

**Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg**

**Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung**

**Leiter: Professor Dr. H. P. Rodemann**

**In vitro-Untersuchungen zur radioprotektiven Wirkung  
des Bowman-Birk Proteinaseinhibitors nach  
Bestrahlung mit UVB**

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

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

**vorgelegt von**

**Daniele Knaus-Dittmann, geb. Knaus  
aus  
Bamberg**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Rodemann

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Berneburg

## **Meiner Familie**

---

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1.0 Einleitung</b>	7
<b>1.1 Physikalische und biologische Grundlagen</b>	7
<b>1.2 Biologische Reaktionen der Haut auf UV-Strahlung</b>	8
<b>1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	13
<b>2.0 Material und Methoden</b>	14
<b>2.1 Zellkultur</b>	14
2.1.1 Grundlagen	14
2.1.2 Bestrahlung mit UVB	14
2.1.3 Bestimmung verschiedener Zellparameter	15
2.1.3.1 Bestimmung der Zellzahl	15
2.1.3.2 Klonogener Assay	15
2.1.3.3 Messung des Differenzierungsstatus	16
2.1.3.4 Bestimmung der Reparatur-Kinetik für Thymindimere	16
2.1.3.5 Bestimmung der Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	16
2.1.3.6 Quantitativer Nachweis der Apoptose	17
<b>2.2 Proteinbiochemie</b>	18
2.2.1 Fluoreszenz-Markierung von BBI	18
2.2.2 Auftrennung von Proteinen und immunologischer Nachweis	18
2.2.2.1 Auftrennung von Proteinen	18
2.2.2.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	19
2.2.2.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten TP53- bzw. p21-Antigenen	19
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden</b>	20
2.3.1 "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA)	20
2.3.1.1 Kernextraktion	20
2.3.1.2 TP53-EMSA	20

2.3.2 Northern Nachweis von TP53/ERCC3/Ligase- und GAPDH-mRNA	21
2.3.2.1 Herstellung und Markierung der Northern Blot-Sonden	21
2.3.2.2 Radioaktive Markierung der PCR-Sonden	22
2.3.2.3 RNA-Isolation	22
2.3.2.4 Umschreiben der RNA in cDNA	22
2.3.2.5 Northern Blot	23
2.3.2.6 Hybridisierung	24
<b>3.0 Ergebnisse</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Physikalische Kenngrößen für das Arbeiten mit UVB</b>	<b>25</b>
3.1.1 Lampencharakteristika	25
3.1.2 Bestimmen der Dosis-Zeit-Korrelation	25
3.1.3 Abschätzen des biologisch relevanten UVB-Dosisbereichs	27
<b>3.2 Biologische Kenngrößen für das Arbeiten mit UVB und BBI</b>	<b>28</b>
3.2.1 Austesten der optimalen BBI-Konzentration	28
3.2.2 Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von BBI	30
<b>3.3 Quantifizierung des radioprotektiven Effekts von BBI</b>	<b>30</b>
3.3.1 Quantifizierung des radioprotektiven Effekts von BBI nach Bestrahlung mit 100 J/m <sup>2</sup> UVB über Klonanzahl und Morphologie	31
3.3.2 Klonales Überleben normaler humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit verschiedenen UVB-Dosen und BB-Präinkubation	32
<b>3.4 Einfluss von BBI auf die Regulation der strahleninduzierten Zellantwort</b>	<b>33</b>
3.4.1 Zellzyklusanalyse normaler humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVB	34
3.4.1.1 Zellzyklusanalyse im Dosisbereich unter 20 J/m <sup>2</sup>	34
3.4.1.2 Zellzyklusanalyse im Dosisbereich über 20 J/m <sup>2</sup>	37
3.4.2 Bestimmung des Effekts von BBI auf die Zellproliferation in Massenpopulationen	37
3.4.3 BBI-Effekt auf die strahleninduzierte Zell-Differenzierung	38

3.4.4 BBI-Effekt auf die strahleninduzierte Apoptose	40
<b>3.5 Einfluss von BBI auf die molekulare Regulation der strahleninduzierten Zellantwort</b>	42
3.5.1 Einfluss von BBI auf die strahleninduzierte TP53-Proteinexpression	42
3.5.2 Einfluss von BBI auf die DNA-bindende Aktivität des TP53-Moleküls	44
3.5.3 Einfluss von BBI auf die Proteinexpression des p21/waf1/cip	46
3.5.4 Einfluss von BBI auf die mRNA-Expression von TP53, Ligase I und ERCC3	47
<b>3.6 Molekulare Effekte von BBI während der Präinkubationsphase vor der Bestrahlung</b>	48
<b>3.7 Einfluss von BBI auf die DNA-Reparaturkapazität der Zelle</b>	49
3.7.1 Klonbildungs-Assay nach verschiedenen DNA-Reparaturzeiten („delayed plating“)	49
3.7.2 Effekt von BBI auf die Nukleotid-Exzissions-Reparatur	50
<b>4.0 Diskussion</b>	51
4.1 Der Bowman-Birk Proteinaseinhibitor - BBI	51
4.2 Einfluss von BBI auf die strahleninduzierte Zellantwort	53
4.3 Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus von BBI	57
<b>5.0 Zusammenfassung</b>	61
<b>6.0 Literaturverzeichnis</b>	63
<b>7.0 Abkürzungen</b>	68
<b>8.0 Danksagung</b>	70
<b>9.0 Lebenslauf</b>	71

## 1.0 Einleitung

### 1.1 Physikalische und biologische Grundlagen

Licht ist die üblichste Form elektromagnetischer Strahlung, die der Mensch wahrnimmt. Dabei entspricht Licht nur einem kleinen Frequenzbereich des Spektrums elektromagnetischer Strahlung. Beispiele für elektromagnetische Strahlung sind kosmische Strahlung, Röntgenstrahlung, Radiowellen, Fernsehsignale und Mikrowellen. Elektromagnetische Strahlungen sind durch ihre Wellenlänge und ihre Frequenz charakterisiert. Die Bestandteile des Lichtes werden nach ihrer Wellenlänge verschiedenen Fenstern zugeordnet: Infrarot 1000 - 780 nm, sichtbares Licht der Wellenlänge 780 - 400 nm, ultraviolettes Licht A (= UVA) der Wellenlänge 400 - 320 nm, UVB der Wellenlänge 320 - 280 nm und UVC der Wellenlänge 280 - 200 nm. Die intakte Erdatmosphäre lässt neben dem sichtbaren Licht nur UVA ungehindert passieren, vom UVB erreichen nur etwa 10 % die Erdoberfläche und UVC wird vollständig absorbiert. Die Eindringtiefen von UVA, UVB und UVC in die Haut unterscheiden sich beträchtlich (Abb. 1)

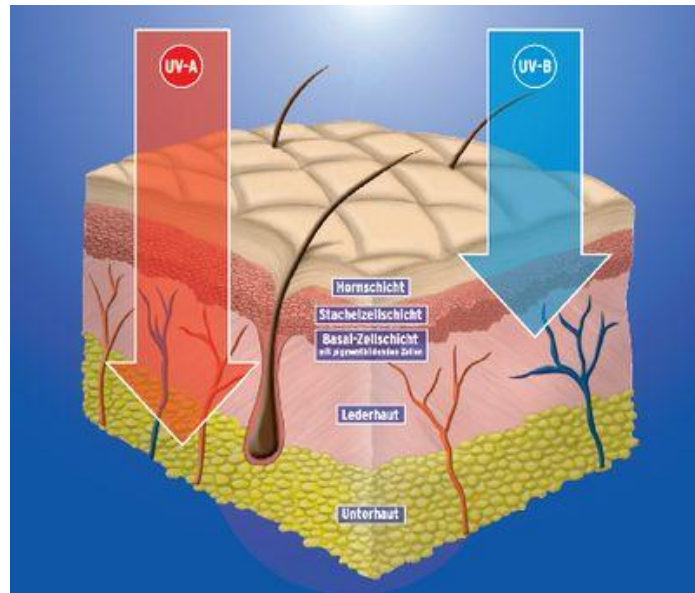


Abb. 1: Eindringtiefe von UVA- und UVB--Strahlung in die menschliche Haut (aus [http://www.springer-gup.de/media/elearning/2009\\_08\\_Sonnenschutz/neu/UV\\_Bild.jpg](http://www.springer-gup.de/media/elearning/2009_08_Sonnenschutz/neu/UV_Bild.jpg), Stefanie Fastnacht)

## 1.2 Biologische Reaktionen der Haut auf UV-Strahlung

Die Sonnenlichtbestandteile UVA und UVB induzieren eine breite Palette von physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen in der Haut. So spielt UV zum Beispiel über seinen Effekt auf den Vitamin D-Stoffwechsel eine Schlüsselrolle bei der Verhinderung der Rachitis des Menschen (Holick, MacLaughlin et al. 1980). Die UV-induzierte Hautbräunung, bedingt durch die Stimulation der Melaninproduktion in der Haut, hat wahrscheinlich eine Schutzfunktion bei der sonneninduzierten Hautkrebsentstehung (Gilchrest, Park et al. 1996). Neben diesen positiven Effekten hat UV-Strahlung aber auch pathophysiologische Effekte wie z. B. das Hauterythem (Pentland, Mahoney et al. 1990), die verfrühte Hautalterung (Kang, Fisher et al. 1997) und die Hautkrebsinduktion (Ananthaswamy and Pierceall 1990); (Roddey, Garmyn et



al. 1994). Vor allem der Abbau der Ozonschicht in der Stratosphäre durch die Fluorkohlenwasserstoffe führt dazu, dass immer mehr UV-Strahlung mit mutagenem Potential die Erdoberfläche erreicht. Prognosen gehen davon aus, dass sich in der nahen Zukunft der Ozongehalt in der Stratosphäre mittlerer Breiten um etwa 7 - 10 % reduzieren wird und damit die Inzidenz für den Nicht-Melanom Hautkrebs um etwa 16 % (Madronich and de Gruijl 1994) und für das maligne Melanom um etwa 20 % ansteigt (Moan and Dahlback 1992). Vor allem bei Kindern, die im Vergleich zum Erwachsenen eine etwa dreimal so hohe Sonnenexposition pro Jahr aufweisen, sind sonnenprotektive Maßnahmen wichtig und können die Wahrscheinlichkeit später an Hautkrebs zu erkranken deutlich reduzieren (Truhan 1991). So ist das Interesse am Verständnis der durch die UV-Bestrahlung induzierten Vorgänge und die daraus für die molekulare Reaktion der Zelle resultierenden Konsequenzen sprunghaft gestiegen und man kann die Hoffnung hegen, in Zukunft durch gezielte Eingriffe in die Zellreaktion die Entstehung von UV-induzierten Tumoren reduzieren zu können.

In den letzten Jahren wurden viele Versuche unternommen die zellulären Signaltransduktionswege aufzuklären, die diese UV-induzierten Zellreaktionen steuern. So konnte gezeigt werden, dass initial innerhalb weniger Minuten die UV-Exposition von Zellen zur Aktivierung von Tyrosinkinaserzeptoren führt (z. B. des EGF-Rezeptors) (Sachsenmaier, Radler-Pohl et al. 1994). Dabei ist der Aktivierung des EGFR mit einem radioprotektiven Effekt verknüpft (Cao, Lu et al. 2008). Der aktivierte Rezeptor transduziert das Bestrahlungssignal in bislang unbekannter Weise auf andere Mediatoren, was zur Aktivierung der Phospholipase C führt (Schmidt-Ullrich, Mikkelsen et al. 1997). Phospholipase C spaltet den Membranbestandteil Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in 1,4,5,-Trisphosphat und 1,2-Diacylglycerol. Letzteres aktiviert die Proteinkinase C (Balaban, Moni et al. 1996). Die Aktivierung der PKC kann zur Inaktivierung des Inhibitors des Transkriptionsfaktors NF-Kappa-B führen und als Konsequenz kommt es zur Transkription von NF-Kappa-B abhängigen Genen

(Devary, Rosette et al. 1993). Daneben konnte gezeigt werden, dass UV-Strahlung auch zur Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren führt, wie z. B. AP1 (Devary, Gottlieb et al. 1992) und des "serum response factor", SRF (Sachsenmaier, Radler-Pohl et al. 1994). Die UV-induzierte Aktivierung von AP1 (Dimer aus fos und jun) wird den c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) zugeschrieben, die zur Gruppe der MAP-Kinasen ("mitogen activated kinases") gehören (Englaro, Derijard et al. 1998). Aber auch die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 werden durch UV aktiviert und führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ternären Komplex. Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren und die Transkription der von ihnen regulierten Gene führt wahrscheinlich zur komplexen Zellantwort nach UV-Bestrahlung (Englaro, Derijard et al. 1998).

Neben dieser indirekten Einflussnahme auf die Expression von Genprogrammen über die zelluläre Signaltransduktion kann Strahlung auch einen direkten Effekt aufweisen. DNA-Schäden, wie Einzelstrang- bzw. Doppelstrangbrüche, können direkt zur Aktivierung der DNA-Proteinkinase führen (Rapp and Greulich 2004) und durch deren Aktivität kommt es zur Phosphorylierung, Stabilisierung und Aktivierung von Proteinen wie z. B. TP53 (Cox and Lane 1995). Das TP53-Protein ist wahrscheinlich einer der wichtigsten Faktoren der DNA-Schadenskontrolle der Zelle (Lane 1992; Benjamin and Ananthaswamy 2007). Nach Exposition der Zelle mit UV oder anderen DNA-schädigenden Noxen kommt es zur Proteinakkumulation von TP53 im Kern und nachfolgend zur transkriptionellen Aktivierung von TP53-spezifischen Genen (Cox and Lane 1995; Dregoes, Rybak et al. 2007). Die Aktivierung von TP53 führt zum Zellzyklusarrest in der Zellzyklusphase G1 oder G2. So gewinnt die Zelle Zeit, um die DNA-Schäden zu reparieren (Kastan, Onyekwere et al. 1991). Kann die genetische Integrität der Zelle nicht gewahrt werden, wird unter Einbeziehung von TP53 der Zelltod dieser Zellen eingeleitet (Wu, Xing et al. 2007) (Lowe, Schmitt et al. 1993). An der Regulation dieser Vorgänge ist die transaktivierende Aktivität von TP53 wesentlich beteiligt. TP53

bindet und induziert die Transkription mehrerer für Zellwachstum, DNA-Reparatur und Apoptoseregulation essentieller Gene, wie z. B. ERCC3, p21/waf/cip, Bcl2 und Bax (Daino, Ichimura et al. 2006; Wu, Xing et al. 2008).

Die durch UV in der DNA induzierten Hauptschäden sind die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und das Pyrimidin-Pyrimidone-(6-4)-Photoprodukt (Ikehata, Yanase et al. 2007). Beide Mutationen können mit Hilfe der Nukleotid-Exzissions-Reparatur (Ikehata, Yanase et al. 2007) sehr effizient repariert werden. Bei einer unvollständigen oder fehlerhaften Reparatur kann es zur Bildung von DNA Doppelstrang-Brüchen kommen, die gar nicht oder nur sehr schwer repariert werden können (Hanasoge and Ljungman 2007). Generell wird davon ausgegangen, dass Fehler bei der UV-induzierten DNA-Reparatur als erste Schritte der Photokarzinogenese angesehen werden können (Blyumin, Hu et al. 2007).

UV-Schäden der Haut versucht man durch das Aufbringen von strahlenblockenden Cremes zu verhindern, die einen Großteil der eingestrahlten Energie absorbieren oder reflektieren. Die in den letzten Jahren erworbenen Kenntnisse über die molekularen Reaktionen in der Zelle nach UV-Bestrahlung lassen jedoch auch die Möglichkeit zu, Substanzen einzusetzen, die in der Lage sind, in die strahleninduzierte Signaltransduktion einzugreifen und die resultierende Zellantwort in der gewünschten Weise zu beeinflussen. Eine dieser Substanzen ist der Bowman-Birk Proteinase-Inhibitor (BBI) (Abb. 2). Es ist bekannt, dass durch die Applikation von BBI in vitro und in vivo eine strahleninduzierte Zelltransformation verhindert werden kann (Baturay and Roque 1991).

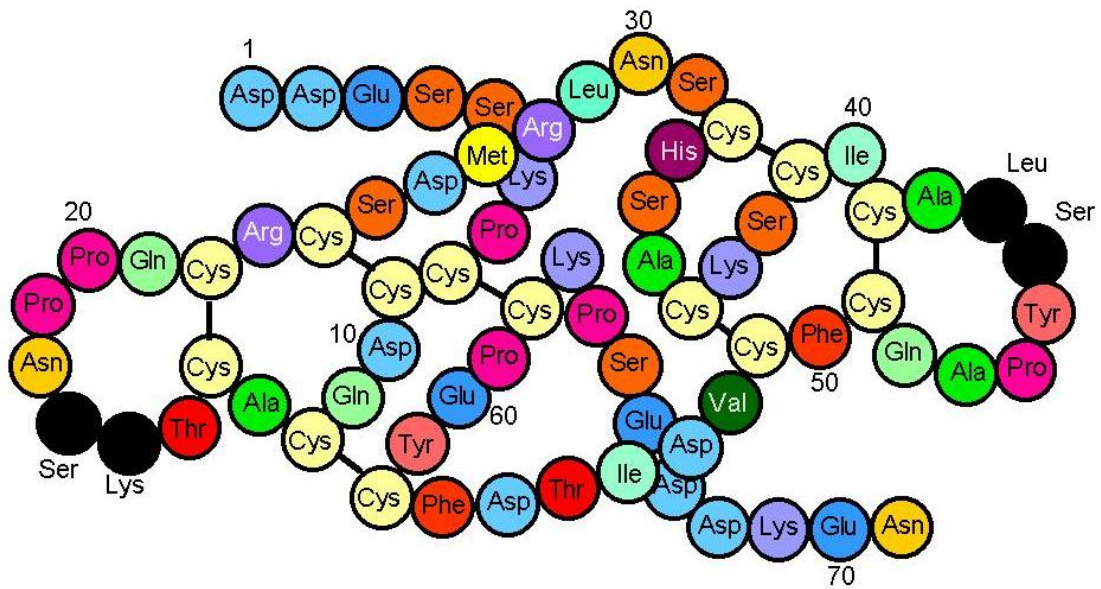


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des Bowman-Birk Proteinaseinhibitors

Es ist bekannt, dass durch die Applikation von BBI *in vitro* und *in vivo* eine strahleninduzierte Zelltransformation verhindert werden kann (Baturay and Roque 1991).

### **1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, in welchem Ausmaß strahleninduzierte Zellantworten wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch eine Applikation von BBI beeinflusst werden können. Ein Schwerpunkt soll insbesondere die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus sein, um damit letztendlich die Frage zu beantworten, ob diese Substanz als Radioprotektor nach UV-Bestrahlung einsetzbar ist.

## **2.0 Material und Methoden**

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Soweit nicht anders aufgeführt wurden alle Zellkulturmaterialien von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen.

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Grundlagen**

Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit dem Hautfibroblastenzellstamm HSF6 durchgeführt. Diese Fibroblasten wurden aus einem Hautstück (Wundrand) der Leistengegend eines 6-monatigen Mädchens im Jahr 1993 isoliert. Die menschlichen Hautfibroblasten HSF6 wurden in DMEM (Gibco, Eggenstein) mit 10 % fötalem Kälberserum (= FCS)(Gibco, Lot-Nummer 40G7285K), 100 U/ml Penicillin (Gibco) und 0.1 mg/ml Streptomycin (Gibco) bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kulturen wurden 1-mal wöchentlich passagiert und alle 3 - 4 Tage das Kulturmedium gewechselt (Hoffmann et al., 1994). Vor Beginn der Experimente wurden ausreichend Zellen einer Passage in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, so dass alle Versuche mit Fibroblasten in der Passage 10 bis 15 (entspricht „cpd“ 18 - 25) durchgeführt werden konnten. Der Zellstamm wurde regelmäßig auf Mykoplasmeninfektion getestet. Die Inkubation mit BBI (10 µM) wurde für 16 h vor der Bestrahlung durchgeführt.

#### **2.1.2 Bestrahlung mit UVB**

Die Standardbestrahlung der humanen Fibroblasten wurde mit konfluenten Kulturen durchgeführt. Hierfür wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen wurde 2-mal mit PBS gespült und nach dem Absaugen die Bestrahlung durchgeführt. Die Bestrahlungen wurden mit einer portablen UV-Lampe

durchgeführt (Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, Frankreich). Die Lampe verfügt über 2 UV-Röhren mit einer Leistung von je 6 Watt für den Wellenbereich UVA (365 nm) und UVB (312 nm). Die Strahlenqualität wird durch Verwendung spezifischer Filter sichergestellt. Die Dosimetrie wurde mit Hilfe eines Kompaktdosimeters (RM21) der Firma Dr. Gröbel UV-Elektronik (Ettlingen) durchgeführt (letzte Kalibrierung April 2001).

### **2.1.3 Bestimmung verschiedener Zellparameter**

#### 2.1.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Fibroblasten mit Hilfe von Trypsin (Gibco) abgelöst und Aliquots von je 100 µl entnommen. Die Zellzahl wurde im CASY-Analyser (Schärfe-Systems, Reutlingen) elektronisch bestimmt.

#### 2.1.3.2 Klonogener Assay

Für die Bestimmung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung wurden Fibroblastenkulturen entweder direkt nach der Bestrahlung („immediate plating“) oder nach einer weiteren Inkubationszeit von 6 - 8 Stunden („delayed plating“) abtrypsiniert und mit einer Zellzahl von 1500 Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in Medium mit 20 % FCS ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die Klonkulturen durch Zugabe von Formaldehyd (2.5 % in PBS) für 10 min und von Ethanol (70 %) für 10 min fixiert. Für die Färbung wurden die Zellklone mit einer Coomassie-Lösung (0.5 g G250/l in 20 % Methanol/7.5 % Eisessig) für 1 min versetzt und nachfolgend mit Giemsa-Lösung (4 ml Giemsa auf 100 ml Sörensenpuffer) für 40 min gegengefärbt. Nach dem Trocknen wurden alle Klone größer 50 Zellen ausgezählt. Zur statistischen Absicherung wurde jedes Experiment je 3-mal durchgeführt und jeder Messwert als Mittelwert von fünf Einzelwerten ermittelt.

### 2.1.3.3 Messung des Differenzierungsstatus

Klonkulturen wurden nicht nur nach dem Kriterium größer oder kleiner 50 Zellen analysiert, sondern auch nach ihrem Differenzierungsstatus. Dabei wurden Klone in die Kategorien Differenzierungszustand I, II, III, oder postmitotisch nach phänotypischen Kriterien eingeordnet (Bayreuther, Rodemann et al. 1988).

### 2.1.3.4 Bestimmung der Reparatur-Kinetik für Thymindimere

Normale Fibroblasten wurden in eine 4-well Gewebekulturplatte (Nunc, Wiesbaden) (50000 Zellen pro well) ausgesät. Nach 24 h wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen 1-mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVB bestrahlt. Das Medium wurde wieder zugefügt und die Zellen wurden unter ambienten Bedingungen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit 1 N HCl für 40 min inkubiert. Der Zellrasen wurde durch Inkubation mit 3 % BSA in PBS abgesättigt. Residuelle Thymindimere wurden mit Hilfe eines Antikörpers (2 h Inkubationszeit) nachgewiesen (1:500) (MC-062, Kamiya Biomedical, Tukwila, WA, USA). Der gebundene Antikörper wurde mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers markiert. Die Anzahl gefärbter Kerne pro Well wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten aufgeführt.

### 2.1.3.5 Bestimmung der Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Exponentiell wachsende Fibroblastenkulturen wurden für 30 min mit BrdU (20 mM) inkubiert und am Ende der Markierungsphase mit verschiedenen Dosen UVB bestrahlt. Nach 24 h wurden die Kulturen abgestoppt und die Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt. Dazu wurden die Zellen



durch Zentrifugation sedimentiert und in 2 ml Ethanol fixiert. Danach wurden die Zellen 1-mal mit 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und für 10 min mit Pepsin (0.5 % Pepsin 1.200 U/g in 94.5 ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit 5.5 ml 1 N HCl auf 100 ml aufgefüllt) bei 37 °C verdaut. Die so isolierten Kerne wurden durch Zentrifugation bei 1000 g sedimentiert, einmal mit 0.9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und durch Inkubation in 2 N HCl permeabilisiert. Nach 2-maligem Waschen wurde in die DNA eingebautes BrdU durch Inkubation für 30 min mit einem primären Antikörper markiert (Becton-Dickenson, 1 : 20) und nachfolgend der Immunglobulinkomplex durch Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper FITC markiert (30 min im Dunkeln). Nach einem Waschschrift wurde den Proben Propidiumjodidlösung (25 µM in 0.1 M Tris/0.1 M NaCl) im Verhältnis 1: 0.2 zugefügt. Die so markierten Kerne wurden im FACscan der Firma Becton Dickinson gemessen. Dabei wurde sowohl der DNA-Gehalt als auch das Ausmaß des BrdU-Einbaus pro Zelle analysiert und in Relation zueinander gesetzt. So wurde eine Zuordnung zu den einzelnen Zellzyklusphasen möglich

#### 2.1.3.6 Quantitativer Nachweis der Apoptose

Der Nachweis wurde mit dem „Cell Death Detection ELISA“ der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen abtrypsinisiert und Aliquots von 100.000 Zellen in 0.5 ml Lysispuffer aufgenommen und die Kerne abzentrifugiert. Im Überstand (entspricht den zytoplasmatischen Bestandteilen der Zellen) wurde mit Hilfe eines Sandwich-Elisas Histongebundene DNA nachgewiesen. Die Quantität der DNA im Zytoplasma steht in direkter Abhängigkeit zum Ausmaß der Apoptose in der Kultur (Duke, Cohen et al. 1986).

## **2.2 Proteinbiochemie**

### **2.2.1 Fluoreszenz-Markierung von BBI**

5 mg BBI wurden in 5 ml 0.5 M Na-Bikarbonatpuffer (pH 9.2) gelöst und 65 µl einer FITC-Stammlösung (25 µg FITC/ml Aceton) hinzugefügt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Freies FITC wurde vom markiertem FITC-BBI durch Zentrifugieren mit Centriprep-Säulen (cutoff 10 kd, Amicon, Witten) und nachfolgender Dialyse abgetrennt.

### **2.2.2 Auftrennung von Proteinen und immunologischer Nachweis**

#### **2.2.2.1 Auftrennung von Proteinen**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen wurde in 15 %-igen, 1 mm dicken, Polyacrylamidgelen durchgeführt. Für ein Trenngel wurden 5 ml Trispuffer (1.5 mM Tris-Base, 0.4 % SDS, pH 8.8), 7 ml aqua bidest, 8 ml 30 %-iger Acrylamidlösung (37.5 : 1), 100 µl 10 %-ige Ammoniumpersulfat (APS) und 10 µl TEMED gemischt und sofort in die Gelkassette (GE600, Hoefer/Pharmacia, Freiburg) gegossen. Für das Sammelgel wurden 1.25 ml Sammelgelpuffer (0.5 mM Tris-Base, 0.4 % SDS, pH 6.8), 3 ml aqua bidest, 0,75 ml 30 %-ige Acrylamidlösung, 100 µl APS und 5µl TEMED gemischt und das Trenngel damit überschichtet. Alle Proteinproben wurden in reduzierenden Probenpuffer aufgenommen (1 : 1) (12.5 mM Tris-Base, pH 6.8, 80 mM EDTA, 1 % SDS, 20 % Glycerin, 10 mM Pefablock (Roth, Karlsruhe), 1 mM Phenanthrolin (Roth), 10 mM E64, 1 mM DTT) und für 4 min bei 96 °C gekocht. Die Proben wurden aufgetragen und bei 25 mA und bei RT aufgetrennt. Die Molekularmassenbestimmung wurde mit Hilfe eines Molekularmassenmarkers durchgeführt (Promega, Heidelberg).

### 2.2.2.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach der Auftrennung der Proteine mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine mit einem Semidry-System (Hoefer/Pharmacia) auf Nitrozellulosemembranen (0,2  $\mu$ M, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde ein diskontinuierliches System aus Anodenpuffer (50 mM Borsäure, pH 9 / 20 % Methanol) und Kathodenpuffer (50 mM Borsäure, pH 9 / 5 % Methanol) verwendet. Der Transfer erfolgte bei RT und einer Stromstärke von 0.8 mA/cm<sup>2</sup> für eine Stunde.

### 2.2.2.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten TP53- bzw. p21-Antigenen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese kurz in aqua bidest. gewaschen und für 30 min luftgetrocknet. Zur Blockierung unspezifische Bindungen wurde die Membran für 2 h in 3 % BSA/PBS-Lösung bei RT inkubiert. Danach erfolgte der Antigennachweis auf der Membran durch 1-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper in 1 % BSA/PBS bei RT (Anti-TP53, AB565, 1 : 500, Chemicon, Bad Nauheim; Anti-p21, 1 : 500, Signal Transduction Laboratory, Hamburg). Nach 3 x Waschen mit PBS wurde die Membran mit einem speziesspezifischen sekundärem Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper war mit alkalischer Phosphatase konjugiert (Verdünnung 1 : 10.000 in PBS). Nach 3 x Waschen wurde kurz mit Substratpuffer inkubiert (0.1 M Diethanolamin, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02 % Na-Azid) und anschließend eine 5-minütige Inkubation mit der Substratlösung (50  $\mu$ l CSPD (Boehringer) in 10 ml Substratpuffer) durchgeführt. Danach wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und die Umsetzung des Substrats durch Auflegen eines Films visualisiert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 „Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)

#### 2.3.1.1 Kernextraktion

Etwa  $10^7$  Fibroblasten wurden abtrypsinisiert und mit PBS gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 400  $\mu$ l Lösung A (100  $\mu$ l 1 M HEPES pH 7.9, 40  $\mu$ l 2.5 M KCl, 2  $\mu$ l 0.5 M EDTA, 10  $\mu$ l 0.1 M EGTA, auf 10 ml mit aqua bidest. auffüllen) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 25  $\mu$ l 10 % NP-40 zugegeben, gut gemischt und für 2 min bei 4 °C und 6000 g zentrifugiert. Das Kernpellet wurde mit Lösung A gewaschen, erneut sedimentiert und der Überstand verworfen (Urban et al., 1991). Das Kernpellet wurde in 40  $\mu$ l Lösung C (200  $\mu$ l 1 M HEPES pH 7.9, 1.6 ml 2.5 M KCl, 20  $\mu$ l 0.5 M EDTA, 100  $\mu$ l 0.1 M EGTA, 1 ml Glycerin, auf 10 ml mit aqua bidest auffüllen) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C, wurde nochmals gut gemischt und bei 4 °C und 14000 g für 5 min abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in 5  $\mu$ l Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 2.3.1.2 TP53-EMSA

Für die Markierung des Gel-shift-Oligonukleotids wurden 20 ng des TP53-Konsensus-Oligonukleotids (Santa Cruz, Heidelberg) mit 5  $\mu$ l 10x Kinase Puffer (Promega), 50  $\mu$ Ci [ $^{32}$ P]ATP (NEN), 3 U T4-Kinase (Promega) mit aqua bidest. auf 50  $\mu$ l Endvolumen gebracht. Die Kinasereaktion erfolgte bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurde ungebundenes ATP mit einer „NucTrap Push-Column“ Säule (Stratagene, Heidelberg) abgetrennt. Für die Inkubation der Kernproteine mit dem TP53-Oligonukleotids wurde ein Mastermix hergestellt: Für 15 Proben wurden 30  $\mu$ l BSA (10 mg/ml), 30  $\mu$ l dIdC (1 mg/ml), 30  $\mu$ l Puffer

D+ (20 µl 1 M HEPES pH 7.9, 200 µl 20 % Glycerin, 100 µl 1 M KCl, 1 µl 0.5 M EDTA, 2.5 µl 0.25 % NP-40, 20 µl 0.1 M DTT, 10 µl 0.1 M PMSF, 646.5 µl aqua bidest.), 60 µl Puffer F (500 µl 40 % Ficoll 400, 100 µl 1 M HEPES pH 7.9, 300 µl 1 M KCl, 100 µl 0.1 M DTT, 10 µl 0.1 M PMSF) und 15 µl markiertes Oligonukleotid zusammenpipettiert. Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus 5 µg Kernprotein (in 1 - 2 µl), 11 µl Mastermix, 8 µl aqua bidest. Die Reaktion erfolgte für 20 min bei RT, danach wurden die Ansätze auf einem nicht denaturierenden 4 %-igen Acrylamidgel für 2.5 h bei 200 V mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels wurden die Protein/Oligo-Komplexe mit Hilfe eines Films (BioMax, Kodak, München) sichtbar gemacht.

### **2.3.2 Northern Nachweis von TP53/ERCC3/Ligase- und GAPDH-mRNA**

#### 2.3.2.1 Herstellung und Markierung der Northern Blot-Sonden

Aus der EMBL-Datenbank wurden die Nukleotidsequenzen für die spezifischen mRNAs beschafft und mit Hilfe des Computerprogramms DNasis® (Hitachi, Software für Macintosh) der „Forward“- und „Reverse“-Primer generiert. Die synthetisierten Primer (Gibco) wurden mit Fibroblasten-cDNA als Template in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 21.6 µl Cocktail (25.25 µl H<sub>2</sub>O, 20 µl dNTP, 2.5 µl Taq-Polymerase, 6.25 µl 10x PCR-Puffer), jeweils 1 µM Forward- und Reverse-Primer und 2 µl cDNA. Die Primersequenzen für TP53 waren GACACTTTGCGTTCGGGCTG für den Forward-Primer und TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT den Reverse-Primer. Die Primersequenzen für Ligase waren TTCCCTCTCTGACACCTCTC für den Forward-Primer und AGCAAGTTGCTCAGCGTCTC den Reverse-Primer. Die Primersequenzen für ERCC3 waren CCGAGAATGCCGCTTAAGAA für den Forward-Primer und GTTGGCTTCGTAGAGCTTAG den Reverse-Primer. Die Primersequenzen für GAPDH waren GTGAAGGTCGGAGTCAACGGATT für den Forward-Primer und CCTGCTTCACCACCTTCTTGATG den Reverse-

Primer.

#### 2.3.2.2 Radioaktive Markierung der PCR-Sonden

Zur Markierung der Sonden wurde der Prime-It®II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) benutzt. Dabei wurden 150 ng des PCR-Produktes, 10 µl „random primer“ (300 nmol / ml), für 5 min gekocht und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl dATP-Puffer, 7.5 µl [<sup>32</sup>P]-ATP und 1 µl Klenow Enzym wurde mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Die Markierungsreaktion lief bei 37 °C für 30 min im Wasserbad ab. Um die markierte Sonde von nicht eingebautem ATP zu trennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt (NucTrap-Säule, Stratagene). Die Markierungseffizienz lag im Bereich von 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> cpm / µg Sonde.

#### 2.3.2.3 RNA-Isolation

Aus 10<sup>7</sup> Zellen wurde die RNA mit dem RNeasy® Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Dafür wurden die Zellen abtrypsinisiert, mit PBS gewaschen und in 600 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen und lysiert. Das Lysat wurde auf die RNeasy-Zentrifugationssäulen gegeben und bei 10000 g für 15 sec zentrifugiert. Nach 1-mal Waschen mit 700 µl Waschpuffer RW1 wurde die Säule 2-mal mit jeweils 500 µl Waschpuffer RPE gewaschen. Die RNA wurde mit aqua bidest. eluiert (3 x 50 µl) und bei -70 °C gelagert. Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm.

#### 2.3.2.4 Umschreiben der RNA in cDNA

Es wurde der RT-PCR Kit der Firma Stratagene verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus 4 µg RNA, 36 µl H<sub>2</sub>O, 3 µl Oligo-dT-Primer. Nach der Denaturierung der RNA für 5 min bei 65 °C wurden 5 µl 10x Puffer, 1 µl RNase-Inhibitor, 2 µl dNTP's (100 mM Stammlösung) sowie 1 µl reverse-Trans-

kriptase zugefügt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 90 °C für 5 min wurde die Reaktion gestoppt.

#### 2.3.2.5 Northern Blot

Für das Gel wurden 1 g Agarose (Promega) in 100 ml DEPC-behandeltem aqua bidest. in der Mikrowelle aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt und mit 10 ml 10x MOPS (0.2 M MOPS, 0.05 M NaAC, 0.01 M EDTA) und 2 ml Formaldehyd (37 %) versetzt. Als Laufpuffer dienten 80 ml 10x MOPS, 720 ml DEPC-behandeltes aqua bidest., 20 ml Formaldehyd (37 %). Die RNA (Konzentration 1 - 5 µg/µl) wurde bei 65 °C für 10 min inkubiert, auf Eis gestellt und 20 µl Probenpuffer (12.5 µl Formamid, 2.5 µl 10x MOPS, 5 µl Formaldehyd, 2.5 µl Probenpuffer 2 (50 % Glycerin, 0.25 % Bromphenolblau)) zugefügt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese mit 100 V gestartet, bis die Proben aus den Taschen in das Gel gelaufen waren (ca. 10 min). Der weitere Gellauf erfolgte für etwa 3 h bei 60 V. Anschließend wurde das Gel 2 x 5 min in DEPC-behandeltem aqua bidest. und 10 min in 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat x 2 H<sub>2</sub>O, pH 7.4) gewaschen. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amshermam, Freiburg) erfolgte über Nacht durch Kapillarkraft. Aus einem Reservoir mit 20x SSC wurde das Gel über eine Filterpapierbrücke mit Flüssigkeit versorgt. Durch die auf dem Gel plazierte Membran wurde der SSC-Puffer von einem darüberliegenden Filterpapierstapel angesaugt und die RNA auf die Membran transferiert. Nach dem Blotten wurde die RNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (0.12 kJ) immobilisiert und anschließend für 2 h bei 80 °C gebacken. Die Membran wurde dann entweder im Kühlschrank aufbewahrt oder sofort für die Hybridisierung 30 min mit 2x SSC gewaschen.

### 2.3.2.6 Hybridisierung

Nach dem Befeuchten in 2x SSC wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre gerollt. Die Prähybridisierung mit 20 ml Prähybridisierungspuffer (5 ml 20x SSC, 1 ml 100x Denhard-Lösung, 10 ml Formamid, 1 ml 20x SDS, 2,8 ml H<sub>2</sub>O, 6 mg zuvor denaturierte niedermolekulare DNA in 0.4 ml H<sub>2</sub>O) erfolgte für 4 h bei 42 °C im Rotationswärmeschrank. Für die anschließende Hybridisierung wurde die zuvor radioaktiv markierte und denaturierte Sonde in 10 ml Prähybridisierungspuffer in einer Konzentration von 15 ng/ml eingebracht und bei 42 °C über Nacht im Rotationswärmeschrank inkubiert. Durch 2 x Waschen der Membran mit niedriger (5 min mit 2x SSC / 0.1 % SDS bei RT) und nachfolgend mit hoher Stringenz (15 min mit 0.2 x SSC / 0.1 % SDS bei 68 °C) sowie mit 2 x SSC wurde nicht gebundene Sonde entfernt. Die Membran wurde dann im feuchten Zustand in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Filmexposition (BioMax MS, Kodak) wurde in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -70 °C durchgeführt. Um die Membran für weitere Hybridisierungen zu verwenden, wurde die alte Sonde durch Kochen in 0.1 % SDS entfernt. Dabei wurde mindesten 4 x die Waschlösung getauscht.



## **3.0 Ergebnisse**

### **3.1 Physikalische Kenngrößen für das Arbeiten mit UVB**

#### **3.1.1 Lampencharakteristika**

Im Vorfeld der geplanten Experimente war es erforderlich, die physikalischen Kenngrößen für das experimentelle Arbeiten festzulegen. Zu diesem Zweck wurde durch ein geeignetes Dosimeter die Emission von UVA bzw. UVB der eingesetzten Strahlungsquelle gemessen und mit den angegebenen Werten des mitgelieferten Datenblattes verglichen. Sowohl für UVA als auch für UVB konnte die angegebene Strahlungsqualität durch Messung bestätigt werden. Die Kontamination mit der jeweiligen anderen Strahlungsqualität lag nicht über 5 % der Gesamtdosis. Für die geplante Bestrahlung mit UVB wurde ein experimentell vorgegebenes Bestrahlungsfeld von 5 cm<sup>2</sup> festgelegt und die Homogenität der Bestrahlung innerhalb des Feldes überprüft. Die Homogenitätsschwankungen für UVB lagen maximal bei plus/minus 5 %. Zur Optimierung des Versuchsablaufes und zur Festlegung der Versuchsparameter wurde getestet welchen Einfluss das Phenolrot des Kulturmediums auf die applizierte Dosis hat und ob der Deckel der Kulturschale für die Bestrahlung entfernt werden musste. Es zeigte sich, dass für eine reproduzierbare Dosisapplikation das Kulturmedium entfernt werden musste, dass der Zellrasen mindestens einmal mit PBS gewaschen werden musste, um Restkulturmedium zu entfernen und dass der Deckel der Kulturschale entfernt werden musste.

#### **3.1.2 Bestimmung der Dosis-Zeit-Korrelation**

Erste experimentelle Erfahrungen zeigten, dass die Bestrahlungszeiten nicht kürzer als 5 Sekunden und nicht länger als 2 Minuten sein sollten. In diesem Zeitintervall konnte gewährleistet werden, dass die Dosisabweichung im

maximal zulässigen Fehlerbereich von 10 % lag und zum anderen konnte sichergestellt werden, dass der Zellrasen während der Strahlenexposition nicht austrocknete. Diese Bestrahlungszeitvorgaben machten es erforderlich, den Bestrahlungsabstand in Abhängigkeit von der gewünschten Dosis zu variieren.

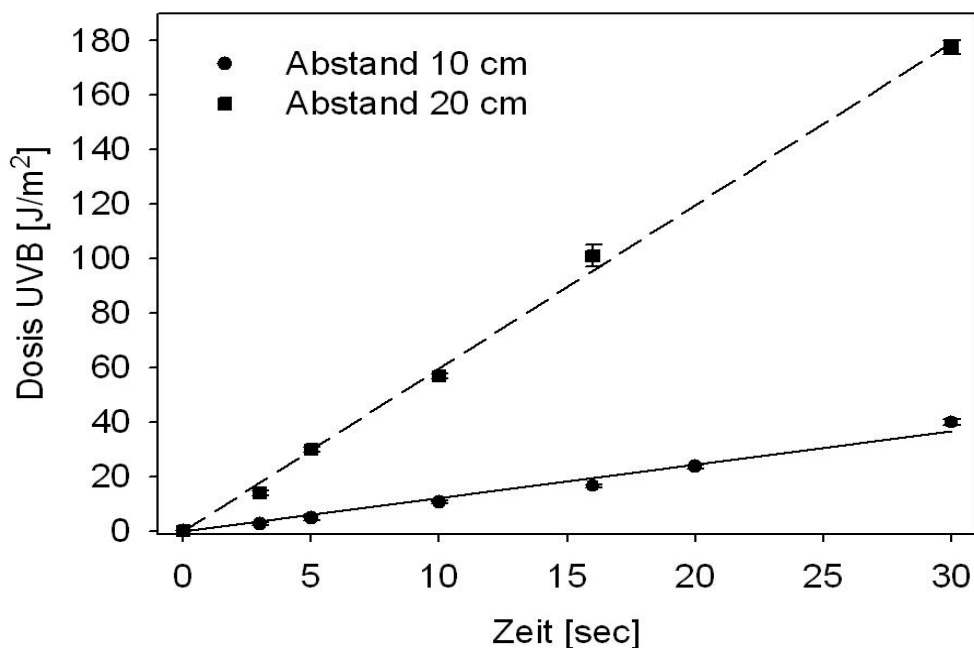


Abb. 3: Dosis-Zeit Korrelation bei Bestrahlung mit UVB (312 nm) und unterschiedlichem Abstand von der Strahlenquelle

Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

Abbildung 3 zeigt die abstandsabhängige Dosis-Zeit-Korrelation für den Abstand 10 und 20 cm von der Strahlenquelle. Als Resümee ergab sich die Verwendung eines Bestrahlungsabstands von 20 cm für alle Dosen kleiner  $50 \text{ J/m}^2$  und die Verwendung eines Abstands von 10 cm für alle Dosen größer  $50 \text{ J/m}^2$  UVB.

### 3.1.3 Abschätzen des biologisch relevanten UVB-Dosisbereichs

Um eine Abschätzung der biologischen Relevanz der applizierten Dosen treffen zu können, wurde die eingestrahlte UVB-Dosis der Sonne an einem sonnigen und an einem bewölkten Apriltag in Tübingen gemessen (Abb. 4). Die minimale Erythemdosis von  $300 \text{ J/m}^2$  wurde bei heiterem Himmel nach einer Sonnenexposition von 14 min erreicht, bei bewölktem Himmel wurde dieser Wert erst nach 19 min erreicht. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der experimentell benutzte Dosisbereich bis  $500 \text{ J/m}^2$  im biologisch relevanten Dosisbereich liegt

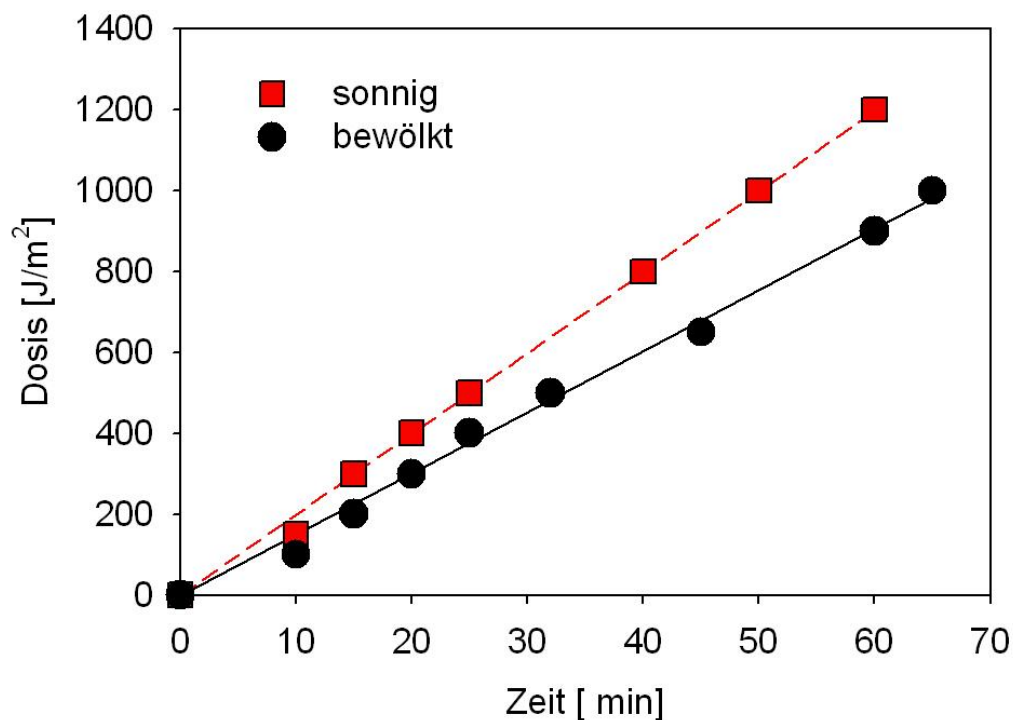


Abb. 4: Dosis-Zeit Korrelation für das UVB-Spektrum der Sonne am 17. 04. 1998 (heiter) und Dosis-Zeit Korrelation für das UVB-Spektrum der Sonne am 18. 04. 1998 (bewölkt)

## 3.2 Biologische Kenngrößen für das Arbeiten mit UVB und BBI

### 3.2.1 Austesten der optimalen BBI-Konzentration

Das klonogene Überleben normaler diploider Hautfibroblasten nach einer Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVB und einer Vorinkubation mit BBI in den Konzentrationen 0.1 / 1 / 10 und  $100 \mu\text{M}$  wurde bestimmt.

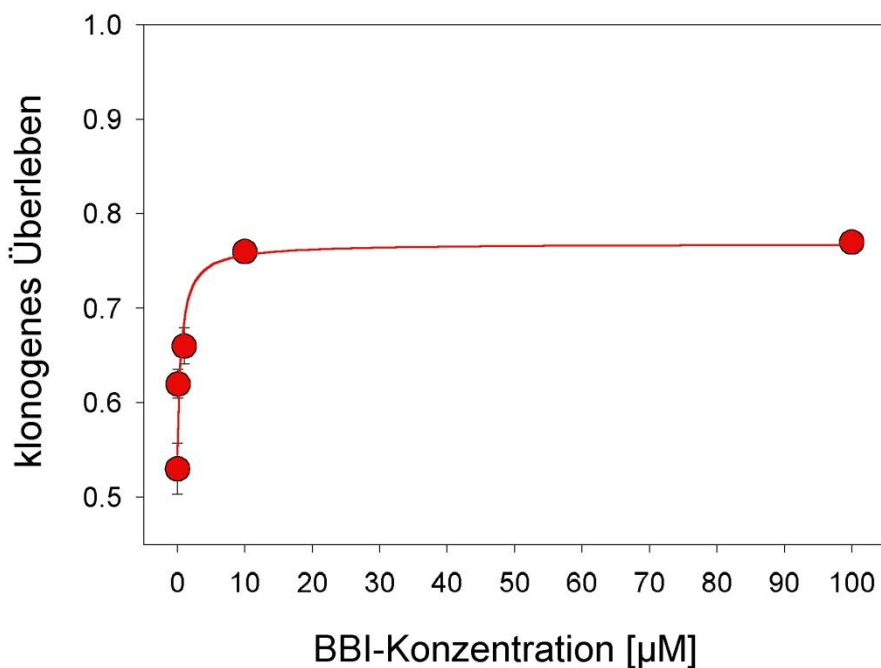


Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit des radioprotektiven Effekts von BBI

Bestimmt wurde das klonogene Überleben von humanen Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVB und nach 16-stündiger Präinkubation mit verschiedenen BBI-Konzentrationen. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Für jedes Experiment wurde eine Regressionskurve mit Hilfe der Gleichung  $f=(1+a*x)/b+c*x$  ermittelt. Die Mittelwerte der Parameter a, b und c wurden errechnet und mit ihrer Hilfe die oben gezeigte Regressionskurve erstellt. Mit Hilfe des t-Tests wurden die Messwerte für die verschiedenen BBI-Konzentrationen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass eine Steigerung der BBI-Konzentration bis  $10 \mu\text{M}$  mit einem signifikant erhöhten klonogenen Überleben korreliert war ( $1 \mu\text{M}$  vs.  $10 \mu\text{M}$ ,  $p=5*10^{-5}$ ;  $10 \mu\text{M}$  vs.  $100 \mu\text{M}$ ,  $p=0,16$ ).

Abbildung 5 zeigt, dass ein radioprotektiver Effekt bereits ab einer BBI-Konzentration von 0.1  $\mu\text{M}$  nachweisbar war, der maximale Effekt wurde jedoch erst bei 10  $\mu\text{M}$  erreicht. So wurde in allen folgenden Experimenten die Konzentration 10  $\mu\text{M}$  gewählt. Inkubation mit höheren Konzentrationen steigerte die Radioprotektion nicht. Auch bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  konnten keine toxischen Effekte beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung wurde beobachtet, dass eine maximale Radioprotektion von BBI dann nachweisbar ist, wenn konfluente Massenkulturen für mindestens 6 h mit BBI vorbehandelt wurden, bestrahlt und nach weiteren 7 h ("delayed plating") in den Klonbildungsassay eingesetzt wurden. Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit des BBI-Effektes von der Dauer der Präinkubation.

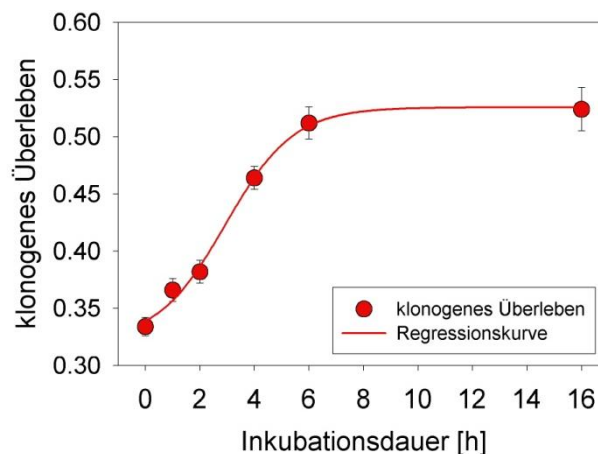


Abb. 6: Klonogenes Überleben humaner Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit 100  $\text{J}/\text{m}^2$  UVB. Normale Fibroblasten (HSF6) wurden vor der Bestrahlung über verschiedene Zeiträume mit BBI (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt und nachfolgend das klonogene Überleben bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Für jedes Experiment wurde mit Hilfe der Gleichung  $f=y_0+((a-y_0)/(1+(\exp(-b*(x-T))))))$  eine Regressionsanalyse durchgeführt und die Variablen ermittelt. Für  $y_0$  ergab sich ein Mittelwert von  $0.32\pm 0.008$ , für  $b$  ein Wert von  $0.8\pm 0.08$ , für  $T$  ein Wert von  $2.8\pm 0.24$  und für  $a$  ein Wert von  $0.52\pm 0.02$ . Mit Hilfe der Mittelwerte dieser Variablen wurde eine Regressionskurve erstellt.

### 3.2.2 Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von BBI

Humane Hautfibroblasten wurden mit Fluoreszenz-markiertem BBI inkubiert und die BBI-Inkorporation nach verschiedenen Zeiten evaluiert. Schon nach 5 min (Abb. 7) konnte eine deutliche BBI-Aufnahme beobachtet werden. Dabei war festzustellen, dass nicht alle Zellen in der Lage waren BBI aufzunehmen bzw. dass Zellen zu finden waren, die BBI besonders stark aufgenommen hatten. Eine Aufnahme in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Fibroblasten ließ sich nicht feststellen. Charakteristisch für die Aufnahme war eine Anreicherung im perinukleären Bereich, der sich durch eine starke Granulierung auszeichnet. Eventuell handelt es sich bei den Granula um Lysosomen und ihren Inhalt oder das Endoplasmatische Retikulum.

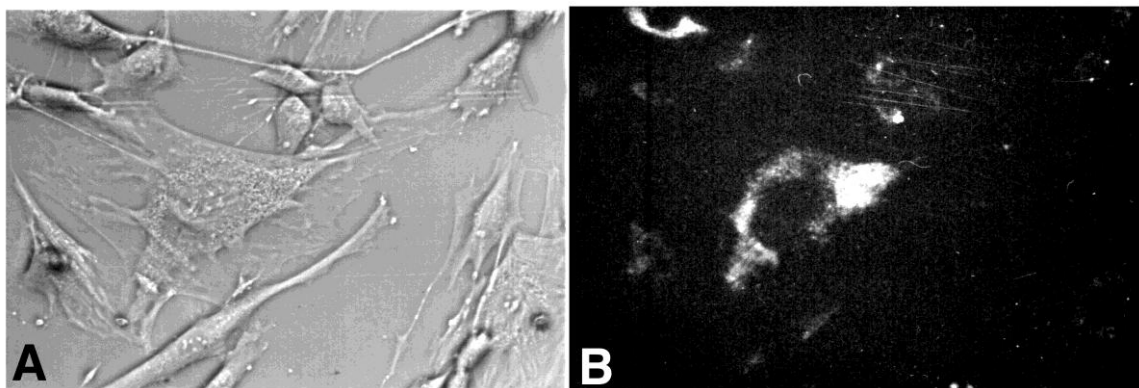


Abb. 7: Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem BBI in normale, humane Fibroblasten nach 5-minütiger Inkubation mit BBI

A: Bildausschnitt im Phasenkontrast,

B: der selbe Bildausschnitt mit FITC-Fluoreszenz; Vergrößerung 300 x.

### 3.3 Quantifizierung des radioprotektiven Effektes von BBI

Da die bisherigen Experimente einen radioprotektiven Effekt von BBI nach UVB-Bestrahlung zeigten, sollte in weiteren Versuchen dieser Effekt quantifiziert und charakterisiert werden.

### 3.3.1 Quantifizierung des radioprotektiven Effekts von BBI nach Bestrahlung mit $100 \text{ J/m}^2$ UVB über die Klonanzahl und Morphologie

Die Behandlung einer konfluenten Massenkultur aus normalen humanen Fibroblasten mit UVB führte zu einer deutlichen Reduktion des klonalen Überlebens (Abb. 8). Dabei reduzierte sich nicht nur die Anzahl der Klone, sondern auch die Größe und die Morphologie der Klone änderte sich. Eine Vorbehandlung mit BBI hob den Bestrahlungseffekt teilweise wieder auf. Die Klonanzahl und die Klongröße nahmen wieder zu.

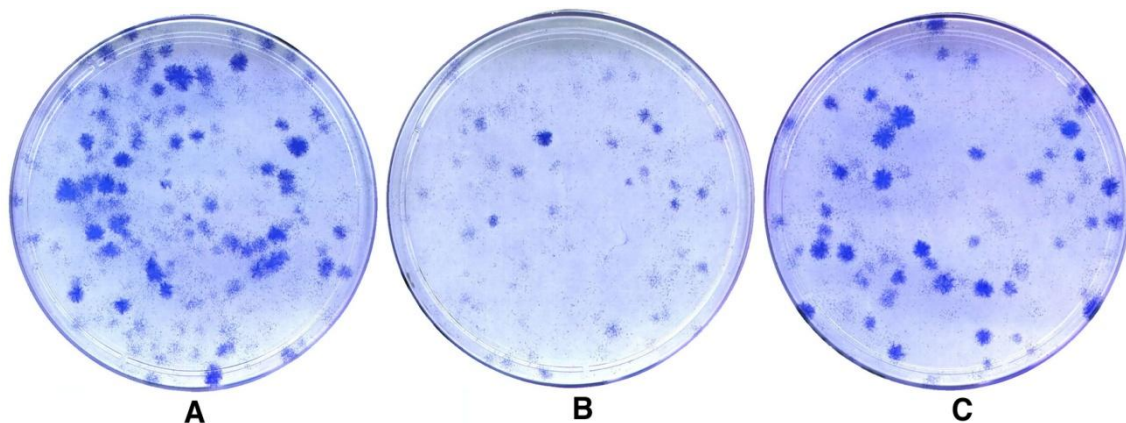


Abb. 8: Radioprotektion durch BBI nach Behandlung normaler Fibroblasten mit BBI

A: unbehandelte Kontrolle,

B: bestrahlt mit  $100 \text{ J/m}^2$ ,

C: bestrahlt mit  $100 \text{ J/m}^2$  nach Vorbehandlung mit BBI ( $10 \mu\text{M}$ ).

Dargestellt sind gefärbte Klonkulturen humaner Fibroblasten nach 14 Tagen Wachstum.

### 3.3.2 Klonales Überleben normaler humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit verschiedenen UVB-Dosen und BBI-Präinkubation

Nachdem für die UVB-Dosis  $100 \text{ J/m}^2$  ein radioprotektiver Effekt von BBI nachgewiesen werden konnte, wurde in einem ergänzenden Experiment der BBI-Effekt auf das klonale Überleben in Abhängigkeit von der eingestrahlt Dosis untersucht. Abbildung 9 zeigt diese Dosis-Wirkungs-Beziehung. Es lassen sich eindeutig zwei Bereiche definieren. Im Dosisbereich bis  $20 \text{ J/m}^2$  verursachte die BBI-Vorbehandlung eine leichte Reduktion des klonalen Überlebens im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten. Im Dosisbereich größer  $20 \text{ J/m}^2$  induzierte die BBI-Vorbehandlung dagegen einen deutlichen radioprotektiven Effekt („dosis enhancement factor“ = 2).

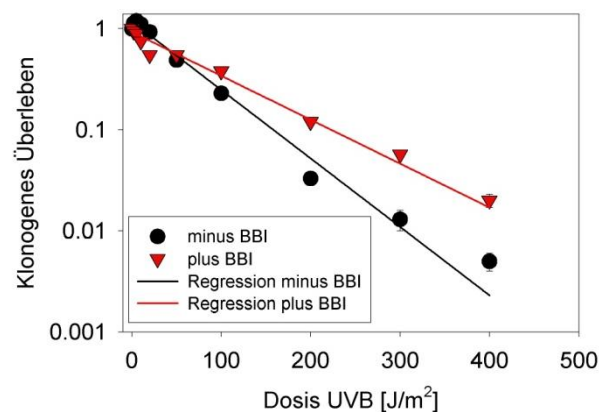


Abb. 9: Klonogenes Überleben normaler Hautfibroblasten nach Behandlung mit verschiedenen Dosen UVB

Konfluente Populationen wurden mit BBI ( $10 \mu\text{M}$ ) präinkubiert, bestrahlt und 8 h nach der Bestrahlung die Klonkulturen angelegt. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  den Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte aus den Einzelexperimenten wurden als Triplikate ermittelt. Für jedes unabhängige Experiment wurde eine Regressionsanalyse mit Hilfe der Gleichung  $f=a*\exp(-b*x)$  erstellt. Die ermittelten Gleichungsparameter der fünf Experimente wurden mit Hilfe des t-Tests miteinander verglichen. Für beide Parameter a und b wurde beim Vergleich der Bedingungen „minus BBI“ vs. „plus BBI“ ein signifikanter p-Wert ermittelt (a:  $p = 0.048$ ; b:  $p = 7*10^{-7}$ ).



### **3.4 Einfluss von BBI auf die Regulation der strahleninduzierten Zellantwort**

Der BBI-induzierte Unterschied im Zellüberleben nach Bestrahlung zwischen behandelten und unbehandelten Fibroblasten lässt die Frage aufkommen, welche der bislang nach Bestrahlung bekannten Zellantworten durch die BBI-Präinkubation verändert werden. Nach Bestrahlung lassen sich mehrere Zellantworten unterscheiden, deren Verrechnung das Überleben der Zelle und damit das Überleben der gesamten Zellpopulation festlegt. Als Akutreaktion der Fibroblasten nach Bestrahlung lässt sich die Induktion eines Zellzyklusarrests nachweisen. Dieser Arrest wird dazu benutzt, um potentiell entstandene DNA-Schäden zu reparieren. In Abhängigkeit vom Erfolg der Reparatur erlangt die Zelle entweder ihren proliferativen Status zurück, oder sie durchläuft eine Zelldifferenzierung oder aber sie wird durch Induktion des Zelltods aus der Population eliminiert.

### **3.4.1 Zellzyklusanalyse normaler humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVB**

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie erstellt. Wie bei der Auswertung der Dosiswirkungskurve, konnten in den Dosisbereichen unter  $20 \text{ J/m}^2$  und über  $20 \text{ J/m}^2$  unterschiedliche Effekte von BBI festgestellt werden.

#### **3.4.1.1 Zellzyklusanalyse im Dosisbereich unter $20 \text{ J/m}^2$**

Abbildung 10 A zeigt, dass nach Bestrahlung mit bis zu  $20 \text{ J/m}^2$  der Anteil der Zellen in der  $G_1$ -Phase nicht signifikant zunimmt. Es konnte kein strahleninduzierter  $G_1$ -Block unter den gewählten Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich, dass in Abwesenheit von BBI im betrachteten Dosisbereich nach der Bestrahlung ein erhöhter Anteil an Zellen in der S-Phase nachweisbar war. Diese Erhöhung war gekoppelt mit einer Reduktion des Zellanteils in  $G_2$ ; d. h., dass geringe Dosen UVB einen proliferativen Effekt aufweisen, der in Gegenwart von BBI nicht mehr nachweisbar ist.

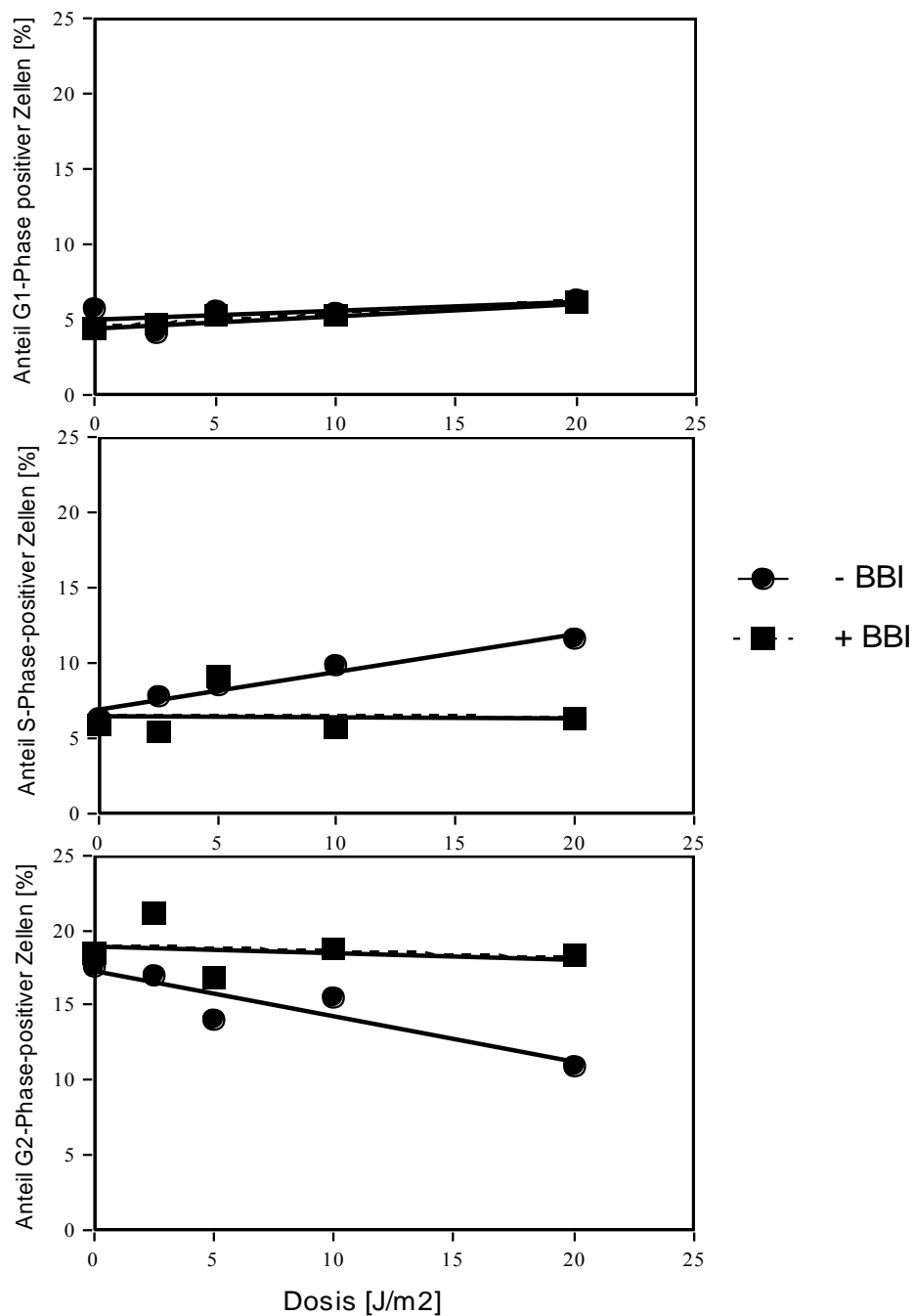


Abb. 10 A: Zellzyklusanalyse von Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVB im Dosisbereich bis 20 J/m<sup>2</sup>

Die Analyse erfolgte 24 h nach der Bestrahlung und ist aufgegliedert in die Zellzyklusphasen G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>. Die Ordinate gibt den Anteil Zellzyklusphasen-positiver Zellen wieder.

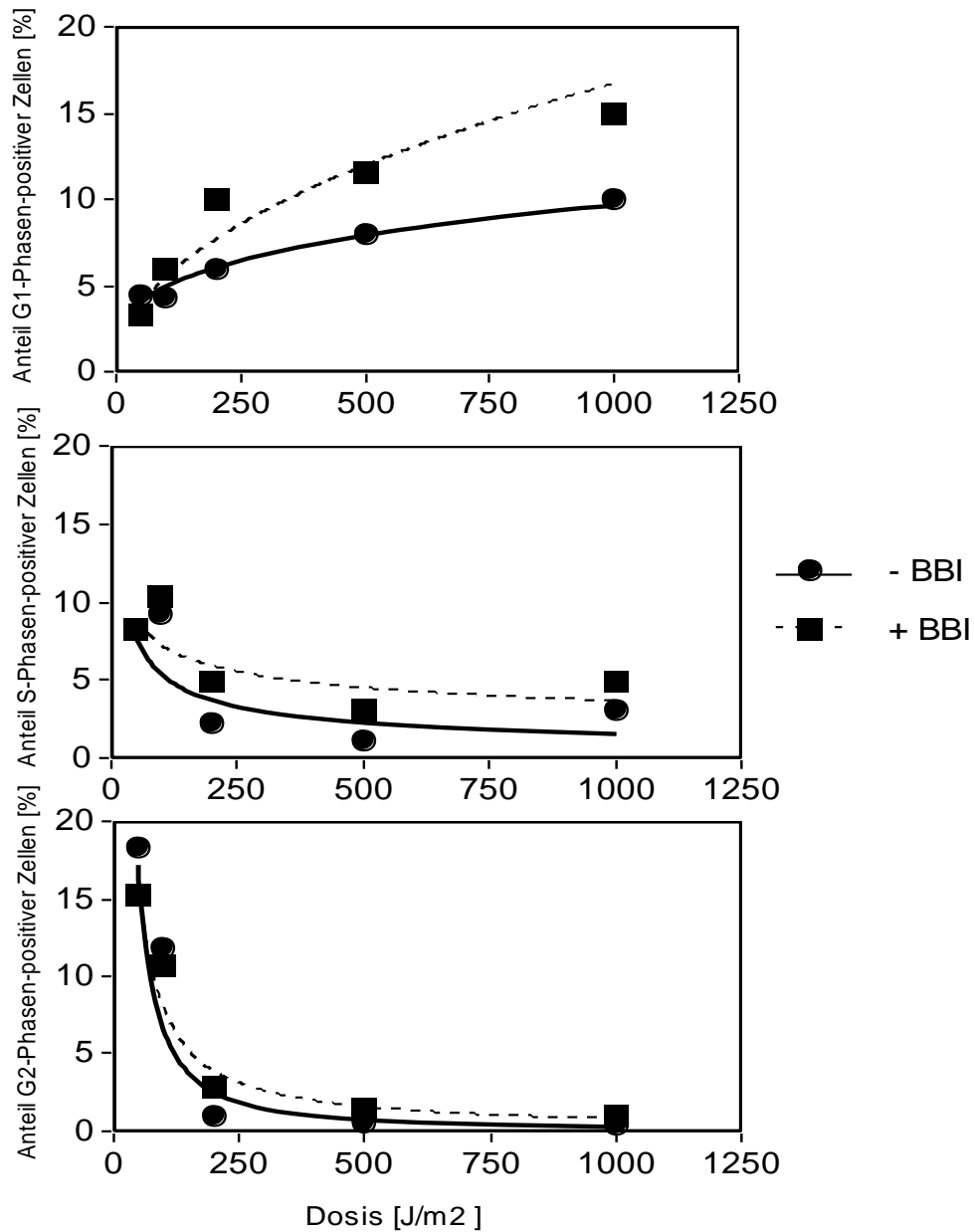


Abb. 10 B: Zellzyklusanalyse von Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVB im Dosisbereich größer  $20 \text{ J/m}^2$

Die Analyse erfolgte 24 h nach der Bestrahlung und ist aufgegliedert in die Zellzyklusphasen  $G_1$ , S und  $G_2$ . Die Ordinate gibt den Anteil Zellzyklusphasen-positiver Zellen wieder.

#### 3.4.1.2 Zellzyklusanalyse im Dosisbereich über 20 J/m<sup>2</sup>

Im Dosisbereich über 20 J/m<sup>2</sup> (Abb. 10 B) konnte mit zunehmender Strahlendosis eine Erhöhung des Zellanteils in der G<sub>1</sub>-Zellzyklusphase nachgewiesen werden. Eine Präinkubation mit BBI erhöhte diesen Anteil signifikant. Bestrahlung mit UVB (> 20 J/m<sup>2</sup>) führte zu einer Reduktion des Zellanteils in der S-Phase des Zellzyklus. Eine BBI-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt. Bei der Induktion des G<sub>2</sub>-Arrestes nach Bestrahlung konnte ebenso kein Unterschied zwischen Zellen mit und ohne BBI-Präinkubation nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass BBI in der Lage ist, den strahleninduzierten Zellzyklusblock zu verstärken.

#### **3.4.2 Bestimmung des Effekts von BBI auf die Zellproliferation in Massenpopulationen**

Es stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auf die Zellzyklusphasenverteilung auch in der Proliferationskinetik einer Massenpopulation nachweisbar war. Massenpopulationen von Fibroblasten zeigten nach Behandlung mit UVB eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl (Abb. 11). Diese Abnahme erwies sich jedoch als weniger stark als nach den Ergebnissen des Klonbildungsassays zu erwarten war. Es zeigte sich, dass eine Präinkubation mit BBI bis etwa zur Dosis von 200 J/m<sup>2</sup> in der Lage war, die strahleninduzierte Reduktion der Zellzahl zu verhindern. Aber auch bei höheren Dosen war ein radioprotektiver Effekt nachweisbar. Im unteren Dosisbereich (50 J/m<sup>2</sup>) konnte kein radioprotektiver Effekt von BBI nachgewiesen werden.

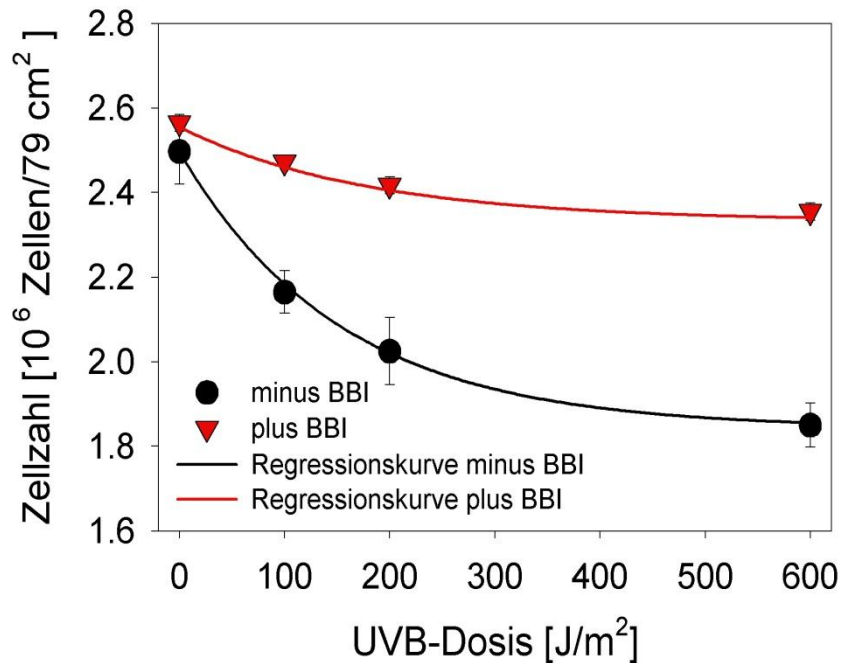


Abb. 11: Bestimmung der Zellzahl in Fibroblastenkulturen 3 Tage nach Bestrahlung mit verschiedenen UVB-Dosen

Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte aus den Einzelexperimenten wurden als Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f=y_0+a*(1-\exp(-b*x))$  durchgeführt. Die ermittelten Gleichungsparameter wurden einem t-Test unterzogen. Für die Bedingungen „minus BBI“ vs. „plus BBI“ waren die Gleichungsparameter  $y_0$  und  $a$  signifikant unterschiedlich ( $y_0$ :  $p = 4*10^{-6}$ ,  $a$ :  $p = 9*10^{-6}$ ), für den Parameter  $b$  ergab sich ein  $p$ -Wert von 0,31.

### 3.4.3 BBI-Effekt auf die strahleninduzierte Zelldifferenzierung

Die Bestrahlung normaler diploider Fibroblasten mit UVB (100 J/m<sup>2</sup>) führte zu einer deutlichen Reduktion der mitotischen Fibroblastenklone vom Typ I bzw. II (Abb. 12). Simultan war eine Erhöhung der Anzahl der Klone vom Typ III und des Anteiles der postmitotischen Klone nachweisbar. Eine Präinkubation mit

BBI war in der Lage, die beschriebene Differenzierungsinduktion teilweise zu verhindern. Der Anteil der frühen mitotischen Klontypen erhöhte sich auffallend nach BBI-Präinkubation und der Anteil der späten mitotischen und postmitotischen Klone war gegenüber der Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  reduziert.

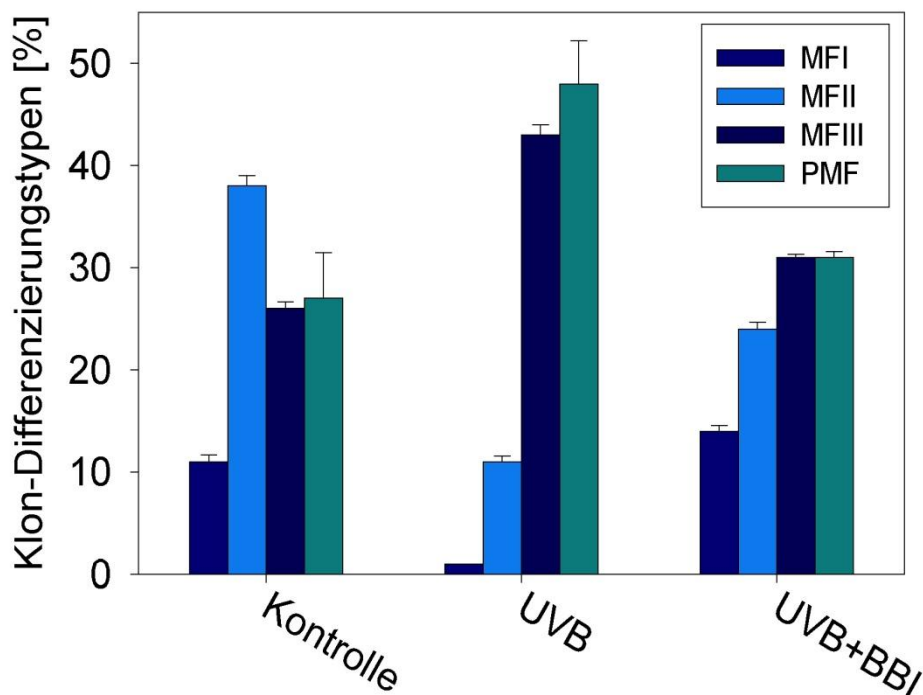


Abb. 12: Einfluss von BBI auf die strahleninduzierte Klondifferenzierung

Konfluente Fibroblastenkulturen wurden mit einer Dosis von  $100 \text{ J/m}^2$  bestrahlt und Klonkulturen angelegt. Nach 14 Tagen Kultivierung wurden die Anzahl und der Differenzierungsstatus der Klone bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse wurden die Werte aus den Einzelerperimenten einer arcsin-Transformation unterzogen und die Bedingungen mit dem t-Test verglichen. Es zeigte sich, dass für die Bedingungen „UVB minus BBI“ vs. „UVB plus BBI“ für die Anzahl der Klone vom Typ MFI ( $p = 2.4 \cdot 10^{-5}$ ), II ( $p = 1 \cdot 10^{-4}$ ), III ( $p = 3 \cdot 10^{-4}$ ) und PMF ( $p = 0.02$ ) ein signifikanter Unterschied errechnet werden konnte ( $p\text{-Wert} \leq 0,05$ ).

### 3.4.4 BBI-Effekt auf die strahleninduzierte Apoptose

Zur Bestimmung des Effektes von BBI auf die strahleninduzierte Apoptose bei normalen Fibroblasten, wurde in einem Vorexperiment der zeitliche Verlauf der Apoptose bestimmt. Nach Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  konnte das Apoptosemaximum 7 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden (Abb. 13).

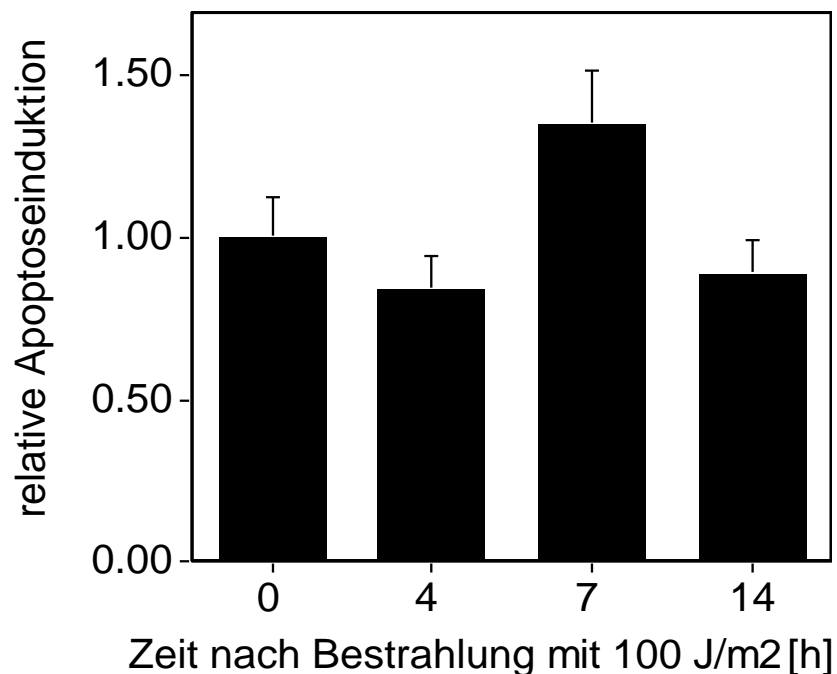


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVB. Zu jedem angeführten Zeitpunkt wurde mit Hilfe des Apoptose-ELISAs das Ausmaß der DNA-Fragmentierung im Zytoplasma von 50.000 Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.



Anschließend wurde zum Zeitpunkt sieben Stunden nach Bestrahlung im Dosisbereich 0 bis 600 J/m<sup>2</sup> das Ausmaß der Apoptose in An- bzw. Abwesenheit von BBI bestimmt (Abb. 14). Dabei zeigte sich, dass nach BBI-Behandlung im Dosisbereich von 0 bis 50 J/m<sup>2</sup> die strahleninduzierte Apoptose deutlich reduziert war, während im Bereich über 100 J/m<sup>2</sup> die strahleninduzierte Apoptose signifikant verstärkt war.

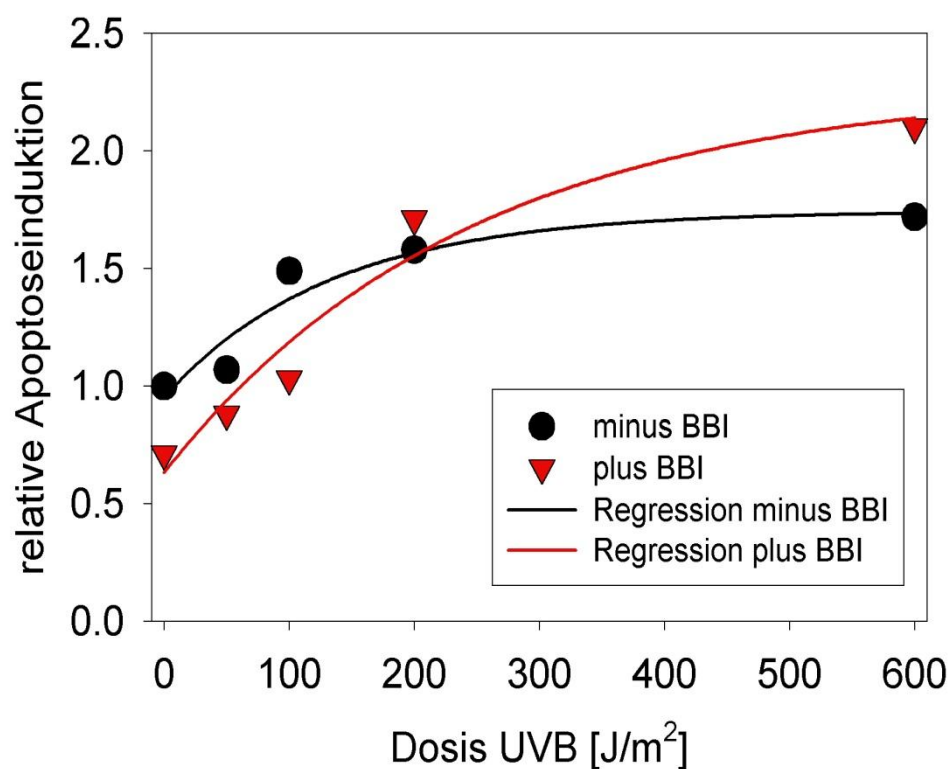


Abb. 14: Ausmaß der strahleninduzierten Apoptose in normalen, konfluenten Fibroblasten der UVB-Dosis nach Präinkubation mit BBI.

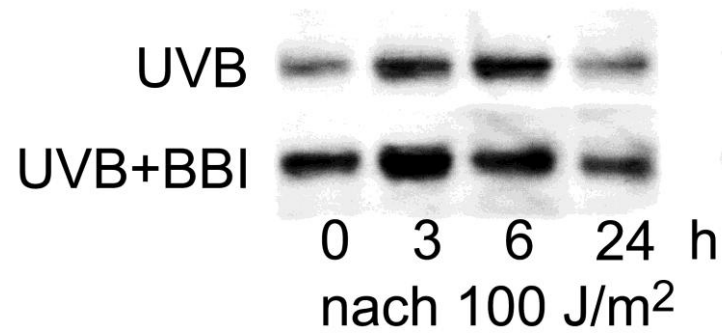
Die Apoptose wurde mit Hilfe des „cell death“-ELISA's (Boehringer) quantifiziert. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Für jedes unabhängige Experiment wurde eine nicht lineare Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f=y_0+a*(1-\exp(-b*x))$  durchgeführt. Die ermittelten Gleichungsparameter wurden einem t-Test unterzogen. Für die Bedingungen „minus BBI“ vs. „plus BBI“ waren die Gleichungsparameter a:  $p = 5*10^{-7}$ , b:  $p = 0.0025$  und  $y_0$ :  $p = 1*10^{-5}$  alle signifikant unterschiedlich.

### **3.5 Einfluss von BBI auf die molekulare Regulation der strahleninduzierten Zellantwort**

Nachdem die durch UVB induzierten Zellantworten - klonogenes Überleben, Zelldifferenzierung, Apoptose und die Zellzyklusanalysen - unter BBI eine Änderung erfuhren, erhob sich die Frage nach der molekularen Basis dieser Reaktionen.

#### **3.5.1 Einfluss von BBI auf die strahleninduzierte TP53-Proteinexpression**

Die Abhängigkeit des radioprotektiven Effekts von BBI von der Präinkubationsphase (vgl. Abb. 6) machte eine Beeinflussung der für die Regulation der Zellantwort verantwortlichen molekularen Signaltransduktion wahrscheinlich. Da das TP53-Molekül im Ablauf dieser Kaskade eine zentrale Rolle spielt (Lane 1992), wurde untersucht, welchen Einfluß BBI auf die strahleninduzierte TP53-Proteinexpression nimmt. Drei Stunden nach Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  konnte eine Erhöhung der Proteinmenge nachgewiesen werden (Abb. 15). Die maximale Erhöhung wurde 6 h nach der Bestrahlung beobachtet. Zum Zeitpunkt 0 h, d. h. am Ende der 16-stündigen BBI-Präinkubation konnte eine deutlich erhöhte TP53-Basalexpression und danach eine deutlich erhöhte strahleninduzierte Proteinzunahme beobachtet werden.



rel. Expression -BBI	1	3,1 ± 0.18	5.2 ± 0.2	0.9 ± 0.18
rel. Expression +BBI	3,5	7.9 ± 0.24	3.9 ± 0.6	2.8 ± 0.4

Abb. 15: TP53-Protein-Stabilisierung nach Bestrahlung in Gegenwart bzw. Abwesenheit von BBI

Die Proteinmengen wurden in normalen Fibroblasten zu unterschiedliche Zeiten nach Bestrahlung mit einer UVB-Dosis von 100 J/m<sup>2</sup> gemessen. Das Experiment wurde 3 x durchgeführt. Gezeigt wird eine charakteristische Expressionskinetik.

### 3.5.2 Einfluss von BBI auf die DNA-bindende Aktivität des TP53-Moleküls

Da vorhandenes TP53-Protein nicht zwangsläufig transkriptionell aktiv ist, sondern erst durch mehrere molekulare Reaktionen aktiviert werden muss (Cox et al., 1996), wurde ein DNA-Bindungsassay durchgeführt. Transkriptionell aktives TP53 bindet in einem ersten Schritt an die DNA und aktiviert dann in einem zweiten Schritt über sein transaktivierendes Potential die Transkription seiner Zielgene. Bei der Überprüfung der DNA-bindenden Aktivität des TP53-Moleküls konnten im Assay zwei spezifische Banden nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Bildung des unteren Protein-DNA-Komplexes war 2 h nach der Bestrahlung deutlich erhöht und zeigte sich nach 4 h weiter erhöht. Der obere Komplex wurde durch Bestrahlung ebenfalls erhöht. Nach Präinkubation der Zellen mit BBI war die Bildung des unteren Komplex basal erhöht nachweisbar; nach Bestrahlung wurde seine Bildung klar erhöht und blieb auch 4 h nach Bestrahlung auf diesem hohen Niveau. Die Spezifität des Assays wurde durch Verwendung von unmarkierten TP53- bzw. AP1-Oligonukleotiden nachgewiesen.

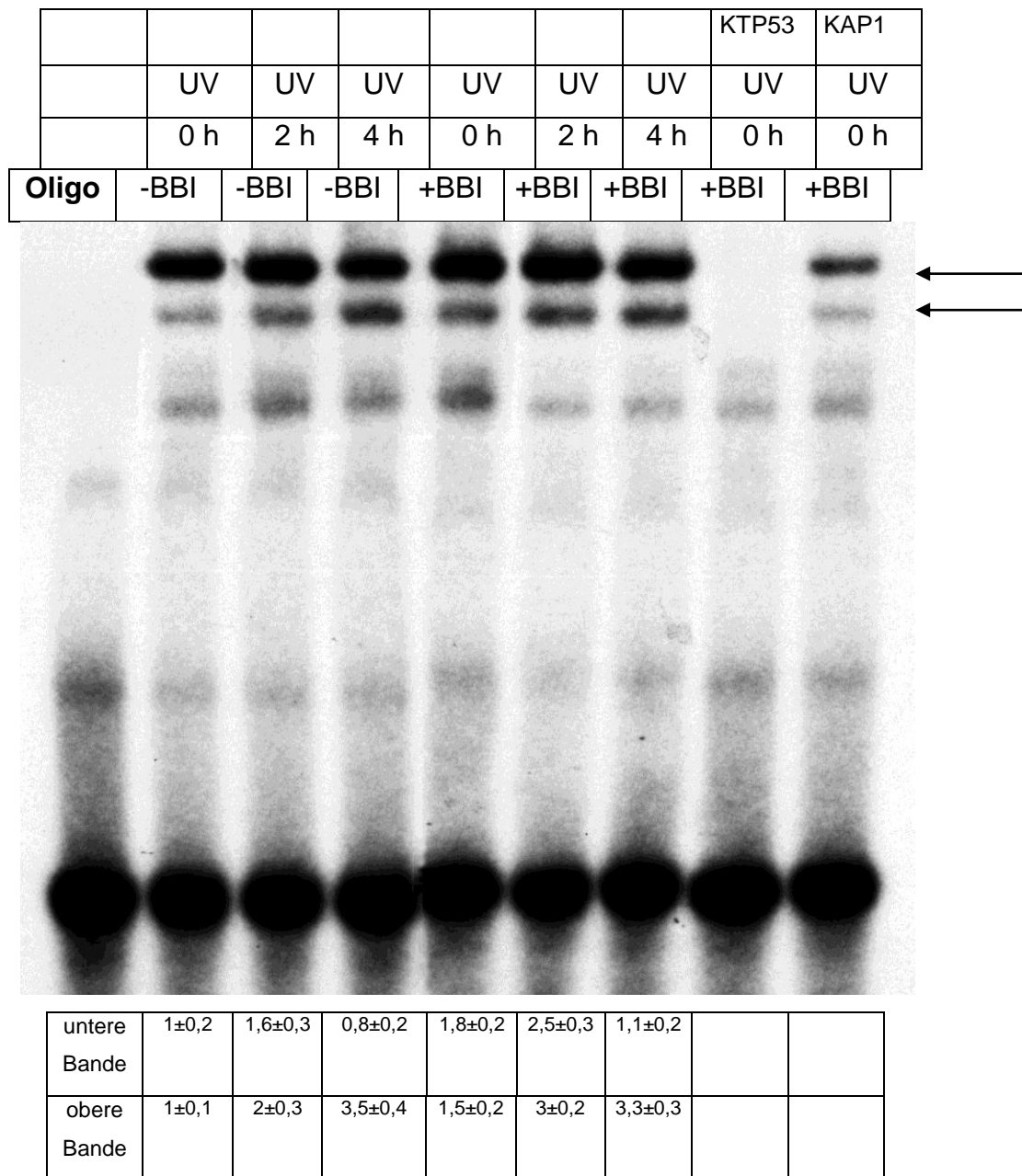
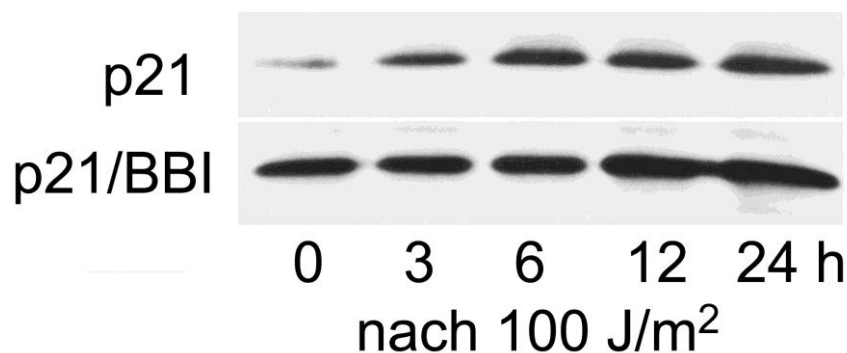


Abb. 16: TP53-DNA Bindungsassay in normalen Fibroblasten nach Bestrahlung mit 100 J/m<sup>2</sup>

Radioaktiv markierte TP53-Konsensusoligonukleotide wurden mit Kernextrakt von behandelten Fibroblasten inkubiert und die entstandenen DNA-Protein-Komplexe mit Hilfe eines nativen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die Spezifität des Verfahrens wurde mit Hilfe des unmarkierten TP53-Konsensus-Oligo (KTP53) bzw. AP1-Oligo (KAP1) überprüft. Das Experiment wurde 3 x durchgeführt. Gezeigt ist hier eine typische Expressionskinetik.

### 3.5.3 Einfluss von BBI auf die Proteinexpression des p21/waf1/cip

Eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität von TP53 muss nicht zwangsläufig zur erhöhten Expression der entsprechenden Folgegene führen. Erst durch das Vorhandensein zusätzlicher transaktivierender Aktivität wird dies gesichert. Ein charakteristisches TP53-"downstream"-Gen ist p21/waf1/cip. So konnte nach Bestrahlung mit UVB ( $100 \text{ J/m}^2$ ) für das p21-Protein eine Erhöhung der Expression mit einem Maximum nach 6 bis 24 h beobachtet werden (Abb. 17). Nach Vorbehandlung mit BBI wurde eine erhöhte p21-Proteinexpression schon basal beobachtet. Durch Bestrahlung ließ sich dieser hohe Wert kaum noch steigern.



rel. Expression -BBI	1	$3,5 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,5$
rel. Expression +BBI	7,5	$7,1 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,6$	$8,8 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,8$

Abb. 17: Protein-Menge von p21/waf1/cip nach Bestrahlung mit UVB und Vorbehandlung mit BBI

Das Experiment wurde 3 x durchgeführt. Aufgezeigt ist eine typische Expressionskinetik.

### 3.5.4 Einfluss von BBI auf die mRNA-Expression von TP53, Ligase I und ERCC3

Andere TP53-nachgeschaltete Gene sind die Gene für ERCC3, Ligase I und das TP53-Gen selbst. Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik ließ sich die TP53-spezifische mRNA-Spezies mit einer Größe von 2.3 kb nachweisen (Abb. 18). Dabei induzierte die Bestrahlung mit UVB ( $100 \text{ J/m}^2$ ) eine Erhöhung der TP53-mRNA-Expression. Eine BBI-Vorbehandlung veränderte die basale Expression kaum, die strahleninduzierte Expression war jedoch erhöht. Auch die Expression der Reparatur-relevanten Gene ERCC3 und Ligase I (Abb. 18) wurde durch die UVB-Bestrahlung erhöht. Eine Vorbehandlung der Zellen mit BBI erhöhte die strahleninduzierte Expression beider Gene zusätzlich.

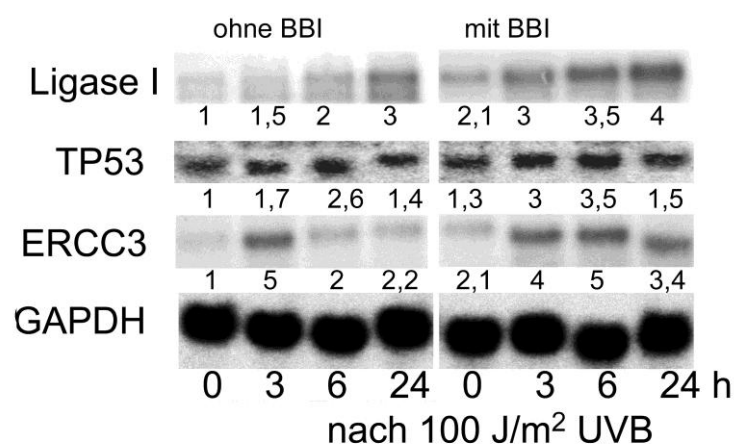
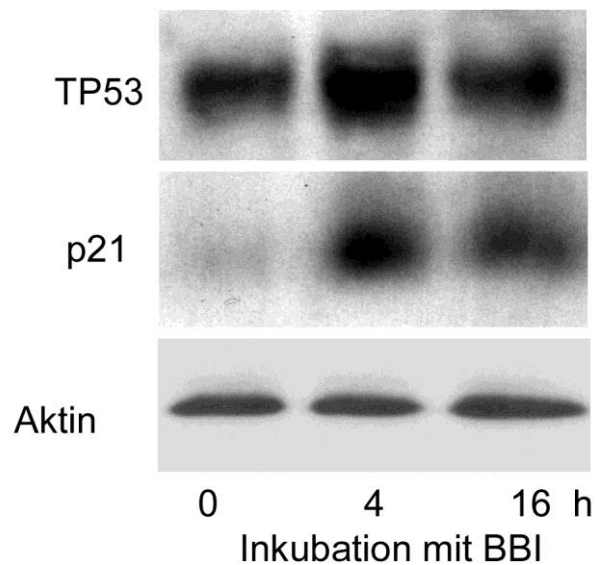


Abb. 18: mRNA-Expression der Gene Ligase I (3.1 kb), TP53 (2.3 kb) und ERCC3 (2.4 kb) in normalen Fibroblasten nach Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVB

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines RNA-Isolations-Kits gewonnen, im Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nylonmembran gebロットet und mit Hilfe spezifischer Sonden nachgewiesen. Alle Sonden wurden mit Hilfe der PCR-Technik hergestellt. Als Auftragskontrolle wurde mit einer Sonde gegen die GAPDH-mRNA hybridisiert. Die Banden wurden digitalisiert und auf die Expression der GAPDH normalisiert.

### 3.6 Molekulare Effekte von BBI während der Präinkubations-Phase vor der Bestrahlung

Der beobachtete Effekt von BBI auf die Basalexpression von TP53 und auf die Expressionen von p21/waf1/cip, ERCC3 und Ligase I sprechen dafür, das BBI bereits während der Präinkubationsphase in die Regulation der Expression dieser Moleküle eingreift. Zur Abklärung dieser Frage wurde die TP53-Proteinexpression während der Vorinkubationszeit analysiert (Abb. 19). Schon 4 h nach Beginn der Präinkubation fand sich ein Protein-Maximum für TP53. Ebenso konnte nach BBI-Präinkubation eine Erhöhung der Proteinmenge für p21/waf1/cip beobachtet werden (Abb. 19).



rel. Expression TP53	1	4,2 ± 0,4	1,2 ± 0,5
rel. Expression p21	1	8,3 ± 0,8	4,1 ± 0,6

Abb. 19: TP53- bzw. p21/waf1/cip-Protein-Menge nach Präinkubation normaler Fibroblasten mit BBI

Jedes Experiment wurde 3 x durchgeführt. Die Banden wurden digitalisiert und auf die Aktinexpression normalisiert. Gezeigt wird hier ein typischer Expressionsverlauf.



### 3.7 Einfluss von BBI auf die DNA-Reparaturkapazität der Zelle

#### 3.7.1 Klonbildungs-Assay nach verschiedenen DNA-Reparaturzeiten ("delayed plating")

Abbildung 20 zeigt, dass das klonale Überleben normaler Fibroblasten nach Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  drastisch ansteigt, wenn man die Reparaturzeit für DNA-Schäden verlängert. Überraschend dabei ist, dass auch noch nach Reparaturzeiten größer 6 h das Überleben ansteigt, d. h. noch nicht reparierte Schäden vorhanden sind. Nach BBI-Vorbehandlung ist das Überleben zu allen Zeitpunkten deutlich erhöht, jedoch scheint der Überlebensvorteil für BBI-behandelte Zellen vor allem bei Reparaturzeiten über 6 h evident zu werden.

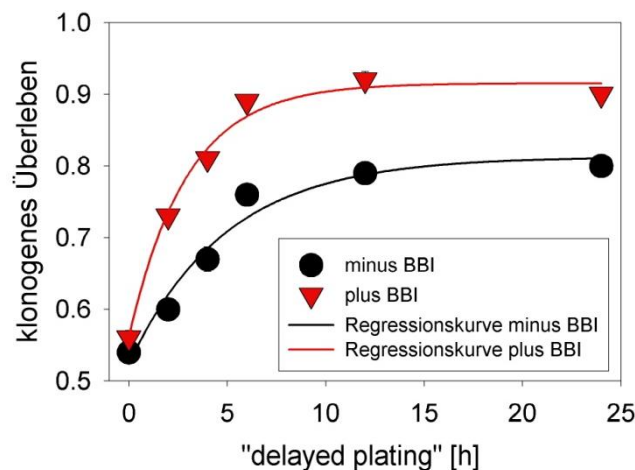


Abb. 20: Klonbildungs-Assay normaler Fibroblasten nach Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$ . Normale Fibroblasten (HSF6) wurden in Gegenwart bzw. Abwesenheit von BBI mit  $100 \text{ J/m}^2$  bestrahlt. Der Assay zur Bestimmung des klonogenen Überlebens wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung angesetzt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte aus den Einzelexperimenten wurden als Triplikate ermittelt. Für jedes unabhängige Experiment wurde eine nicht lineare Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f=y_0+a*(1-\exp(-b*x))$  durchgeführt. Die ermittelten Gleichungsparameter wurden einem t-Test unterzogen. Für die Bedingungen „minus BBI“ vs. „plus BBI“ waren alle drei Kurvenparameter signifikant unterschiedlich (für  $y_0$ :  $p = 0.0024$ ; für  $a$ :  $p = 7*10^{-5}$ ; für  $b$ :  $p = 6*10^{-5}$ ).

### 3.7.2 Effekt von BBI auf die Nukleotid-Exzissions-Reparatur

Die von BBI modulierte Expression der Gene bzw. Genprodukte TP53, p21, ERCC3 und Ligase I legen einen Einfluss von BBI auf die DNA-Reparatur nach UV-Bestrahlung nahe. Einer der häufigsten durch UVB induzierten DNA-Schäden ist die Bildung von Cyclobutan-Dimeren. Diese Schäden werden mit Hilfe der Nukleotid-Exzissions-Reparatur (NER) repariert. Nach Bestrahlung normaler Fibroblasten konnte eine zeitabhängige Abnahme residueller Thyminindimere beobachtet werden. Nach 30 h ist etwa die Hälfte der Dimere repariert. (Abb. 21 ). Die Präinkubation mit BBI führte dazu, dass nach 30 h etwa 90% der Dimere repariert waren. (Abb. 21 ).

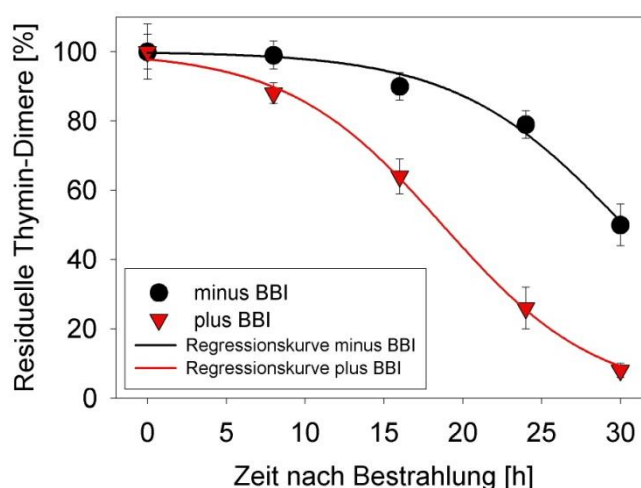


Abb. 21: Nachweis residueller Cyclobutan-Thyminindimere nach Bestrahlung mit UVB und nach Präinkubation mit BBI

Normale Fibroblasten wurden mit BBI (10  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt und mit einer Dosis von 100  $\text{J}/\text{m}^2$  bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Ausmaß residueller Thyminindimere mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt. Jeder Kurvenpunkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten. Für jedes unabhängige Experiment wurde eine nicht lineare Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f=100/(1+(\exp(b*(x-T))))$  durchgeführt. Die ermittelten Gleichungsparameter wurden für die Bedingungen „minus BBI“ und „plus BBI“ mit Hilfe des t-Tests miteinander verglichen. Für den Kurvenparameter wurde ein p-Wert von 0.94 und für den Parameter T ein p-Wert von  $3*10^{-7}$  ermittelt.

## 4.0 Diskussion

### 4.1 Der Bowman-Birk Proteinase Inhibitor - BBI

Der Bowman-Birk Proteinase Inhibitor wird in der Literatur als eine Substanz beschrieben, die sowohl eine chemikalieninduzierte, als auch eine strahleninduzierte Zelltransformation in vivo und in vitro verhindern kann (Billings, Carew et al. 1987; Kennedy 1994). Dabei finden sich widersprüchliche Angaben zur Notwendigkeit einer Präinkubation mit BBI; einige Autoren geben an, dass auch eine Behandlung nach Exposition mit einer Noxe ausreicht, um eine Zelltransformation zu verhindern (Kennedy 1994). Da eine strahleninduzierte Zelltransformation in vivo und in vitro sehr selten auftritt, wurde im Rahmen unserer Untersuchungen das zelluläre Überleben in vitro überprüft. Dabei zeigte sich, dass durch Behandlung mit BBI das klonogene Überleben einer Fibroblastenpopulation sowohl nach Bestrahlung mit UVB als auch nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung verbessert werden kann (Dittmann, Löffler et al. 1995; Dittmann, Knaus-Dittmann et al. 2001). Es zeigte sich aber auch, dass für eine maximale Wirksamkeit der Substanz in vitro - bezüglich des klonogenen Überlebens - eine Präinkubation erforderlich ist. Darüber hinaus ergab sich, dass eine Präinkubation für minimal 6 Stunden essentiell ist für den radioprotektiven Effekt (Dittmann, Gueven et al. 1998).

Die Relevanz der Präinkubation spricht für die Beteiligung von Prozessen, die durch BBI erst aktiviert werden müssen, wie z. B. die Transkription spezifischer Gene oder die Aktivierung bestimmter Proteine. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Notwendigkeit einer Präinkubation wäre, dass BBI eine bestimmte Zeit braucht, um an seinen Wirkort zu gelangen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da nach Zugabe von markiertem BBI die Substanz schon nach kurzer Zeit im Zytoplasma der Zielzelle nachweisbar war. Für eine Beteiligung spezifischer Proteine spricht auch die Beobachtung, dass ein optimaler BBI-Effekt vor allem in konfluenten Kulturen nachweisbar ist.

Konfluente Kulturen sind im Zellzyklus synchronisiert und verfügen über eine definierte Enzymausstattung, auf die BBI offensichtlich einen optimalen Effekt hat. BBI selbst konnte im Rahmen unserer Untersuchungen präferentiell im Zytoplasma nachgewiesen werden, d. h. der primäre Wirkort von BBI ist wahrscheinlich im Zytoplasma gelegen. Die Reaktion oder der Vorgang, der zur Radioprotektion der Zelle führt, läuft jedoch wahrscheinlich im Zellkern ab, denn die DNA ist der Hauptzielort der toxischen Wirkung der Strahlung. Folglich muss es einen Vermittler geben, der den radioprotektiven Effekt von BBI aus dem Zytoplasma in den Kern überträgt. Ein möglicher Kandidat ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). BBI interagiert – wie schon früher gezeigt (Gueven, Dittmann et al. 1998) – mit dem Phosphorylierungszustand des EGFR und damit mit dem Aktivitätszustand des Rezeptors. Neue Erkenntnisse zeigen, dass nach Aktivierung des EGFR durch Strahlung, der EGFR in die Caveolae internalisiert wird (Khan, Heidinger et al. 2006) und nach kurzer Zeit in einer perinukleären Lokalisation nachweisbar ist (Dittmann, Mayer et al. 2008). Dieser EGFR-Pool dient wahrscheinlich als Reservoir für den EGFR der in den Kern transportiert wird (Dittmann, Mayer et al. 2005). Nuklearer EGFR findet sich im Komplex mit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) einer Kinase, die essentiell für die Durchführung des nichthomologen „end-joinings“ ist (Jeggo 1997). Die Hemmung des EGFR-Kerntransports führt zu einer deutlichen Radiosensitivierung (Dittmann, Mayer et al. 2005). BBI-Behandlung induziert per se den Transport des EGFR in den Zellkern und stimuliert so die DNA-Reparatur (Dittmann, Mayer et al. 2005). Das eben aufgezeigte Signalling wurde für ionisierende Strahlung detailliert beschrieben, wurde in wesentlichen Punkten aber auch als richtig nach UV-Bestrahlung gefunden (persönliche Mitteilung Klaus Dittmann). Dabei muss allerdings postuliert werden, dass eine Radioprotektion das induzierte Schadensspektrum berücksichtigen muss. Der beobachtete Effekt auf die DNA-PK erklärt unter Umständen die Protektion nach ionisierender Bestrahlung, erklärt aber schwerlich den radioprotektiven Effekt nach UVB-

Behandlung. UVB induzierte Schäden werden mit Hilfe der Nukleotid-Exzissions-Reparatur aus der DNA entfernt (Moriwaki and Takahashi 2008). Eine mögliche Erklärung für die BBI-assozierte Radioprotektion nach UVB-Bestrahlung liefert die Beobachtung, dass der nukleäre EGFR in der Lage ist, über die Phosphorylierung des Restes Y211 die Stabilität von PCNA zu regulieren (Wang, Nakajima et al. 2006). PCNA spielt in der Tat eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von UV-induzierten DNA-Schäden (Karmakar, Balajee et al. 2001). Dieser Datensatz passt gut zu unserer Beobachtung, dass nach BBI-Vorbehandlung Zellen in der Lage sind, effizienter UV-induzierte Pyrimidindimere aus ihrem Genom zu entfernen (Dittmann, Knaus-Dittmann et al. 2001).

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den molekularen Mechanismus von BBI wäre, dass z. B. Proteine, die an der DNA-Reparatur nach Bestrahlung beteiligten sind, durch BBI im Zytoplasma synthetisiert werden und von dort in den Kern transportiert werden (Dittmann, Gueven et al. 1998). Ebenfalls für einen Effekt von BBI auf die DNA-Reparatur spricht die Beobachtung, dass die Radioprotektion von BBI besonders deutlich nachweisbar ist, wenn man ein sogenanntes "delayed plating" durchführt, d. h. man lässt den Zellen nach Induktion von DNA-Schäden Zeit zur Reparatur, bevor der klonogene Assay zur Bestimmung des zellulären Überlebens durchgeführt wird.

## **4.2 Einfluss von BBI auf die strahleninduzierte Zellantwort**

BBI weist seinen radioprotektiven Effekt im klonogenen Assay erst oberhalb einer Schwellendosis von  $50 \text{ J/m}^2$  auf, d. h. die von BBI beeinflussten zellulären Prozesse bringen bei Bestrahlung im niedrigen Dosisbereich keinen Überlebensvorteil oder es ist für die Induktion dieser Prozesse eine Schwellendosis notwendig. Bei höheren Dosen findet man jedoch eine klare Radioprotektion. Im niedrigen Dosisbereich (kleiner  $50 \text{ J/m}^2$ ) scheint der Effekt

von BBI jedoch radiosensitivierend zu sein; das klonogene Überleben der Zellen wird in Gegenwart von BBI reduziert. Auch in den Experimenten mit Massenkulturen kann man im niedrigen Dosisbereich unter  $50 \text{ J/m}^2$  einen antiproliferativen Effekt von BBI beobachten.

Dieser Effekt nach Bestrahlung mit UVB im niedrigen Dosisbereich konnte nach einer Bestrahlung von Normalzellen mit IR bislang nicht beobachtet werden, jedoch findet man den radioprotektiven Effekt von BBI bei höheren Dosen in gleichem Maße nach UVB- und IR-Bestrahlung (Dittmann et al., 1995). So ist es denkbar, dass der molekulare Mechanismus des radioprotektiven Effektes von BBI für die beiden Strahlenqualitäten Unterschiede aufweist.

Eine Erklärungsmöglichkeit für den antiproliferativen Effekt von BBI im niedrigen UVB-Dosisbereich lässt sich aus den Ergebnissen der Durchflusszytometrie ableiten. BBI verhindert offensichtlich den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und arretiert die Zellen präferentiell in der  $G_2$ -Phase. Dieser Arrest gibt den Zellen, die durch Bestrahlung DNA-Schäden davongetragen haben die Möglichkeit, die DNA-Reparatur einzuleiten. Für die mit „low-dose“ UVB behandelten Zellen, die nur geringe, durch die Basalaktivität der „Reparaturmaschinerie“ leicht zu behebbende Schäden aufweisen, ist der unter BBI induzierte - nicht erforderliche - Arrest vermutlich verantwortlich für den mit verminderter Klonbildungseffizienz einhergehenden antiproliferativen Effekt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den antiproliferativen Effekt von BBI im „low dose“ UV-Bereich liefert u. U. der beobachtete Effekt auf den EGFR. BBI-Behandlung führt zur EGFR-Internalisierung. Der EGFR steht zur Übertragung von proliferativen extrazellulären Signalen nicht mehr zur Verfügung. Da dieses Phänomen jedoch nicht in unbestrahlten Kulturen beobachtet wurde, kann der Effekt nicht sehr ausgeprägt sein. Dagegen wird im höheren UV-Dosisbereich der charakteristische, strahleninduzierte Zellzyklusarrest ( $G_1$ ) unter dem Einfluss von BBI verstärkt und mehr Zellen finden sich 24 h nach der Bestrahlung in der S-Phase. BBI hat dabei wahrscheinlich einen indirekten Effekt auf den Zellzyklusarrest, denn eine bloße Verstärkung des Zellzyklus-

arrests nach Bestrahlung - ohne positiven Effekt auf die DNA-Reparatur - könnte den radioprotektiven Effekt von BBI nicht erklären. Der Nachweis der Radioprotektion unter BBI mit einem funktionellen Assay, wie dem klonogenen Assay, der an die Funktionalität einer Zelle hohe Anforderungen stellt, spricht dafür, dass BBI statt dessen direkt auf die DNA-Reparatur Einfluss nimmt.

Eine wichtige Zellantwort, die die genetische Integrität einer Zelle nach der Induktion eines DNA-Schadens gewährleistet, ist die Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) (McCormack et al., 1998). Überraschenderweise besteht eine inverse Korrelation zwischen dem radioprotektiven Effekt von BBI und der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung mit UVB, d. h. nach BBI-Vorbehandlung induziert die nachfolgende Bestrahlung mehr Apoptose. Der verwendete Apoptose-ELISA erlaubt jedoch keine Aussage über die absolute Häufigkeit und damit über die Relevanz dieser Zellantwort für das Überleben einer Zellpopulation. Aus Experimenten mit ionisierender Bestrahlung ist jedoch bekannt, dass in Fibroblasten bei Verwendung von Strahlendosen bis 2 Gy - einer Dosis die bezüglich des klonogenen Zellüberlebens äquivalent zu  $100 \text{ J/m}^2$  UVB ist - die Apoptosehäufigkeit gering ist und absolut nie über 10 Prozent ansteigt. Da nach Bestrahlung mit UVB die Apoptoserate nach BBI-Präinkubation ansteigt, gleichzeitig aber ein gesteigertes Überleben nachweisbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt von BBI auf die Apoptose eine untergeordnete Rolle für das Überleben der Gesamtpopulation spielt. Wie schon bei den Experimenten zum klonalen Überleben und zum Überleben in der Massenkultur beobachtet werden konnte, zeigt BBI auch bei der Messung der Apoptose im Dosisbereich unter  $50 \text{ J/m}^2$  genau den inversen Effekt und verhindert die strahleninduzierte Apoptose. Dieses Ergebnis zeigt, dass Prozesse wie klonales Überleben, Zellproliferation, Apoptose und Zellzyklusregulation eng miteinander verknüpft sind und man kann postulieren, dass BBI seinen Effekt auf einen zentralen zellulären Prozess ausübt.

Neben dem programmierten Zelltod gibt es eine zweite Zellantwort nach Bestrahlung, die dazu führen kann, dass Fibroblasten zwar ihre Klonogenität verlieren, aber die genetische Integrität des Organismus dabei nicht aufs Spiel gesetzt wird. Diese Zellantwort ist die Zelldifferenzierung (Rodemann, Peterson et al. 1991). Nach Bestrahlung werden in den Zellen der Dermis genetische Programme angeschaltet, die dafür sorgen, dass die Zelle vom mitotisch aktiven Fibrozyten zum postmitotischen Fibroblasten differenziert. Diese experimentell induzierte Zelldifferenzierung verläuft wie die spontane, altersbedingte Differenzierung entlang der Abfolge: MF1 MF2 MF3 PMF4 PMF5 PMF6 (Bayreuther, Rodemann et al. 1988). Dabei repräsentieren die PMF-Zellen das postmitotische Zellkompartiment und unterscheiden sich in Morphologie und Biochemie deutlich vom mitotischen Kompartiment (Bayreuther, Rodemann et al. 1988). In vivo findet man in der Dermis sowohl Zellen, die dem mitotischen als auch dem postmitotischen Zellkompartiment angehören (Bayreuther, Rodemann et al. 1988). Man geht davon aus, dass mit zunehmender physiologischer Alterung der Haut die Relation beider Zellkompartimente sich verschiebt und die unterschiedlichen Syntheseleistungen und Syntheseprodukte die Charakteristika der alternden Haut generieren (Bayreuther, Rodemann et al. 1988). Durch Bestrahlung mit UV kann in vivo der Alterungsprozess der Haut beschleunigt werden (Kang, Fisher et al. 1997). Dieser Prozess lässt sich in Analogie in vitro nach Bestrahlung mit UV ebenfalls beobachten und ist durch eine höhere Frequenz postmitotischer Zellen charakterisiert (Rodemann 1989). Für ionisierende Bestrahlung konnte bereits gezeigt werden, dass in vitro die strahleninduzierte Fibroblastendifferenzierung durch eine Präinkubation der Zellen mit BBI reduziert werden kann (Dittmann, Löffler et al. 1995). Auch nach Bestrahlung der Fibroblasten mit einer Dosis von  $100 \text{ J/m}^2$  UVB konnte der Anteil postmitotischer Fibroblasten nach BBI-Präinkubation signifikant reduziert werden. Auf dieser Kenntnisbasis kann spekuliert werden, dass BBI evtl. auch in vivo in der Lage ist, die UV-induzierte Hautalterung positiv zu beeinflussen.



### 4.3 Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus von BBI

Der globale Effekt des BBI auf strahleninduzierte Zellantworten macht einen Effekt auf Schlüsselmoleküle der Zellregulation wahrscheinlich. Man geht davon aus, dass nach einer Behandlung der Zelle mit Noxen das Tumorsuppressorgen TP53 für die Festlegung der Zellantwort eine essentielle Rolle spielt (Lane 1992); (Kuerbitz, Plunkett et al. 1992; Clarke, Purdie et al. 1993). Dabei ist das TP53-Molekül wahrscheinlich an der Regulation der DNA-Schadensreparatur beteiligt (Kastan, Onyekwere et al. 1991).

Die strahleninduzierte Hochexpression des kurzlebigen TP53-Proteins - Halbwertszeit 20 min (Hall, McKee et al. 1993); (Cox and Lane 1995) - findet nach UV-Bestrahlung überwiegend durch Neusynthese statt (Reinke and Lozano 1997). Damit übereinstimmend findet sich nach Bestrahlung mit UVB eine schnelle Erhöhung der mRNAs für TP53 (Abb. 18), während die Proteinerhöhung erst nach einer zeitlichen Verzögerung zu beobachten ist. Die TP53-Proteinerhöhung nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung basiert dagegen hauptsächlich auf einer Proteinstabilisierung, d. h. es wird eine schnelle Hochexpression des Proteins beobachtet, während die strahleninduzierte mRNA-Synthese erst später beobachtet werden kann (Lu and Lane 1993);(Cox and Lane 1995); (Dittmann, Gueven et al. 1998). Die Stabilisierung des TP53-Proteins nach ionisierender Bestrahlung wird durch eine drastische Reduktion der Ubiquitinierung des Moleküls - einer Reaktion essentiell für den Abbau durch den Proteasomenkomplex - erreicht, während nach UVB-Bestrahlung die Ubiquitinierung des Moleküls nahezu unverändert bleibt (Maki and Howley 1997). Ein direkter Effekt von BBI - als Proteaseninhibitor - auf den proteolytischen Abbau von Proteinen im Zusammenhang mit seiner Funktion als Radioprotektor ist unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, dass der radioprotektive Effekt unabhängig von der antiproteolytischen Aktivität nachweisbar ist (Gueven, Dittmann et al. 1998).

Die unterschiedliche Regulation des TP53-Protein-Levels in Abhängigkeit von der Strahlenqualität, lässt die Frage aufkommen, ob nicht auch die Funktion von TP53 in Abhängigkeit von der Strahlenqualität unterschiedlich ist. Dafür spricht auch, dass sich das strahleninduzierte DNA-Schadensspektrum klar unterscheidet und die Zelle dadurch gezwungen ist - zumindest in einem gewissen Rahmen - schadensspezifisch zu reagieren.

TP53 greift - so weit heute bekannt - direkt und indirekt in die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden ein. Der direkte Eingriff erfolgt dabei durch die endogene Reparaturaktivität des TP53-Moleküls (Reed, Woelker et al. 1995). Zum einen weist der C-Terminus des TP53-Proteins Exonukleasefunktion auf (Mummenbrauer, Janus et al. 1996);(Janus, Albrechtsen et al. 1999), die in Kombination mit der Polymerase alpha - die diese Funktion, die für das Korrekturlesen des neu synthetisierten DNA-Strangs wichtig ist, nicht besitzt - die Synthesegenauigkeit dieses Enzyms deutlich erhöht (Huang 1998). Zum anderen erkennt TP53 einzelsträngige DNA und katalysiert DNA-Renaturation und Strangtransfer (Balaban, Moni et al. 1996);(Bill, Yu et al. 1997), beides wichtige Prozesse bei der Verhinderung von Basenpaar-Fehlpaarungen und bei der homologen Rekombination (Mekeel, Tang et al. 1997). Neben diesen direkten Effekten auf die DNA-Reparatur wirkt TP53 als Transkriptionsfaktor indirekt. Es kann dabei die Neusynthese einer Vielzahl von Molekülen induzieren. So aktiviert TP53 transkriptionell z. B. die reparaturrelevanten Gene ERCC3 (Wang, Forrester et al. 1994), Gadd45 (Kastan, Zhan et al. 1992), p21/waf1/cip (Namba, Hara et al. 1995) und leitet damit Zellantworten wie Zellzyklusarrest (Agarwal, Agarwal et al. 1995); (Canman, Wolff et al. 1994) und Apoptose ein (Lowe, Schmitt et al. 1993).

Für das Verständnis der TP53-Funktion bei unterschiedlichen Strahlenqualitäten ist es folglich wichtig zu wissen, welche dieser Funktionen des Moleküls zum Tragen kommt. So ist bekannt, dass nicht zwangsläufig eine große TP53-Proteinmenge auch eine hohe transkriptionelle Aktivität bedeutet (Lu, Burbidge et al. 1996). Auf welche Art und Weise die unterschiedlichen

Funktionen des Moleküls reguliert werden, ist bislang unklar. Man geht jedoch davon aus, dass Phosphorylierungs- (Cox and Lane 1995) bzw. Glykosylierungsreaktionen (Shaw, Freeman et al. 1996) eine Rolle spielen.

Um die Frage abzuklären, ob sich die UVB-induzierte TP53-Erhöhung und ihre Beeinflussung durch BBI in einer veränderten transkriptionellen Aktivität niederschlagen, wurden "EMSAs" durchgeführt. Das auffälligste Ergebnis dabei war die Reduktion der basalen DNA-bindenden Aktivität und der strahleninduzierten Aktivität des TP53 durch BBI (untere Bande). Diese Reduktion geht jedoch überraschenderweise mit einer beschleunigten Expression des Folgens p21/waf1/cip - auf Protein-Niveau - und des ERCC3-Gens - auf mRNA-Niveau - einher.

Diese Reaktion lässt sich jedoch nur interpretieren mit der Kenntnis der BBI-vermittelten TP53-Proteinexpression während der Präinkubationsphase. In dieser Phase - die für den radioprotektiven Effekt notwendig ist (Dittmann, Gueven et al. 1998) hebt BBI das TP53-Proteinniveau an. Diese Proteinerhöhung führt zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität und induziert die Expression von reparaturrelevanten Genen und Proteinen. So verfügt die Zelle bei einer nachfolgenden Bestrahlung über die Enzymausstattung für eine schnelle und effiziente Reparatur von DNA-Schäden.

Ist dieses Szenario richtig, müsste sich dies in einer beschleunigten oder verbesserten DNA-Schadensreparatur niederschlagen. Als Konsequenz sollte die Zelle nach einem Strahlenschaden schneller wieder in den normalen Zellzyklus zurückkehren (Maity, McKenna et al. 1994). Einen ersten Hinweis für die Richtigkeit dieser These kann man aus der Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung im oberen Dosisbereich ableiten. Offensichtlich ist der Anteil an S-Phase-positiven Zellen nach BBI-Behandlung leicht erhöht, d. h. mehr Zellen haben den Zellzyklusarrest und die damit verbundene DNA-Reparatur erfolgreich durchlaufen. In Übereinstimmung damit wird der DNA-Reparaturstimulierende Effekt von BBI bei der Messung der NER (Messung der

„unscheduled DNA-synthesis“(Dittmann, Knaus-Dittmann et al. 2001) nach UV-Bestrahlung beobachtet.

Die unter BBI gefundene Beschleunigung der DNA-Reparatur hat auf bislang unverstandene Weise einen positiven Effekt auf das Zellüberleben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre jedoch, dass die Reparatur von DNA-Schäden innerhalb eines definierten Zeitrahmens ablaufen muss, insbesondere bei Zellen, die unter Proliferationsdruck stehen. Zellen, die diesen zeitlichen Rahmen überschreiten, werden aus der Proliferation herausgenommen.

Abschließend muss jedoch festgestellt werden, dass bislang kein zweifelsfreier Beweis für eine Verbindung der aufgezeigten molekularbiologischen Effekte mit dem radioprotektiven Effekt von BBI erbracht wurde. Erst die lückenlose Aufklärung der molekularen Interaktionen von BBI mit Komponenten der Zelle wird diesen Zusammenhang beweisen können. Ebenso unklar ist die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf in vivo-Modellsysteme oder auf den Menschen und muss in zukünftigen Untersuchungen abgeklärt werden.

## 5.0 Zusammenfassung

UVB ist der energiereichste Bestandteil des Sonnenlichtes, der die Erdoberfläche erreicht. Man geht davon aus, dass die durch UVB in der DNA des Menschen induzierten Veränderungen eine wichtige Rolle bei Vorgängen wie Hauttumorinduktion oder Hautalterung spielen. Umso wichtiger ist das Verständnis und die Erforschung der molekularen Veränderungen und Reaktionen in der Zelle, die durch UV induziert werden. Eine Substanz, die dabei einen maßgeblichen Beitrag leisten kann, ist der Bowman-Birk Proteaseinhibitor. Die BBI-Präinkubation normaler Fibroblasten vor einer Bestrahlung mit UVB führte zu einem signifikant erhöhten Zellüberleben gemessen mit dem klonogenen Assay. Der radioprotektive Effekt war jedoch nur oberhalb einer Dosis von  $20 \text{ J/m}^2$  UVB messbar; unterhalb dieser Dosis wirkte BBI antiklonogen. Der radioprotektive Effekt wurde auch nach Behandlung von Massenkulturen beobachtet und zeigte sich in einer verbesserten Proliferationsfähigkeit. Der zellbiologische, radioprotektive Effekt von BBI besteht nicht darin, dass die strahleninduzierte Apoptoseinduktion reduziert wird, sondern dass die strahleninduzierte Zelldifferenzierung reduziert wird und vermehrt Zellen im proliferativen Zellkompartiment bleiben. Dabei ließ sich feststellen, dass der strahleninduzierte  $G_1$ -Zellzyklus-Arrest unter BBI 24 h nach Bestrahlung verstärkt nachweisbar war; gleichzeitig konnte ein erhöhter Anteil an Zellen in der S-Zellzyklusphase beobachtet werden. So kann spekuliert werden, dass der erhöhte Anteil von Zellen in der  $G_1$ -Phase mit verstärkter DNA-Reparaturaktivität assoziiert ist und damit das erhöhte Überleben nach BBI-Präinkubation erklärt werden kann.

Molekularbiologisch war der Effekt von BBI an die Präinkubationsphase vor Bestrahlung gebunden. In dieser Phase induzierte BBI eine Stabilisierung des regulatorisch wichtigen TP53-Proteins und eine Hochexpression des p21-Proteins. Nachfolgend kam es zur Expression der für die DNA-Reparatur essentiellen Gene ERCC3, Ligase I und TP53. Diese molekulare Reaktion vor Bestrahlung führte dazu, dass die UV-induzierten DNA-Schäden - die überwiegend durch Nukleotid-Exzisions-Reparatur behoben werden müssen - schneller behoben wurden, so dass die Zellen früher wieder in den normalen Zellzyklus zurückkehren konnten. So erlauben die Untersuchungen zum BBI

Einblicke in die molekulare Reaktion der Zelle nach UVB-Bestrahlung und geben eine Substanz an die Hand, mit deren Hilfe wahrscheinlich das mutagene Potential von UVB-Strahlung abgeschwächt werden kann.

## 6.0 Literaturverzeichnis

- Agarwal, M. L., A. Agarwal, et al. (1995). "TP53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8493-7.
- Ananthaswamy, H. N. and W. E. Pierceall (1990). "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis." Photochem Photobiol **52**(6): 1119-36.
- Balaban, N., J. Moni, et al. (1996). "The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation." Biochim Biophys Acta **1314**(1-2): 147-56.
- Baturay, N. Z. and H. Roque (1991). "In vitro reduction of peroxidation in UVC-irradiated cell cultures by concurrent exposure with Bowman-Birk protease inhibitor." Teratog Carcinog Mutagen **11**(4): 195-202.
- Bayreuther, K., H. P. Rodemann, et al. (1988). "Differentiation of fibroblast stem cells." J Cell Sci Suppl **10**: 115-30.
- Bayreuther, K., H. P. Rodemann, et al. (1988). "Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5112-6.
- Benjamin, C. L. and H. N. Ananthaswamy (2007). "p53 and the pathogenesis of skin cancer." Toxicol Appl Pharmacol **224**(3): 241-8.
- Bill, C. A., Y. Yu, et al. (1997). "A role for p53 in DNA end rejoining by human cell extracts." Mutat Res **385**(1): 21-9.
- Billings, P. C., J. A. Carew, et al. (1987). "A serine protease activity in C3H/10T1/2 cells that is inhibited by anticarcinogenic protease inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 4801-5.
- Blyumin, M. L., S. Hu, et al. (2007). "Insight into photocarcinogenesis." J Invest Dermatol **127**(12): 2700.
- Canman, C. E., A. C. Wolff, et al. (1994). "The p53-dependent G1 cell cycle checkpoint pathway and ataxia-telangiectasia." Cancer Res **54**(19): 5054-8.
- Cao, C., S. Lu, et al. (2008). "EGFR activation confers protections against UV-induced apoptosis in cultured mouse skin dendritic cells." Cell Signal.
- Clarke, A. R., C. A. Purdie, et al. (1993). "Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways." Nature **362**(6423): 849-52.
- Cox, L. S. and D. P. Lane (1995). "Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage." Bioessays **17**(6): 501-8.
- Daino, K., S. Ichimura, et al. (2006). "Both the basal transcriptional activity of the GADD45A gene and its enhancement after ionizing irradiation are mediated by AP-1 element." Biochim Biophys Acta **1759**(10): 458-69.
- Devary, Y., R. A. Gottlieb, et al. (1992). "The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases." Cell **71**(7): 1081-91.

- Devary, Y., C. Rosette, et al. (1993). "NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal." Science **261**(5127): 1442-5.
- Dittmann, K., D. Knaus-Dittmann, et al. (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., H. Loffler, et al. (1995). "Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture." Radiother Oncol **34**(2): 137-43.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **280**(35): 31182-9.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2008). "The radioprotector Bowman-Birk proteinase inhibitor stimulates DNA repair via epidermal growth factor receptor phosphorylation and nuclear transport." Radiother Oncol **86**(3): 375-82.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2005). "Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity." Radiother Oncol **76**(2): 157-61.
- Dittmann, K. H., N. Gueven, et al. (1998). "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): 648-55.
- Dittmann, K. H., N. Gueven, et al. (1998). "The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA repair-relevant genes." Int J Radiat Biol **74**(2): 225-30.
- Dregoes, D., A. P. Rybak, et al. (2007). "Increased expression of p53 enhances transcription-coupled repair and global genomic repair of a UVC-damaged reporter gene in human cells." DNA Repair (Amst) **6**(5): 588-601.
- Duke, R. C., J. J. Cohen, et al. (1986). "Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells." J Immunol **137**(5): 1442-7.
- Englaro, W., B. Derijard, et al. (1998). "Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human normal keratinocytes." Oncogene **16**(5): 661-4.
- Gilchrest, B. A., H. Y. Park, et al. (1996). "Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation." Photochem Photobiol **63**(1): 1-10.
- Gueven, N., K. Dittmann, et al. (1998). "The radioprotective potential of the Bowman-Birk protease inhibitor is independent of its secondary structure." Cancer Lett **125**(1-2): 77-82.
- Hall, P. A., P. H. McKee, et al. (1993). "High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin." Oncogene **8**(1): 203-7.
- Hanasoge, S. and M. Ljungman (2007). "H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase." Carcinogenesis **28**(11): 2298-304.



- Holick, M. F., J. A. MacLaughlin, et al. (1980). "Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences." Science **210**(4466): 203-5.
- Huang, P. (1998). "Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein." Oncogene **17**(3): 261-70.
- Ikehata, H., F. Yanase, et al. (2007). "Mutation spectrum in UVB-exposed skin epidermis of Xpa-knockout mice: frequent recovery of triplet mutations." Environ Mol Mutagen **48**(1): 1-13.
- Janus, F., N. Albrechtsen, et al. (1999). "The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity." Cell Mol Life Sci **55**(1): 12-27.
- Jeggo, P. A. (1997). "DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics." Mutat Res **384**(1): 1-14.
- Kang, S., G. J. Fisher, et al. (1997). "Photoaging and topical tretinoin: therapy, pathogenesis, and prevention." Arch Dermatol **133**(10): 1280-4.
- Karmakar, P., A. S. Balajee, et al. (2001). "Analysis of repair and PCNA complex formation induced by ionizing radiation in human fibroblast cell lines." Mutagenesis **16**(3): 225-32.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6304-11.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, et al. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." Cell **71**(4): 587-97.
- Kennedy, A. R. (1994). "Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors." Cancer Res **54**(7 Suppl): 1999s-2005s.
- Khan, E. M., J. M. Heidinger, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking." J Biol Chem **281**(20): 14486-93.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, et al. (1992). "Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7491-5.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.
- Lowe, S. W., E. M. Schmitt, et al. (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-9.
- Lu, X., S. A. Burbidge, et al. (1996). "Discordance between accumulated p53 protein level and its transcriptional activity in response to u.v. radiation." Oncogene **13**(2): 413-8.
- Lu, X. and D. P. Lane (1993). "Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?" Cell **75**(4): 765-78.
- Madronich, S. and F. R. de Gruijl (1994). "Stratospheric ozone depletion between 1979 and 1992: implications for biologically active ultraviolet-B

- radiation and non-melanoma skin cancer incidence." Photochem Photobiol **59**(5): 541-6.
- Maity, A., W. G. McKenna, et al. (1994). "The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review." Radiother Oncol **31**(1): 1-13.
- Maki, C. G. and P. M. Howley (1997). "Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation." Mol Cell Biol **17**(1): 355-63.
- Mekeel, K. L., W. Tang, et al. (1997). "Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination." Oncogene **14**(15): 1847-57.
- Moan, J. and A. Dahlback (1992). "The relationship between skin cancers, solar radiation and ozone depletion." Br J Cancer **65**(6): 916-21.
- Moriwaki, S. and Y. Takahashi (2008). "Photoaging and DNA repair." J Dermatol Sci **50**(3): 169-76.
- Mummenbrauer, T., F. Janus, et al. (1996). "p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity." Cell **85**(7): 1089-99.
- Namba, H., T. Hara, et al. (1995). "Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF1/Cip1 pathway in human thyroid cells." Cancer Res **55**(10): 2075-80.
- Pentland, A. P., M. Mahoney, et al. (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.
- Rapp, A. and K. O. Greulich (2004). "After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available." J Cell Sci **117**(Pt 21): 4935-45.
- Reed, M., B. Woelker, et al. (1995). "The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9455-9.
- Reinke, V. and G. Lozano (1997). "Differential activation of p53 targets in cells treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest." Radiat Res **148**(2): 115-22.
- Roddey, P. K., M. Garmyn, et al. (1994). "Ultraviolet irradiation induces c-fos but not c-Ha-ras proto-oncogene expression in human epidermis." J Invest Dermatol **102**(3): 296-9.
- Rodemann, H. P. (1989). "Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro." Differentiation **42**(1): 37-43.
- Rodemann, H. P., H. P. Peterson, et al. (1991). "Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation." Scanning Microsc **5**(4): 1135-42; discussion 1142-3.
- Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, et al. (1994). "Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response." Cell **78**(6): 963-72.

- Schmidt-Ullrich, R. K., R. B. Mikkelsen, et al. (1997). "Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation." Oncogene **15**(10): 1191-7.
- Shaw, P., J. Freeman, et al. (1996). "Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus." Oncogene **12**(4): 921-30.
- Truhan, A. P. (1991). "Sun protection in childhood." Clin Pediatr (Phila) **30**(12): 676-81.
- Wang, S. C., Y. Nakajima, et al. (2006). "Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability." Nat Cell Biol **8**(12): 1359-68.
- Wang, X. W., K. Forrester, et al. (1994). "Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2230-4.
- Wu, Y., D. Xing, et al. (2007). "Bid is not required for Bax translocation during UV-induced apoptosis." Cell Signal **19**(12): 2468-78.
- Wu, Y., D. Xing, et al. (2008). "Regulation of Bax activation and apoptotic response to UV irradiation by p53 transcription-dependent and -independent pathways." Cancer Lett.

## 7.0 Abkürzungen

BBI	Bowman Birk Protease Inhibitor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
C3H	Mausfibroblasten der Zelllinie C3H 10T1/2
Cpd	kumulative Populationsverdoppelung
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecos modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	“epidermal growth factor”
EGFR	“epidermal growth factor receptor”
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assay”
FCS	“fetal calf serum”
Fos	Onkogen aus dem FB-Mäuse-Osteosarkoma-Virus
g	Gramm oder Zentrifugalbeschleunigung
Gadd 45	„growth arrest and DNS damage inducible protein 45 kda“
Gy	Gray
h	Stunde
IL	Interleukin
IR	ionisierende Strahlung
Jun	Abk. vom japanischen “ju-nana”=17; Onkogen
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	molar
MDM2	„mouse double minute 2“; TP53-bindendes Protein
MCA	3-Methylcholanthren
min	Minute
ml	Milliliter
Myc	„myelocytomatosis oncogene“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PTK	Tyrosinkinase
P-Tyr	O-Phospho-L-Tyrosin
RB	“retinoblastoma”
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
TNF	„tumor necrosis factor“
Tp53	“tumor suppressor protein 53”
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

## 8.0 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. P. Rodemann für die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit und für sein Interesse an den Fortschritten meiner Experimente. Darüber hinaus ermöglichte er es mir, meine Arbeit auf internationalen Kongressen zu präsentieren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Dittmann und Herrn C. Mayer für das kollegiale Verhältnis, die Hilfsbereitschaft, die produktiven Diskussionen und ihren Humor bedanken. Die Stimmung in unserer Arbeitsgruppe war ausgezeichnet. Besonders hervorheben möchte ich das Engagement von Herrn Prof. Klaus Dittmann bei der Planung und Umsetzung meiner Dissertation. Für seine Hilfsbereitschaft und sein positives Denken danke ich ihm sehr herzlich.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Sektion Strahlenbiologie bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Mutter und meinen Kindern.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen, deren Namen nicht explizit genannt wurden, die aber dennoch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## 9.0 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

1958	geboren in Bamberg
1985	Heirat; Prof. Dr. Klaus Dittmann
1994-1998	Geburt der 3 Kinder

### Schulische und berufliche Daten:

1964-1970	Besuch der Grundschule Viereth bei Bamberg
1970-1974	Besuch der Realschule Bamberg; Abschluss: Mittlere Reife
1974-1976	Ausbildung zur Arzthelferin; Kinderarztpraxis Dr. Hans P.R. Mayer, Bamberg
1976-1978	Ausbildung zur Medizinisch Technischen Assistentin
1978-1979	MTLA am Universitäts-Klinikum Würzburg, Anatomisches Institut
1979-1986	MTLA am Universitäts-Klinikum Würzburg, Neurochirurgie, Neuroendokrines Labor
1984-1987	Abendgymnasium Würzburg
1987-1989	Abendgymnasium München; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1987-1988	schulbegleitend Tätigkeit als MTLA am Klinikum Großhadern der LMU München, Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie
1989-1992	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München; Abschluss: Ärztliche Vorprüfung
1989-1992	studienbegleitend Tätigkeit als MTLA am Klinikum Großhadern der LMU München, Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie

1992-2007	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Mai 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998-2001	Promotionsarbeit im Labor für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Prof. Dr. H. Peter Rodemann, Klinik für Radioonkologie der Universität Tübingen, Prof. Dr. Michael Bamberg.
08.05.2007	Ärztliche Prüfung
August 2007	Approbation als Ärztin
seit Oktober 2007	Assistenzärztin in Weiterbildung an der Universitäts- klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Tübingen, Prof. Dr. G. Buchkremer; seit April 2010 Prof. Dr. A.J. Fallgatter

Tübingen, den 22. 04. 2011