht vor Strahlung schützt.

5.6 Einfluss des BBI auf die SAPK

Gleichzeitig wurde der Frage nachgegangen, ob es durch den Einsatz von BBI überhaupt möglich ist, strahleninduzierbare Signaltransduktionskaskaden zu beeinflussen. Von BBI ist bekannt, dass es, entsprechend einer Bestrahlung, in der Lage ist, den EGF-Rezeptor (Güven et al., 1998 b) und das TP53-Protein, mit den von ihm induzierten Reparaturgenen Gadd45 (Z), p21(Z) und ERCC3(Z) zu modulieren (Dittmann et al., 1998 b). Interessant ist, dass die durch Strahlung induzierte EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung nach einer BBI-Präinkubation der Zellen jedoch reduziert ist (Güven et al., 1998b). Der EGF-Rezeptor steht also für eine der BBI-Inkubation folgenden strahleninduzierten Aktivierung nicht mehr zur Verfügung. Ebenso reduziert sich

die strahleninduzierte TP53-Proteinstabilisierung und DNA-Bindungsaktivität des TP53 in normalen Fibroblasten nach BBI-Präinkubation (Dittmann et al., 1998 b).

Es zeigte sich auch, dass es zu einer maximalen XPA-Expression nach BBI und somit zu einer vorzeitigen XPA-abhängige Reparatur der Zelle und zu einer erhöhten und lang andauernde MSH2-Expression nach BBI und Bestrahlung kommt (Dittmann et al., 1998 b).

Sämtliche dieser Befunde zeigen, dass BBI stimulierende Effekte auf verschiedene in die DNA-Reparatur eingebundene Proteine hat (Dittmann et al., 2002). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch BBI könnte also, noch vor einer Bestrahlung, eine Signaltransduktionskaskade in der Zelle starten und die Transkription von Genen ermöglichen, die normalerweise erst durch eine Bestrahlung induziert werden. Der Effekt der Strahlung und die Reaktion der Zelle darauf werden durch BBI quasi vorweggenommen und die Zelle wird so auf eine nachfolgende Bestrahlung vorbereitet. Die so frühzeitig exprimierten Genprodukte vermitteln dann die radioprotektive Wirkung des BBI, indem die Zelle z.B. Reparaturvorgänge schneller oder effektiver gestalten kann. Dadurch könnte es der Zelle möglich sein, in einer größeren Anzahl eine nachfolgende Bestrahlung zu überleben.

Da der Weg vom EGF-Rezeptor zum TP53-Protein über die Signaltransduktionskaskade der SAPK führen kann (Fuchs et al., 1998) und ebenfalls Hinweise darauf bestehen, dass eine Aktivierung der SAPK in Zusammenhang mit Zell-Überleben bei UV-Bestrahlung steht (Devary et al., 1992), wurde der Frage nachgegangen, ob BBI ebenfalls in der Lage ist, die SAPK zu modulieren.

Eine SAPK-Aktivierung findet erfahrungsgemäß relativ zeitnah zu dem Auftreten des zellulären Stimulus statt. So zeigt sich eine SAPK-Aktivierung in Keratinocyten bereits nach 1 Minute mit einem Maximum nach 10 Minuten nach UVB-Bestrahlung (Ramaswamy et al, 1998). Auch die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine SAPK-Aktivierung in Fibroblasten bereits in den ersten 15 Minuten nach Bestrahlung auftritt (Abb. 7).

Da eine 30-minütige Inkubation mit BBI bereits zu einer deutlichen EGF-Rezeptor-Phosphorylierung führt und eine SAPK Aktivierung im Anschluss daran zu erwarten ist, wurde für eine BBI-Präinkubation daher Inkubationszeiten von 10 bis maximal 30 Minuten gewählt.

In den durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch in den ersten 30 Minuten nach BBI-Präinkubation eine der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung folgende SAPK-Aktivierung nicht gesehen werden (Abb. 14, Abb. 16 und Abb. 18). Im untersuchten Zeitraum ist also eine SAPK Aktivierung durch BBI nicht nachweisbar.

Bereits an UV-bestrahlten Fibroblasten konnte festgestellt werden, dass die SAPK-Kaskade vielseitig beeinflussbar ist. Es gibt Hinweise dafür, dass selbst bekannte Stimuli wie UV-Strahlung unter manchen Bedingungen nur zu einer schwach nachweisbaren SAPK-Aktivierung führen (Dhanwada et al., 1995; Ramaswamy et al., 1998; Pfarr et al., 1994; Lallemand et al., 1998). So zeigt sich bei Zellkonfluenz eine Abschwächung der SAPK-Aktivierung (Lallemand et al., 1998) und auch das Alter der Zellen kann Einfluss nehmen (Adler et al., 1996c). Bezüglich der Nachweismethode ist außerdem zu berücksichtigen, dass der Zustand der phosphorylierten, d. h. der aktiven Form der SAPK relativ instabil ist. Sie kann durch im Zellextrakt noch vorhandene Phosphatasen abgebaut werden, so dass nur kleinere Mengen der aktivierten SAPK dem Nachweis zur Verfügung stehen und der Nachweis dafür nicht ausreichend sensitiv ist. An dieser Stelle muss außerdem bedacht werden, dass eine kurze Serumstivation, wie sie von vielen anderen Arbeitsgruppen angewandt wird, eventuell eine Steigerung der Phosphorylierung erbracht hätte, aufgrund der unphysiologischen Methode aber darauf verzichtet wurde.

Es ist nun also möglich, dass die Dichte des Zellrasens, das Alter der Zellen und die Methodik zu einer Abschwächung bzw. zu einem unzureichenden Nachweis einer möglicherweise durch BBI hervorgerufenen SAPK-Aktivierung geführt hat.

Demgegenüber ist allerdings anzuführen, dass der radioprotektive Effekt des BBI bei eben diesen Bedingungen nachweisbar ist (Abb. 5). Sollte also eine frühzeitige Aktivierung der SAPK für den radioprotektiven Effekt ausschlaggebend sein, wäre zu erwarten, dass diese auch bei den bestehenden Bedingungen signifikant nachzuweisen wäre. Die Untersuchungen mit dem SAPK-Aktivator Anisomycin sprechen ebenfalls nicht dafür, dass eine frühzeitige SAPK-Aktivierung mit dem radioprotektiven Effekt des BBI in Zusammenhang steht.

BBI muss also anderweitig Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen. Fest steht, dass BBI den EGF-Rezeptor der Zelle beeinflusst. Die Signaltransduktionskaskade downstream des EGF-Rezeptors ist jedoch komplex.

Es zeigt sich, dass die Kaskade der MAPK eine der zentralen Elemente der Signaltransduktionswege der Zelle darstellt, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führt (Marshall 1994). Die Anzahl der an den MAPK-Kaskaden beteiligten Kinasen ist allerdings groß. Bisher sind alleine 20 solcher Kinasen in Säugerzellen identifiziert worden (Elion 1998). Diese Kinasen bieten vielfach Möglichkeiten zu „crosstalk“ zwischen den Signalkaskaden (Marshall et al. 1994; Herskowitz 1995). Das heißt, externe Signale nutzen bis zu einem gewissen Punkt gemeinsame Kinasen und können dann in voneinander unabhängige spezifische Richtungen weitergeleitet werden. Vor allem auf der Ebene der MAPKKK ist dies zu beobachten (Feuerstein et al., 2000). Beispielhaft kann hier die MEKK1 genannt werden: Neben der Phosphorylierung der ERK1/2 über die Kaskade Ras-Raf-1-MEK (Geilen et al., 1995) ist ein von Raf-1 unabhängiger Weg zur ERK1/2 Aktivierung über MEKK1 möglich (Roberts 1992). Durch diese Kinase kann ebenfalls die SAPK-Kaskade aktiviert werden (Minden et al., 1994; Yan et al., 1994). Welche weiteren Verknüpfungen noch zwischen MAPK Kaskaden existieren, ist noch nicht vollständig bekannt. So ist es im vorliegenden Fall denkbar, dass es auf dem Weg von der durch BBI hervorgerufenen Aktivierung des EGF-Rezeptors zum TP53-Protein vor der Phosphorylierung der SAPK

noch zu einem Abzweigen des Signals kommt. Dies könnte ebenfalls auf der Ebene des MEKK1 oder einer weiteren noch unbekanntem Kinase geschehen.

Auch auf der Ebene des Ras kann es zum Abzweigen eines externen Signals kommen, denn die Signaltransduktionskaskade der MAPK und dabei vor allem die der SAPK ist nur ein Beispiel für einen biologischen Prozess, an dem das Ras als molekularer Schalter beteiligt ist. Durch Ras werden eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden gesteuert. In Säugerzellen sind alleine mindestens 4 verschiedene Ras-Genprodukte bekannt, die unterschiedliche Funktionen besitzen (Krauss 1997). Dabei ist das Bild der mit Ras in Zusammenhang stehenden Signaltransduktionskaskaden bisher noch unvollständig, und es kann davon ausgegangen werden, dass einige parallel verlaufende Kaskaden existieren, die wiederum auf unterschiedlichsten Ebenen untereinander vernetzt sein können. Nach Aktivierung des EGF-Rezeptors durch BBI könnte also auch ein von den MAPK unabhängiger Weg eingeschlagen werden.

Interessanterweise zeigt sich aber auch, dass es in der strahleninduzierten Signaltransduktion (UVB) Möglichkeiten gibt, dass bereits vor Aktivierung des Ras, ausgehend vom EGF-Rezeptor, noch andere Signalwege eingeschlagen werden. Z. B. können auf der Ebene des Shc, einem zytoplasmatischen „Signal transducer“, der an der Weiterleitung von mitogenen Signalen vom Rezeptor zu Ras beteiligt ist (Pelicci et al., 1992), von den MAPK-Kaskaden unabhängige stressinduzierte Kaskaden aktiviert werden (Migliaccio et al. 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass eine Splice-Variante des Shc nicht an einer Ras-Aktivierung durch UV-Strahlung beteiligt ist, sondern anderweitig in die UVB-Antwort der Zelle eingebunden ist (Migliaccio et al. 1999). Somit eröffnet sich ein weiterer dem EGF-Rezeptor folgender und von den SAPK unabhängiger Signalweg der UV-Antwort, in den das BBI möglicherweise einzugreifen vermag.

Letztlich könnten noch die weiteren von BBI beeinflussten und vom EGF-Rezeptor unabhängigen, strahleninduzierten PTK-Rezeptoren und ihre folgende Signaltransduktion betrachtet werden.

Auffällig ist an dieser Stelle ein weiteres Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen. Neben den mit dem Antikörper gesuchten Banden der SAPK ist eine weitere Bande zu erkennen, die eine deutliche Kinetik aufzeigt (Abb. 7, 14, 16 und 18, unterste Bande). Da für den verwendeten Antikörper beschrieben ist, dass er neben der SAPK auch größere Mengen an ERK detektiert (New England Biolabs, Data Card #9251S), ist anzunehmen, dass es sich bei der weiteren Bande um ERK handelt. Für diese Bande zeigt sich eine klare Induktion durch BBI bereits 5 Minuten nach Behandlung (Abb. 14).

Diesbezüglich sind Ergebnisse interessant, die eine Aktivierung der ERK's durch UV-Strahlung über den EGF-Rezeptor beschreiben (Kitagawa et al., 2001). Es zeigt sich, dass eine Src-abhängige EGF-Rezeptorphosphorylierung durch UV-Strahlung zu einer schnellen Aktivierung der ERK's führt, was wiederum mit einem erhöhten Zellüberleben in Zusammenhang steht. Die SAPK sind dabei nur partiell von dieser EGF-Rezeptoraktivierung betroffen. Die hier gezeigten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass durch BBI eine sehr schnelle Aktivierung der ERK's stattfindet. Die zeitliche Kinetik mit der raschen Aktivierung stimmt mit den bereits bekannten Verläufen der ERK nach UV-Bestrahlung bzw. EGF-Stimulierung überein (Kitagawa et al., 2001). Es ist also möglich, dass BBI ähnlich wie eine UV-Bestrahlung eine Aktivierung der ERK's bewirkt, die dann zu Überlebens- oder Reparaturvorgängen führt, die der Zelle bei einer tatsächlichen Bestrahlung eine erhöhte Überlebensfähigkeit entsprechend dem BBI-Effekt verleiht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine SAPK-Aktivierung nicht der wesentliche Faktor der radiosensitiven Wirkung des BBI sein kann. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass an eine Mitwirkung der ERK's zu denken ist.

Bisherige Ergebnisse und weitere mögliche Angriffspunkte des BBI können folgendermaßen schematisch dargestellt werden:

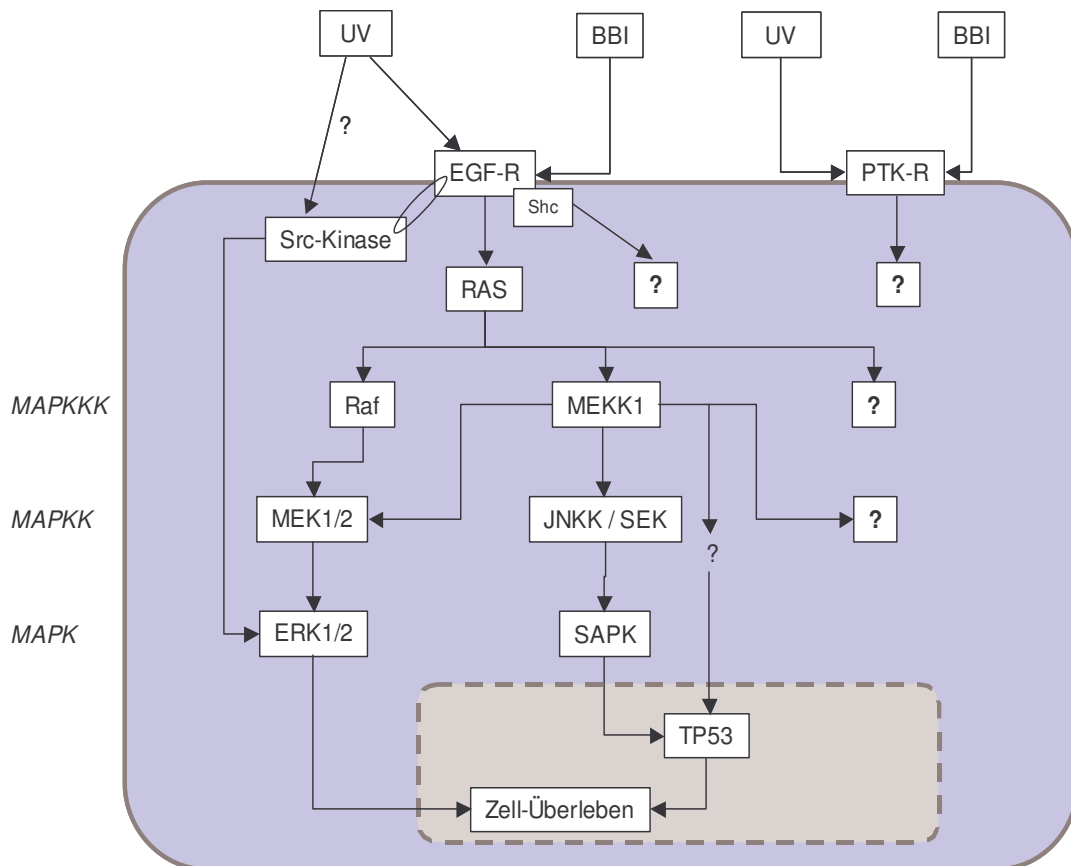


Abb. 20: schematische Darstellung von Teilen der MAPK Kaskade

5.7 Schlussfolgerung

Trotz Kenntnis einiger Zusammenhänge innerhalb der Signaltransduktion der Zelle, die von BBI beeinflusst werden, konnte die vorliegende Arbeit den genauen zellulären Mechanismus der radioprotektiven Wirkung des BBI nicht vollständig aufklären. Es steht fest, dass es eine Vielzahl von Wegen gibt, über die ein Signal eine Zellantwort bedingen kann. Viele dieser Wege verlaufen

parallel oder sind untereinander verbunden. Wo genau BBI in diese Wege einzugreifen vermag, bleibt jedoch weiterhin unsicher. Bezogen auf die Wirkungsweise des BBI lässt sich jedoch sagen, dass eine Beteiligung beziehungsweise ein Eingreifen der Substanz in die strahleninduzierte Signaltransduktion sehr wahrscheinlich ist, da diesbezüglich viele Hinweise existieren. Würde durch weitere Forschung der Mechanismus, der der strahlenprotektiven Wirkung zugrunde liegt, identifiziert werden, könnte ein Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen von zellulärer Radioprotektion geleistet werden. Ebenfalls wäre nach weiterer Prüfung der Verträglichkeit und Nebenwirkungen in der experimentellen Strahlentherapie ein unterstützender Einsatz dieser Substanz in der onkologischen Strahlentherapie denkbar. Daher ist es sicherlich empfehlenswert, auf diesem Gebiet weitere Forschungen zu tätigen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die strahlenprotektive Wirkung des Bowman-Birk Protease Inhibitors mit der Modulation bestimmter durch Strahlung induzierbarer Signaltransduktionskaskaden in Zusammenhang steht. Dazu wurden klonogene Assays und molekulare Untersuchungen auf Proteinebene mittels Western Blots an normalen humanen Hautfibroblasten durchgeführt.

Betrachtet wurde zunächst die Kaskade der „stress activated protein kinase“ (SAPK), einem Mitglied der MAPK-Kaskade. Die Untersuchungen zeigten, dass die Inkubation der Hautfibroblasten mit BBI nicht zu einer Beeinflussung der SAPK-Kaskade führt. Auch eine Aktivierung der SAPK durch den spezifischen Aktivator Anisomycin vor einer UVB-Bestrahlung zur eventuelle Simulierung des BBI-Effekts zeigte keinen strahlenprotektiven Effekt. Beide Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die molekulare Wirkungsweise des BBI nicht auf einer frühzeitigen Aktivierung der SAPK beruht.

Es zeigte sich jedoch die Beeinflussung einer anderen Kinase innerhalb der MAPK-Kaskade durch BBI. Bereits nach kurzer Inkubation der Fibroblasten mit BBI konnte eine Aktivierung der ERK's gesehen werden. Diese Beobachtung stützt die These, dass BBI die zelluläre Signaltransduktion insofern modulieren kann, als dass Kinasen durch BBI aktiviert werden, die an einem erhöhten Zellüberleben nach Bestrahlung beteiligt sind. So könnten bereits vor einer Bestrahlung Mechanismen in der Zelle in Gang gesetzt werden, die zu einem strahlenprotektiven Effekt von BBI führen.

7 Literaturverzeichnis

- Adler V, Polotskaya A, Kim J, Dolan L, Davis R, Pincus M, Ronai Z (1996a): Dose rate and mode of exposure are key factors in JNK activation by UV irradiation. *Carcinogenesis* 17 (9):2073-2076
- Adler V, Pincus M, Polotskaya A, Montano X, Friedman FK, Ronai Z (1996b): Activation of c-Jun-NH2-kinase by UV irradiation is dependent on p21ras. *J Biol Chem* 271 (38):23304-23309
- Adler V, Dolan LR, Kim J, Pincus M, Barrett JC, Ronai Z (1996c): Changes in jun-N-terminal kinase activation by stress during aging of cultured normal human fibroblasts. *Mol Carcinog* 17 (1):8-12
- Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR (1995): p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle check points and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8493-8497
- Ananthaswamy HN, Pierceall WE (1990): Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 52(6):1119-36. Review.
- Anderson CW (1993): DNA damage and DNA-activated protein kinase. *TIBS* 18:433-437
- Billings PC, Newberne PM, Kennedy AR (1990): Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 11: 1083-1086
- Billings PC, St. Clair W, Ryan CA, Kennedy AR (1987): Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by chymotrypsin inhibitor from potatoes. *Carcinogenesis* 8: 809-812
- BonnerJA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K (1994): The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities
- Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC (1994): Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* 14 (11):7352-7362
- Chen YR, Meyer CF, Tan TH (1996): Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271(2):631-4.

- Cox LS, Lane DP (1995): Tumor suppressor, kinases and clamps : how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *BioEssay* 17:501-508
- Dhanwada KR, Dickens M, Neades R, Davis R, Pelling JC (1995): Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene* 11(10):1947-53.
- Derijard B, Hibi M, Wu I-H, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994): JNK1: A Protein Kinase Stimulated by UV Light and Ha-Ras that Binds and phosphorylates the c-jun Activation Domain. *Cell* 76: 1025-1037
- Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M (1992): The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71(7):1081-91.
- Devary Y, Rosette C, DiDonato JA, Karin M (1993): NFkB activation y ultraviolet light is not dependent on nuclear signal. *Science* 261:1442-1445
- Dittmann K, Löffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1995): Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiother Oncol.* 34 (2):137-143
- Dittmann K, Gueven N, Mayer C, Rodemann HP (1998 a): The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA repair-relevant genes. *Int J Radiat Biol* 74 (2):225-230
- Dittmann K, Gueven N, Mayer C, Ohneseit P, Zell R, Begg AC, Rodemann HP (1998 b):The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts. *Radiat Res* 150 (6):648-655.
- Dittmann K, Knaus Dittmann D, Mayer C, Rodemann HP (2001): Bowman-Birk proteinase inhibitor-mediated radioprotection against UV irradiation is TP53-dependent and associated with stimulation of nucleotide excision repair. *Radiat Environ Biophys* 40(2):163-7.
- Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (2002): O-phospho-L-tyrosine Protects TP 53 Wild-Type Cells Against Ionizing Radiation. *Int. J. Cancer (Radiat. Oncol. Invest)* : 96 (Suppl.)1-6 (2001)
- Dhanwada KR, Dickens M, Neades R, Davis R, Pelling JC (1995): Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene* 11(10):1947-53

- Elion EA: Routing MAP Kinase Cascade. *Science* 281: 162-163
- Feuerstein GZ, Young PR (2000): Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res* 45(3):560-9. Review.
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1996): Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379(6563):335-9.
- Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z (1998): MEKK1/JNK signaling stabilize and activates p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10541-10546
- Geilen CC, Wieprecht M, Orfanos C (1996): The mitogen-Activated protein kinase system (MAP kinase cascade): its role in skin signal transduction. A review. *J Derm Sci* 12:255-262
- Gilchrist BA, Park HY, Eller MS, Yaar M (1996): Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol.* 1996 Jan;63(1):1-10. Review.
- Gueven N, Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (1998 a): The radioprotective potential of the Bowman-Birk protease inhibitor is independent of its secondary structure. *Cancer Letters* 125: 77-82
- Gueven N, Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (1998 b): Bowman-Birk protease inhibitor reduces the radiation-induced activation of the EGF receptor and induces tyrosine phosphatase activity. *Int J Radiat Biol* 73 (2):157-162
- Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ (1995): Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267(5196):389-93.
- Hazzalin CA, Panse R, Le, Cano E, Mahadevan LC. (1998): Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol Cell Biol* 18 (4):1844-1854
- Herskowitz I (1995): MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80(2):187-97.
- Holick MF, Maclaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P (1980): Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210(4466): 203-5.

- Howard SP, Groch KM, Lindstrom MJ, Messing EM, Gould MN (1995): Proliferation-independent growth factor modulation of the radiation sensitivity of human prostate cells. *Radiat Res* 143:229-233
- Kallunki T, Su B, Tsigenny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis RJ, Karin M (1994): JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 8(24):2996-3007.
- Kennedy AR, Little JB (1981): Effect of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res.* 41:2103-2108
- Kennedy AR (1994): Prevention of carcinogeneses by protease inhibitors. *Cancer Research* 54: 1999-2005
- Kerr JFR, Harmon BV (1991): Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective, In Tomei LD and Cope FO (eds) *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Kitagawa D, Tanemura S, Ohata S, Shimizu N, Seo J, Nishitai G, Watanabe T, Nakagawa K, Kishimoto H, Wada T, Tezuka T, Yamamoto T, Nishina H, Katada T (2002): Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase by Ultraviolet Is Mediated through Src-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation. *J Biol Chem* 277(1):366-371
- Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P (1996): Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* 15(19):5314-25.
- Krauss G: Signalübertragung durch Ras-Proteine. In: *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 328-350
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992): Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(16):7491-5.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. (1994): The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369(6476):156-60.
- Kyriakis JM, Avruch J (1996): Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18 (7): 567-577
- Lallemant D, Ham J, Garbay S, Bakiri L, Traincard F, Jeannaquin o, Pfarr C, Yaniv M (1998): Stress-activated protein kinases are negatively regulated by cell density. *EMBO Journal* 17 (19): 5615-5626

- Lane DP(1992): p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
- Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, Sallam F, Frome EL (1993): Concentration-dependent protection against X-ray chromosome abberation in human lymphocytes by the aminothioliol WR-1065. *Radiat. Res.* 133: 88-93
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW Osborn BA, Jacks T (1993): p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362(6423):847-9.
- Madar Z, Birk Y, Gertler A (1974): Native and modified Bowman-Birk trypsin inhibitor-comparative effect on pancreatic enzymes upon ingestion by quails. *Comp Biochem Physiol* 48B:251-256
- Maeder DL, Sunde M, Botes DP (1992): Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. *Int J Peptide Protein Res* 40: 97-102
- Mahadevan LC (1991): Signalling and superinduction. *Nature* 349(6312):747-8.
- Marshall CJ (1994): Signal transduction. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature* 367(6465):686
- Mendrano EE, Im S, Yang F, Abdel-Malek ZA (1995): Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res* 55(18):4047-52.
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolf PP Lanfrancone L, Pelicci PG: The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402: 309-313
- Minden et al. (1994): Differentiation activation of ERK and JNK mitogen activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266: 1719-1723
- Mukthar H, Mercurio MG, Agarwal R (1995): *Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance*. Mukthar H (ed.) CRC Press, Inc.: Boca Raton, Fl.pp3-12
- Oreffo VI, Billings PC, Kennedy AR, Witschi H (1991): Acute effects of the Bowman-Birk protease inhibitor in mice. *Toxicology* 69:165-176
- Pellici G, Lanfrancone L, Grigniani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pelicci PG (1992): A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70(1):93-104.

- Pentland AP, Mahoney M, Jacobs SC, Holtzman MJ (1990): Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation. A mechanism for irradiation erythema. *J Clin Invest* 86(2):566-74.
- Pfarr CM, Mechta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S, Yaniv M (1994): Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* 76(4):747-60.
- Potapova O, Basu S, Mercola D, Holbrook NJ (2001): Protective Role for c-Jun in the Cellular Response to DNA Damage. *J Biol Chem* 276(30):28546-53
- Price MA, Cruzalegui FH, Treisman R (1996): The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J* 15(23):6552-6563
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR (1991): Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353(6345):670-4.
- Rana K, Sood A, Malhotra N (1993): Radioprotektion of chick thymus by vitamin E. *Indian J Exp Biol* 31:847-849
- Ramaswamy NT, Ronai Z, Pelling JC (1998): Rapid activation of JNK1 in UV-B irradiated epidermal keratinocytes. *Oncogene* 16(11):1501-5.
- Roberts TM (1992): A signal chain of events. *Nature* 360:534-535
- Rodemann HP, Peterson HP, Schwenke K, von Wangenheim K-H (1991): Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scann Microsc* 5:1135-1143
- Rosette C, Karin M (1996): Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274(5290):1194-7.
- Sachsenmaier C, Radler-pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ (1994): Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* 78:963-972
- Smeal T, Binetruy B, Mercola D, Grover-Bardwick A, Heidecker G, Rapp UR, Karin M (1992): Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol Cell Biol* 12(8):3507-13.
- Sobin BA, Tanner FW (1954): Anisomycin, a new antiprotozoan antibiotic. *J Am Chem Soc* 76, 4053

- St. Clair WH (1991): Suppression of 3-methylcholanthrene-induced cellular transformation by timed administration of Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 12(5): 935-937
- Törocsik B, Szeberenyi J (2000a): Anisomycin affects both pro- and antiapoptotic mechanisms in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278(3):550-6.
- Törocsik B, Szeberenyi J (2000b): Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 phaeochromocytoma cells. *Eur J Neurosci* 12(2):527-32.
- Von Hofe E, Newberne PM, Kennedy Ar (1991): Inhibition of n-Nitromethylbenzylamin-induced esophageal neoplasms by the bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 12(11):2147-2150
- Wang XZ, Ron D: Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272(5266):1347-9.
- Weiss FU, Daub H, Ullrich A (1997): Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr Opin Genet Dev* 7:80-86
- Westwick JK, Weitzel C, Minden A, Karin M, Brenner DA (1994): Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J Biol Chem.* 269(42):26396-401.
- Wisdom R, Johnson RS, Moore C (1999): c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 18(1):188-197
- Yoshimura T, Matsuno K, Miyazaki T, Suzuki K, Watanabe M (1993): Elektro spin resonance studies of free radicals in gamma irradiated golden hamster embryo cells: radical formation at 77 and 295K, and radioprotective effects of vitamin C at 295K. *Radiat Res* 136:361-365
- Yan et al. (1994): Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of SEK1. *Nature* 372:798-800
- Yavelow J, Collins M, Birk Y, Troll W, Kennedy AR (1985): Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray-induced transformation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(16): 5395-5399
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science* 270: 1326-31

8 Abkürzungen

Ani	Anisomycin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BBI	Bowman-Birk Protease Inhibitor
BSA	Rinderserumalbumin
CSPD	Disodium3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetane-3,3`-(5`-chloro)tricyclodecan)-4-yl)phenylphosphat
DMEM	Dulbecos modified Eagels Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FCS	Foetales Kälberserum
Fos	Onkogen aus dem FBR-Mäuse-Osteosarkoma-Virus
g	Gramm oder Zentrifugalbeschleunigung
Gadd45	growth arrest and DANN damage inducible protein 45 kDa
Gy	Gray
h	Stunde
HSF	humane Hautfibroblasten
JNK	c-jun N-terminale kinase
Jun	Abk. vom japanischen „ju-nana“=17; Onkogen
KD	Kilodalton
Lsg.	Lösung
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogen aktivated protein kinase

Abkürzungen

MAPKK	mitogen aktivated protein kinase kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
min	Minute
ml	Milliliter
Myc	myelocytomatosis oncogene
nm	nanometer
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Tyrosinkinase
RPTK	Rezeptortyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAPK	stress activated protein kinase
SDS	Na-Dodecylsulfat
SF	survival fraction
src	Rous sarcoma virus; Onkogen
SRF	serum responsive factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP53	tumor suppressor protein 53 kDa
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

Danksagung

Eine Seite für die Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Vielen Dank an

meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. P. Rodemann, Leiter der Sektion für Strahlenbiologie der Radiologischen Klinik der Universität Tübingen, für die Vergabe des interessanten Themas und die außerordentlich gute und zuverlässige Betreuung der Arbeit,

Dr. habil. Klaus Dittmann für die fachliche Unterstützung, das Verständnis und die große Hilfsbereitschaft die mir durch Ihn zuteil wurde,

Claus Mayer für die großzügige Bereitstellung seiner Laborerfahrung, die praktische Anleitung im Labor und seinen Humor,

alle Mitarbeiter des Labors für die Offenheit und Freundlichkeit, mit der sie mich in Ihrem Kreis aufgenommen haben. Insbesondere hatten Oliver, Lan, Petra und Marcel einen großen Anteil an der aufbauenden und unterstützenden Atmosphäre im Labor.

Herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern Magrit Renz und Richard Bauer, die mich mit Ihrer Liebe und großem Vertrauen während meines Studiums uneingeschränkt unterstützt haben.

Mein Dank gehört auch meinem Mann Holger, der immer an mich glaubt, mir zuhört und mich aufbaut; ohne Ihn hätte ich mein Ziel nicht erreicht.

Danke an meinen kleinen Sohn Luke, der mich - weinend und lachend - einen großen Teil dieses Weges begleitet hat.

Lebenslauf

Name **Jasmin Susann Hermann** (geb. Bauer)
Geburtsdatum/-ort 01.01.1975 / Stuttgart

Schulausbildung

1981 – 1985 Grundschohle Sillenbuch/Stuttgart
1985 – 1994 Geschwister-Scholl-Gymnasium in
Stuttgart-Sillenbuch
Juni 1994 Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 1994-Sept. 1995 Studium der Technischen Biologie an der Universität
Stuttgart
Okt. 1995 Beginn des **Studiums der Humanmedizin** an der
Eberhardt-Karls-Universität/Tübingen
Sept. 1997 **Ärztliche Vorprüfung**
Aug. 1998 **Erstes Staatsexamen**
März 2001 **Zweites Staatsexamen**
April 2001-August 2001 Praktisches Jahr/1.Tertial: Innere Medizin bei
Prof. Dr. Habscheid, Paracelsus-Krankenhaus
Ruit/Ostfildern
April 2002-Aug. 2002 2.Tertial: Allgemein- und Unfallchirurgie bei
Prof. Dr. Hölting und PD Dr. Hehl, Paracelsus-
Krankenhaus Ruit/Ostfildern
Aug. 2002-Okt. 2002 3.Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe bei Dr. med.
F. Sommer, Paracelsus-Krankenhaus Ruit/Ostfildern
Okt. 2002- Dez. 2002 3.Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe bei Prof. Dr.
med. G.B. Theron, Tygerberghospital/ University of
Stellenbosch (Südafrika)
13. Mai 2003 **Drittes Staatsexamen**