

**Aus der Abteilung Nuklearmedizin
(Prof. Dr. med. J. Meller)
Im Zentrum Radiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Strahlenwirkungen auf primäre Prostata-Epithelzellen (PrEC) in Abhängigkeit von der
Strahlenart und von der Vorbehandlung mit Natriumselenit**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Kathrin Lächner
aus
Crailsheim

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Emmert (Koreferent)

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oppermann (Promotor)

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2012

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Material und Methoden	16
2.1 Zellen	16
2.2 Bestrahlung	16
2.3 Zellkultivierung	17
2.4 Apoptose-Auswertung: Morphologischer Assay	18
2.5 Apoptose-Auswertung: Caspase-3/7-Aktivierung	21
2.6 Apoptose-Auswertung: Tunel-Assay	23
2.7 Seneszenz-Auswertung: β -Galaktosidase-Assay	25
2.8 Zellstatus bezüglich der zelleigenen antioxidativen Abwehr:	27
2.8.1. Glutathion-Assay	27
2.8.2. Gesamt-SOD-Assay	29
2.9 Koloniebildungsassay	30
3. Ergebnisse	34
3.1 Morphologischer Assay: Strahleninduzierte Apoptose in PrEC mit und ohne Natriumselenit-Vorbehandlung	34
3.2 Caspase-3-Aktivität in unterschiedlich behandelten PrEC-Zellen	37
3.3 Auswertung der späten Apoptosen mittels Tunel-Assay	40
3.4 Vergleich des antioxidativen Zellstatus in PrEC, DU-145 und PC3-Zelllinien anhand von GSH- und Gesamt-SOD-Messungen	41
3.4.1 Intrazellulärer GSH-Spiegel	42
3.4.2 Intrazellulärer Gesamt-SOD-Spiegel	44
3.5 Der Einfluss von Bestrahlung und Natriumselenit-Vorbehandlung auf die Induktion der vorzeitigen Seneszenz	45
3.6 Klonogenes Überleben der PrEC-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder mit Stickstoff-Ionen und Vorbehandlung mit Natriumselenit	50

4. Diskussion	54
5. Zusammenfassung	72
6. Anhang	74
6.1 Abbildungsverzeichnis	74
6.2 Tabellenverzeichnis	75
7. Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
abs. Alkohol	absoluter Alkohol
AI	<u>A</u> poptose- <u>I</u> ndex, gibt den relativen Anteil an apoptotischen Zellen an
AP	<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
Bak	pro-apoptotischer Mediator in Mitochondrien
Bax	pro-apoptotischer Mediator in Mitochondrien
Bcl- 2	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma protein <u>2</u>
Bid	pro-apoptotischer Mediator in Mitochondrien
BPE	<u>B</u> ovine <u>P</u> ituitary <u>E</u> xtract
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
Caspase	<u>C</u> ysteine-dependent <u>a</u> spartate-specific <u>P</u> rotease
CO ₂	Kohlendioxid
Cu	Kupfer
DAPI	4',6- <u>D</u> iamino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol, Filter für fluoreszierenden Farbstoff
DEVD	bis-NCBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparic acid amide
DISC	<u>D</u> eath- <u>i</u> ntroducing <u>s</u> ignalling <u>c</u> omplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DNA-PK	<u>D</u> NA- <u>a</u> bhängige <u>P</u> roteinkinase
DTNB	5,5'- <u>d</u> ithio-bis-2-(<u>n</u> itro <u>b</u> enzoic acid)
DU-145	Prostatakarzinom-Zelllinie aus einer Gehirnmetastase
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
GSH	reduzierte Form des Glutathion
GSH MES	Puffer, bestehend aus 0.4 M 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid, 0.1 M phosphate, 2 mM EDTA, pH 6.0
GSSG	oxidierte Form des Glutathion
GSTNB	ein gemischtes Disulfid, zwischen GSH und TNB
Gy	<u>G</u> ray, Einheit der Energiedosis
HCl	Salzsäure
hEGF	<u>h</u> uman <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
HEPES	N-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl) <u>p</u> iperazin-N'-2- <u>e</u> thansulfonsäure

HIV	<u>H</u> umanes <u>I</u> mmundefizienz- <u>V</u> irus
H ₂ O	Wasser
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
LET	<u>L</u> inerarer <u>E</u> nergie- <u>T</u> ransfer
LNCaP	hormonsensitive Prostatakarzinom-Zelllinie aus einer Lymphknotenmetastase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mM	Millimol
MnSOD	<u>M</u> angan- <u>S</u> uperoxid- <u>D</u> ismutase
MPA	Metaphosphorsäure
O ₂	Sauerstoff
p21	Zyclin-abhängige Kinase
p53	Tumorsuppressorgen
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.: <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> odium)
PBS CMF	gepuffertes Natriumphosphat, Calcium-frei, Magnesium-frei
PC3	Prostatakarzinom-Zelllinie aus einer Knochenmetastase
PCA	Prostatakarzinom
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PrEC	Prostataepithelzellen (<u>P</u> rostate <u>E</u> pithelial <u>C</u> ells)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies (Sauerstoffradikale)
SOD	<u>S</u> uperoxid- <u>D</u> ismutase
TdT	<u>t</u> erminal <u>d</u> esoxynucleotidyl <u>t</u> ransferase
TEAM	<u>T</u> riethanol <u>a</u> min
TIS	<u>T</u> herapie- <u>i</u> nduzierte <u>S</u> eneszenz
TNB	5- <u>t</u> hio-2- <u>n</u> itro <u>b</u> enzoic acid
Tunel	<u>t</u> erminal deoxynucleotidyl transferase mediated d <u>U</u> TP <u>n</u> ick <u>e</u> nd labeling
WAF1	Cyclin-abhängige Kinase
X-Gal	5- bromo-4-chloro-3-indolyl-β D-galactopyranoside
Zn	Zink

1. Einleitung und Fragestellung

Das Prostatakarzinom (PCA) ist der häufigste maligne Tumor des Mannes (Schlemmer 2008) und die dritthäufigste Todesursache unter den malignen Erkrankungen (Marech et al. 2012). Da das Alter den größten Risikofaktor darstellt, resultiert in den westlichen Industrieländern angesichts einer steigenden Lebenserwartung ein wachsendes Gesundheitsproblem. Aufgrund der kontinuierlich ansteigenden Inzidenz, steckt ein enormer gesellschaftlicher Nutzen in der Erforschung neuer, effektiver Therapiemöglichkeiten.

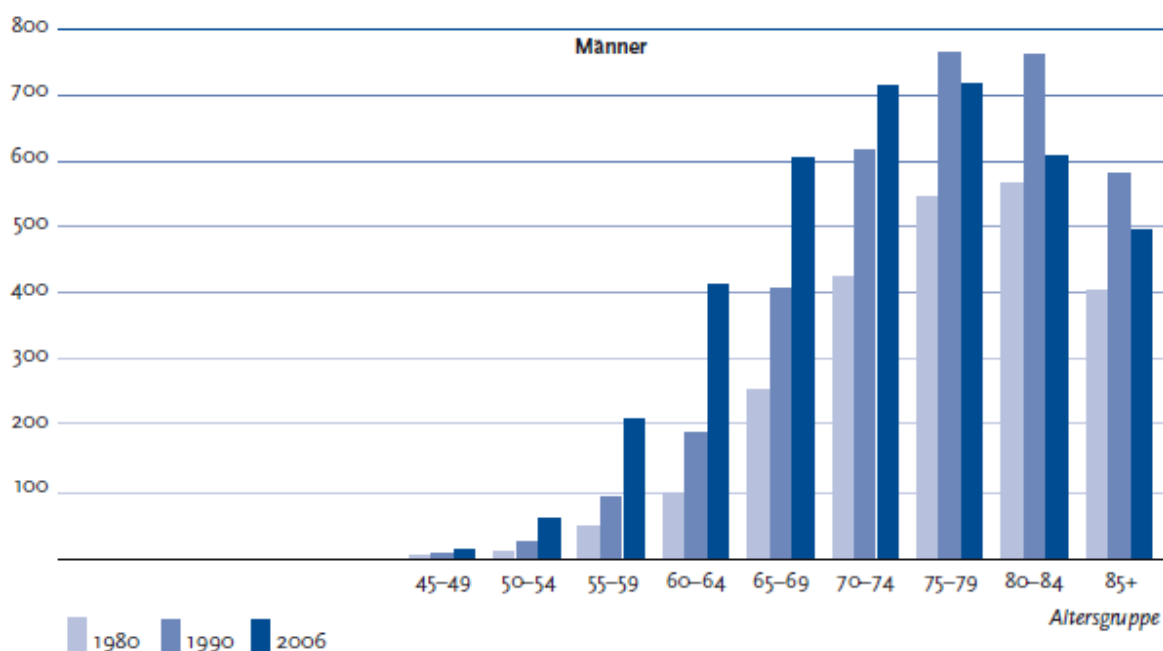


Abbildung 1-1: Altersspezifische Erkrankungsdaten für 1980, 1990 und 2006:

Fälle pro 100.000 (Europa standardisiert). Datenquelle: Krebs in Deutschland 2005/2006 (2010), S. 73.

Im Unterschied zu vielen anderen Krebserkrankungen besteht beim Prostatakarzinom die Möglichkeit, aus unterschiedlichen Therapieoptionen zu wählen.

Die radikale Prostatektomie ist eine primäre Therapieoption für Patienten mit klinisch lokal begrenzten Prostatakarzinomen aller Risikogruppen. Die perkutane (externe) Strahlentherapie ist ebenfalls eine primäre Therapieoption beim lokal begrenzten Prostatakarzinom. Neben der perkutanen Strahlentherapie existiert auch die Möglichkeit

einer interstitiellen Strahlentherapie (Brachytherapie). Die interstitielle LDR (low-dose-rate)-Monotherapie (Jod-125) ist eine primäre Therapieoption zur Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms mit niedrigem Risikoprofil. Die HDR (high-dose-rate)-Brachytherapie (Iridium-192), kombiniert mit der perkutanen Strahlentherapie, ist eine primäre Therapieoption bei Patienten mit Tumoren des mittleren und hohen Risikoprofils. Eine kurative Behandlung des Prostatakarzinoms ist bisher nur im organbegrenzten Stadium möglich.

Da maligne Prostatazellen relativ radioresistent sind, muss die therapeutische Strahlendosis vergleichsweise hoch angesetzt werden (70 bis 72 Gy), um einen Erfolg zu erzielen (Bromfield et al. 2003).

Während einer Bestrahlung wird immer auch gesundes Gewebe mit bestrahlt. Deshalb ist es wichtig, die Strahlenwirkungen auf das umgebende gesunde Gewebe ebenfalls zu erfassen, auch in Hinsicht auf das erhöhte Zweitmalignom-Risiko nach Bestrahlung. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Dissertation zusätzlich die Wirkungen von dicht-ionisierender Ionen-Strahlung auf normale Prostata-Epithelzellen untersucht, was eine neue strahlentherapeutische Option darstellt.

Ionisierende Strahlung induziert direkt DNA-Schäden durch Ionisation und indirekt über die Bildung von reaktiven oxidativen Spezies (reactive oxygen species, ROS), die in Folge der Wasser-Radiolyse und der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff in den Zellen entstehen. Die DNA-Schäden umfassen u.a. Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Basenschäden incl. oxidativer Basenschäden, komplexe (mehrfache) Schäden und Vernetzungen (neue Kovalentbindungen zwischen DNA und DNA oder Protein), wobei die DNA-Doppelstrangbrüche die schwerwiegendsten sind (Hada und Georgakilas 2008). Sind dann zelluläre Reparaturmechanismen erfolgreich, tritt die Zelle wieder in den Zellzyklus ein. Sind irreparable Schäden entstanden, kann es zur Seneszenz, zur Apoptose oder zur mitotischen Katastrophe kommen. Die Apoptose spielt häufig nur eine untergeordnete Rolle, weil in vielen Tumoren die pro-apoptotischen Gene mutiert sind (Bromfield et al. 2003).

Dünn ionisierende Strahlung, wie z.B. die Röntgenstrahlung, führt auf ihrer Flugstrecke zu einer Vielzahl an Einzelanregungen oder Einzelionisationen. Dadurch entsteht in relativ großen Abständen eine große Zahl von Schäden geringen Ausmaßes. Diese Schäden können

gut repariert werden und aufgrund der relativ großen Abstände zwischen benachbarten Schäden findet selten eine Fehlreparatur statt, die ihrerseits zur Entstehung von Chromosomenaberrationen führen könnte.

Derzeitige Standard-Therapiemethoden, die mit dünn ionisierender Strahlung durchgeführt werden, erzielen bei resistenten Primärtumoren und bei metastasierten Tumoren keine kurative Wirkung. Die Tumorremission ist nicht ausreichend und es entstehen Rezidive.

Ionenstrahlung, und hierbei vor allem die Kohlenstoff- oder Stickstoffionen (schwere Ionen), bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Röntgenstrahlung. Beim Durchgang dicht ionisierender Strahlung (wie z.B. Kohlenstoffionen) durch Materie liegen die Ionisationsereignisse wesentlich dichter als bei dünn ionisierender Strahlung. Bei gleicher Strahlendosis werden vermehrt schwer reparable oder nicht-reparable komplexe DNA-Schäden induziert. Deshalb hat dicht ionisierende Strahlung im Vergleich zu dünn ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung) eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW, relative biological effectiveness, RBE), was der Hauptgrund für die Verwendung in der Radiotherapie ist (Kraft et al. 1999). Die relative biologische Wirksamkeit ist der Quotient aus denjenigen Energiedosen einer Referenzstrahlung und der zu untersuchenden Strahlung, die im Testsystem den gleichen biologischen Effekt aufweisen (bei denen z.B. 50 % der bestrahlten Zellen absterben).

Ionenstrahlung ist auch aufgrund ihrer günstigeren Tiefendosis-Verteilung im Gewebe der Röntgenstrahlung überlegen. Die Dosis im Eingangsbereich ist niedrig, erhöht sich mit der Durchdringtiefe und gipfelt in einem Dosismaximum, nahezu am Ende der Teilchenbahn, in dem Bragg-Peak. Die Reichweite der Ionen ist dadurch genau definiert. Hinter dem Bragg-Peak erfolgt ein scharfer Dosis-Abfall, wodurch erreicht wird, dass nur ein kleiner Teil der Strahlung an das umgebende (gesunde) Gewebe abgegeben wird und eine höhere Dosis im Zielvolumen erzielt werden kann (Hamada et al. 2010). Durch Überlagerung mehrerer Bragg-Peaks (spread-out Bragg-Peak, SOBPs) wird eine millimetergenaue Therapieplanung ermöglicht und die Rate an unerwünschten Nebenwirkungen im gesunden Gewebe gesenkt (Hamada et al. 2010).

Schwerionen werden wegen ihrer großen Masse kaum durch Stöße mit Elektronen in der Materie des Gewebes abgelenkt, so dass sie den Körper auf einer geraden Bahn

durchqueren. All diese Vorteile erlauben bei einer präzisen Diagnostik eine bessere Zielanpassung der Bestrahlung, als es durch Röntgenstrahlung möglich ist.

Die Ionentherapie kann deshalb die Tumorzellen sehr wirkungsvoll abtöten (Kraft et al. 1999; Yoshifumi et al. 2004). Aus den hohen lokalen Dosen, die durch den Bragg-Peak entstehen, resultiert eine verminderte Fähigkeit der Zellen, die komplexen DNA-Schäden zu reparieren.

Die folgende Abbildung 2 zeigt den Dosisverlauf für Röntgen- und Ionenstrahlung im biologischen Gewebe.

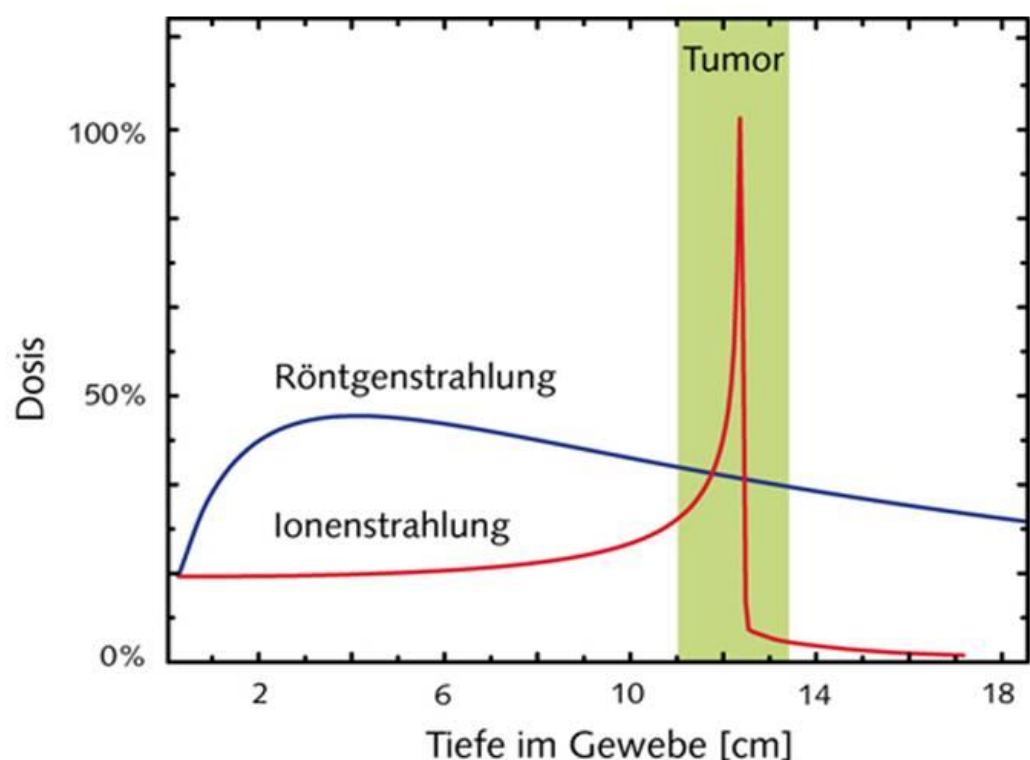


Abbildung 1-2: Vergleich Röntgenstrahlung und Ionenstrahlung:

Dosis (in %) in Abhängigkeit von der Tiefe im Gewebe (in cm).

(Übernommen aus:

www.gsi.de/portrait/Broschueren/Therapie/krebszellen.html,

Erscheinungsdatum: 28.12.2011).

Obwohl schwere Ionen sehr günstige physikalische und biologische Eigenschaften besitzen, muss die generelle Rolle der Kohlenstoff-Strahlentherapie noch detaillierter bestimmt werden. Studien in Japan haben gezeigt, dass diese Therapieoption u.a. hervorragend für die Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms geeignet ist, aber auch im lokal fortgeschrittenen Stadium beachtliche Erfolge aufweist (Shimazaki et al. 2010).

Die Apoptose hat als Mechanismus des Zelltodes bei der Röntgenbestrahlung solider Tumore häufig eine untergeordnete Rolle gespielt. Takahashi et al. (1998) zeigten, dass die Apoptoserate in strahlenresistenten Tumoren durch eine Kohlenstoffionen-Therapie erhöht werden konnte. Kohlenstoffionen können in strahlenresistenten Tumoren auch eine p53-unabhängige Apoptose induzieren (Hamada et al. 2010). In humanen Zellen mit mutiertem Transkriptionsfaktor p53 konnte gezeigt werden, dass Ionen-induzierte Schäden zur Aktivierung der Caspase 3 und zu einer p53-unabhängigen Apoptose führen (Yamakawa et al. 2008).

Das Ziel der Bestrahlung von malignen Zellen ist es, die Proliferation dieser Zellen zu beenden oder zumindest einzuschränken. Wie bereits erwähnt, kann dies durch die Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose, erzielt werden. Die Apoptose stellt einen wichtigen Zelltodmechanismus dar. Der Transkriptionsfaktor p53 spielt dabei eine sehr zentrale Rolle. P53 kontrolliert Zielgene, welche u.a. Einfluss auf Zellzyklusarrest, Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden, Apoptose und Seneszenz haben (Eriksson und Stigbrand, 2010).

Treten Schäden an der DNA in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen auf (z.B. durch ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika, Onkogene oder durch erhöhten oxidativen Stress), blockiert p53 den Zellzyklus und prüft, ob der entstandene Schaden reparabel oder irreparabel ist. Sind die DNA-Reparatursysteme in der Lage, den Schaden fehlerfrei zu beheben, so entstehen keine weiteren Folgen und die Zelle tritt wieder in den Zellzyklus ein. Eine fehlerhafte Reparatur kann hingegen Mutationen, Chromosomenaberrationen, Zelltod oder maligne Zelltransformation zur Folge haben. Ist eine Reparatur nicht möglich, weil z.B. das Ausmaß des DNA-Schadens zu groß ist, dann kommt es zum Exitus der Zelle. Damit wird normalerweise eine maligne Zelltransformation verhindert. Das Zellsterben kann über den

programmierten Zelltod (Apoptose), über den mitotischen Zelltod oder über einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz) ablaufen.

Die Apoptose kann über mehrere Signalwege eingeleitet werden. Diese können vom Transkriptionsfaktor p53-abhängig oder unabhängig sein. Nach Schädigung der DNA führt eine p53-abhängige Signalkaskade über die Hochregulation unterschiedlicher Proteine, wie z.B. der DNA-PK (DNA-abhängige Protein Kinase), zur Phosphorylierung von p53 im Nukleus (Shieh et al. 1997). Da p53 die Bcl-2-Expression in den Mitochondrien reguliert, kommt es zu einem Überwiegen von pro-apoptotischen Proteinen, wie Bid, Bak und Bax, gegenüber den anti-apoptotischen Proteinen, wie Bcl-2 im Mitochondrium (Verheij und Bartelink 2000). Diese Störung des Gleichgewichts führt zur Entstehung von Permeabilitäts-Transitions-Poren in der mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von Cytochrom c, einem Apoptose-Mediatorprotein, welches an den monomeren Appototic protease activating factor 1 (Apaf-1) bindet. Es entsteht ein Apoptosom, welches die Procaspase 9 bindet und in die aktive Caspase 9 umwandelt. Diese aktiviert daraufhin die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 (Xiang et al. 2009). Effektorcaspasen leiten die Zerstörung von überlebenswichtigen zellulären Proteinen ein und führen damit zum unwiderruflichen Zelltod.

Zahlreiche Stimuli, wie z.B. ROS, initiieren über eine zweite Signalkaskade eine p53-unabhängige Apoptose (Green und Reed 1998). Hierbei kommt es direkt zur Freisetzung von Cytochrom c aus der mitochondrialen Membran und damit zur Aktivierung von Effektorcaspasen.

Ein dritter Signalweg läuft über die SAPK/JNK-Kaskade ab. Dies kann p53-abhängig oder p53-unabhängig über eine direkte Aktivierung von Effektorcaspasen erfolgen (Verheij und Bartelink 2000).

Die Apoptose kann leider nicht in ausreichendem Ausmaß in allen Tumorzellen induziert werden, da in diesen Zellen viele pro-apoptotische Proteine infolge von Mutationen oder Deletionen nicht mehr funktionsfähig sind oder die anti-apoptotischen Proteine, wie z.B. Bcl-2, verstärkt exprimiert werden (Igney und Krammer 2002). In etwa 50 % aller Krebszellen ist z. B. das Gen TP53 mutiert oder deletiert (Soussi und Lozano 2005).

In vielen Untersuchungen stellte man fest, dass die Apoptose nicht allein für die therapeutischen Effekte einer Bestrahlung verantwortlich gemacht werden kann (Eriksson und Stigbrand 2010). Eine Reihe alternativer Mechanismen, die zum Zelltod führen, leisten

einen ebenso wichtigen Beitrag zum Absterben von bestrahlten Tumorzellen. Zu nennen sind hier der permanente G1-Arrest, d.h. die prä-replikative Seneszenz, sowie die Autophagie. Einen besonderen Stellenwert nimmt die mitotische Katastrophe ein, welche neben der Apoptose die zweite wichtige Ursache des Zelltods nach einer Bestrahlung darstellt (Verheij 2008).

Folgende Abbildung stellt die wichtigsten Ursachen einer DNA-Schädigung dar und zeigt die möglichen zellulären Antworten und ihre Folgen auf.

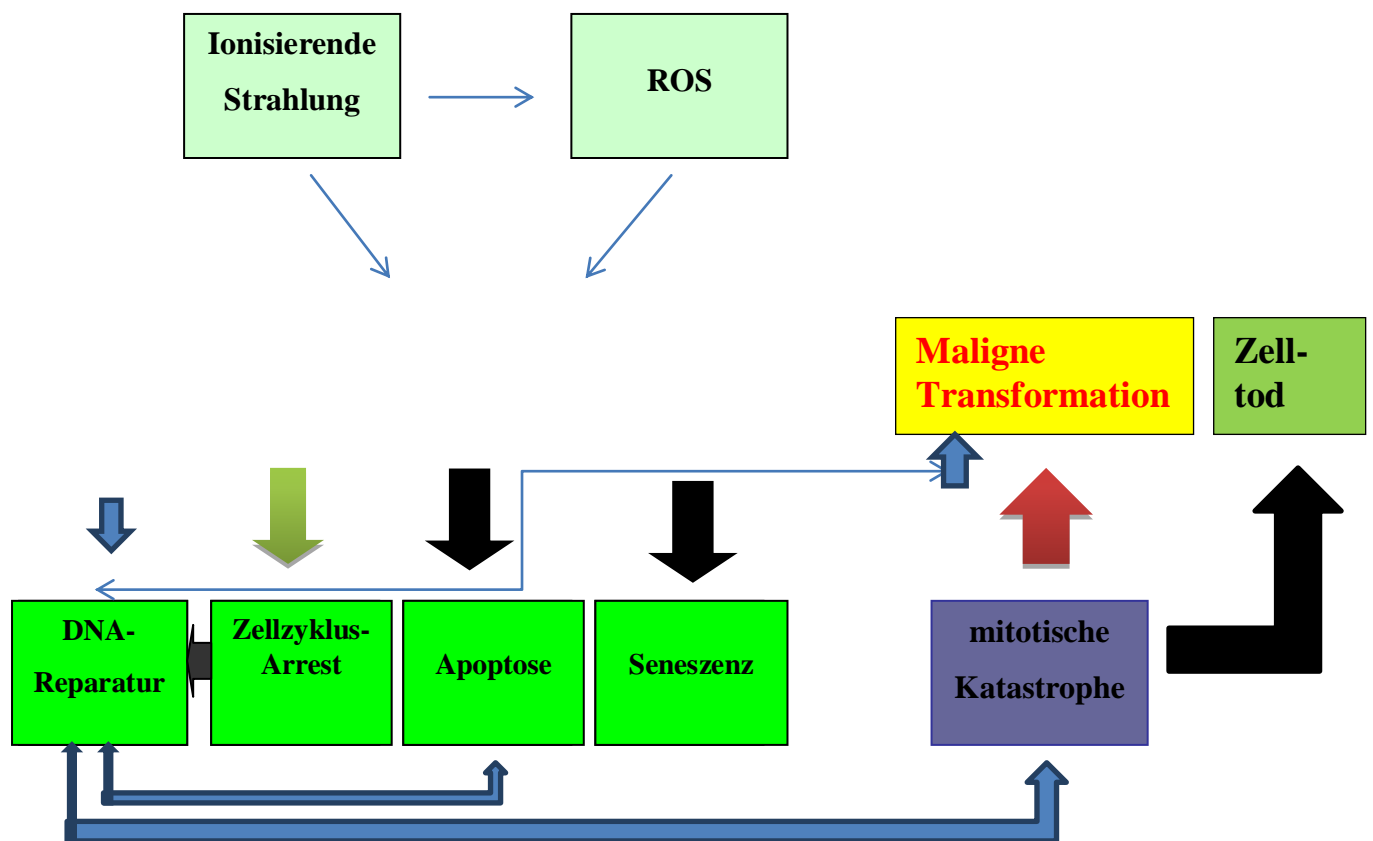


Abbildung 1-3: Ursachen von DNA-Schäden und deren Folgen:

Ionisierende Strahlung und ROS induzieren DNA-Schäden, die unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen können. Eine DNA-Schädigung kann einerseits zu einem Zellzyklusarrest und zur DNA-Reparatur führen, sie kann aber auch direkt zur Apoptose oder Seneszenz der betroffenen Zellen führen. Eine fehlerfreie DNA-Reparatur führt zu einem

Zellüberleben. Das Resultat fehlerhafter DNA-Reparaturen sind Mutationen, sowie strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen.

Chromosomenaberrationen können ihrerseits zum mitotischen Zelltod (zu mitotischer Katastrophe) führen oder zu einer malignen Zelltransformation bzw. Tumorprogression. Nicht-letale Mutationen können ebenfalls zu einer malignen Transformation bzw. Tumorprogression beitragen.

Die mitotische Katastrophe ist ein Mechanismus des Zelltodes, der während oder in Folge einer aberranten Mitose auftritt. Für die aberranten Mitosen ist das Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen oder von mehrkernigen sehr großen, aneuploiden Zellen charakteristisch (Caruso et al. 2011).

Die mitotische Katastrophe führt zu einem Zelltod durch Apoptose oder Nekrose und repräsentiert folglich eine Vorstufe zum eigentlichen Zelltod (Vakifahmetoglu et al. 2008, Al-Ejeh et al. 2010). Des Weiteren kann sie auch zur Seneszenz führen (Al-Ejeh et al. 2010).

Sie tritt vor allem bei soliden Tumoren auf, meist zwei bis sechs Tage nach der Bestrahlung (Ruth und Roninson 2000). Diese im Vergleich zur Apoptose lange Latenzzeit kann als Begründung für die langsame klinische Regression von soliden Tumoren herangezogen werden.

Die mitotische Katastrophe wird durch fehlerreparierte DNA-Schäden ausgelöst und zwar entweder durch strukturelle Chromosomenaberrationen, vor allem durch dizentrische (polyzentrische) Chromosomen, die jeweils zwei (mehrere) Zentromere beinhalten oder durch Aneuploidie (Polyploidie). Das Vorhandensein mehrerer Zentromere in einem Chromosom führt dazu, dass ein solches Chromosom während der Anaphase nicht in Schwesterchromatide geteilt wird und nicht richtig mit dem Spindelapparat assoziiert wird. Es entstehen Anaphase-Brücken und die Zelle kann sich nicht in zwei Tochterzellen teilen. Alternativ kann eine bestrahlte Zelle mehrere S-Phasen ohne eine Zellteilung durchlaufen, bevor sie als eine polyploide Zelle wieder in die Mitose eintritt. Eine gleichzeitige Hyperamplifikation von Zentrosomen führt dann zu multipolaren, mitotischen Spindeln und dies führt ebenfalls zur mitotischen Katastrophe (Eriksson und Stigbrand 2010).

Die vorzeitige, prä-replikative Seneszenz ist eine weitere zelluläre Antwort auf eine DNA-Schädigung. Vorzeitige Seneszenz ist ein Telomer-unabhängiger Prozess. Sie wurde in Fibroblasten und in Epithelzellen beschrieben (Coppé et al. 2008).

Eine Verkürzung der Telomere initiiert in gealterten Zellen die replikative Seneszenz. Diese Art der Seneszenz tritt als Folge vieler Zellteilungen auf (biologische Uhr). Ionisierende Strahlung, die DNA-Schäden direkt oder indirekt via ROS (Reaktive oxidative Spezies) induziert, kann vorzeitige Seneszenz einleiten. Falls die DNA-Schäden irreparabel sind oder die Zelle zu viele Schäden zu reparieren hat, kann sie keine erfolgreiche Reparatur durchführen und muss entweder in die Apoptose oder in den permanenten G1-Arrest, d.h. Seneszenz, eintreten.

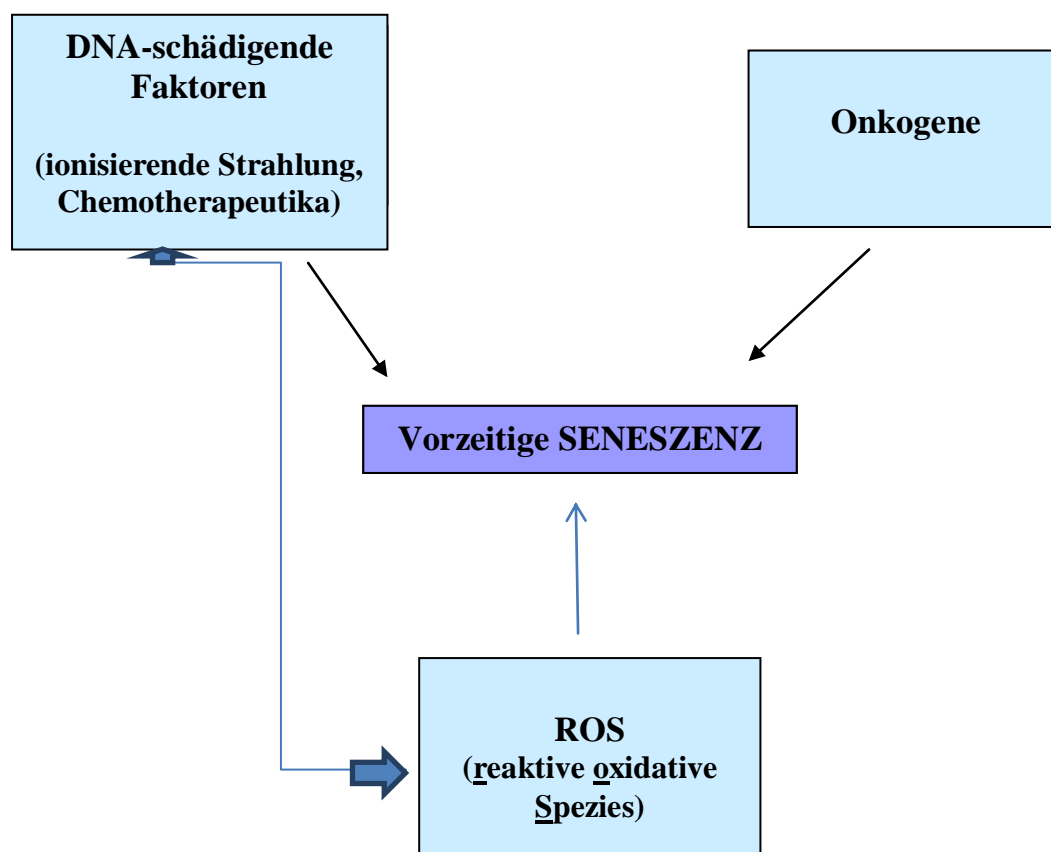


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung einer Reihe von Faktoren, welche zur Einleitung der vorzeitigen Seneszenz führen

(Modifiziert nach Ewald et al. 2010, Vizioli et al. 2011):

Zu den häufigsten Ursachen zählen ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika, aber auch Onkogene und ROS können eine vorzeitige, nicht-replikative Seneszenz induzieren. Dies kann sowohl direkt, über DNA-Schäden als auch indirekt über eine erhöhte ROS-Produktion erfolgen.

Die vorzeitige Seneszenz wird meistens durch irreparable DNA-Schäden induziert (Eriksson und Stigbrand 2010). In der Zelle wird dabei ein permanenter Zellzyklusarrest (in der G1-Phase des Zellzyklus) induziert, welcher das Zellwachstum dauerhaft verhindert. Es wurde beobachtet, dass zur Induktion der Seneszenz in Tumorzellen eine geringere Menge zelltoxischer Medikamente (Chemotherapeutika) appliziert werden musste, als zur Induktion der Apoptose nötig wäre. Da unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen im klinischen Alltag häufig den limitierenden Faktor der onkologischen Therapie darstellen, wäre die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) aufgrund von geringeren unerwünschten Nebenwirkungen eine vielversprechende Therapieoption (Ewald et al. 2010).

Seneszente Zellen sind anhand eines individuellen morphologischen und chemischen Phänotyps erkennbar. Sie stellen sich als abgeflachte, vergrößerte Zellen dar, mit einem prominenten Zellkern und vermehrter zytoplasmatischer Granulierung. Die Zellen bleiben während des Zellzyklusarrests lebensfähig und metabolisch aktiv. Sie können jedoch nicht aus dem G1-Arrest ausbrechen, auch nicht nach mitogener Stimulation. Sie werden im Laufe der Zeit entweder phagozytiert oder sterben durch Autophagie (Ewald et al. 2010).

Seneszente Zellen exprimieren β -Galaktosidase und können daher mit Hilfe dieses Biomarkers sichtbar gemacht werden (Dimri et al. 1995). Die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase der lysosomalen Kompartimente in der perinukleären Region färbt die seneszenten Zellen blau an. Durch diese blaue Anfärbung können seneszente Zellen von nicht seneszenten Zellen unter dem Lichtmikroskop unterschieden und dadurch quantifiziert werden.

Ionisierende Strahlung induziert nur etwa 30-40 % der DNA-Schäden durch direkte Ionisation. Die anderen 60-70 % der DNA-Schäden werden indirekt, durch ROS induziert. Der so entstandene oxidative Stress führt zu Schäden in allen Biomolekülen, in der DNA und RNA, in Lipiden und in Proteinen. Über fehlreparierte oxidative DNA-Schäden können ROS

sekundäre DNA-Doppelstrangbrüche induzieren. Erhöhter oxidativer Stress kann folglich zur Apoptose oder Seneszenz führen.

ROS werden normalerweise während der Zellatmung generiert. Vor allem Superoxidanion-Radikale und Wasserstoffperoxid-Moleküle sind potenziell schädliche Nebenprodukte der Zellatmung (Fang et al. 2007, Raza et al. 2002). Unter physiologischen Bedingungen ist eine Zelle jedoch in der Lage, ein Gleichgewicht zwischen der ROS-Bildung und der Beseitigung über enzymatische Abbauege oder Antioxidanzien aufrecht zu erhalten (Barzilai et al. 2002). Hierzu gehören die Superoxid-Dismutasen (SODs), Katalasen, Glutathion-Peroxidasen, Glutathion u.a. (Fang et al. 2007). Diese antioxidativen Abwehrmechanismen umfassen auch die Aktivierung von Redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren und eine angestiegene Expression von antioxidativen Enzymen (Sedelnikova et al. 2010, Holley et al. 2011).

Das wichtige zelluläre Antioxidans Glutathion (GSH (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glyzin)) ist ein Tripeptid, bestehend aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Glutathion besitzt die Fähigkeit von der monomeren GSH-Form unter Ausbildung einer Disulfidbrücke in die Dimer-Form (GSSH) zu oxidieren. GSH fängt Radikale ab und wird dadurch zu GSSG oxidiert. Durch das Enzym Glutathion-Reduktase wird GSSG wieder in seine reduzierte Form (GSH) umgewandelt (Zhao et al. 2009).

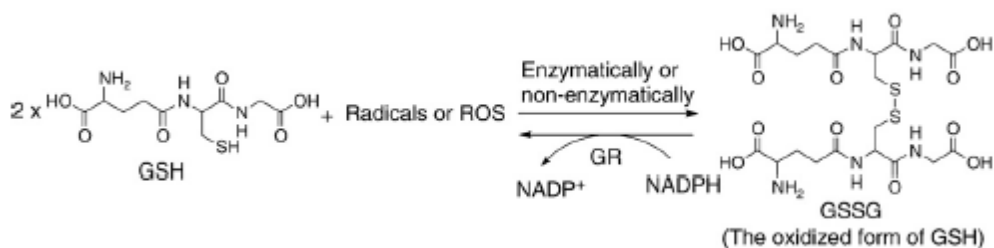


Abbildung 1-5: Oxidation von GSH:

Die Grafik stellt die Oxidation von GSH zu GSSH dar, über einen NADPH-abhängigen Weg (Übernommen aus Zhao et al. 2009, S.177).

Eine GSH-Depletion ist ein typisches Zeichen der Apoptose (Franco und Cidlowski 2009). Hoher intrazellulärer GSH-Gehalt ist hingegen assoziiert mit einer Resistenz gegen Apoptose (Friesen et al. 2004, Cazanave et al. 2007, Ranawat und Bansal 2008). Zhao et al. (2009)

haben gezeigt, dass sich die Strahlensensitivität von Prostatakarzinom-Zellen erhöhte, wenn die Glutathion-Reduktase gehemmt wurde und somit der GSH-Gehalt vermindert wurde.

Superoxid-Dismutasen (SOD), weitere antioxidative Schlüsselenzyme, wandeln Superoxid-Anionen in Sauerstoff und Wasserstoff-Peroxid um und repräsentieren damit essentielle Enzyme zum Eliminieren dieser Radikale (Huang et al. 2000). Eine Überexpression von SOD führt zu einer erhöhten Strahlenresistenz (Sun J et al. 1998, Kalen et al. 2006). SOD-Inhibierung führt hingegen infolge des erhöhten oxidativen Stresses zu einer vermehrten Zelltötung (Huang et al. 2000).

Reicht infolge eines vermehrten oxidativen Stresses die antioxidative Abwehr der jeweiligen Zellen nicht aus, hat dies für die normalen Zellen verschiedene pathologische Folgen, u.a. auch einen verstärkten Zelltod. Diese verstärkte Zelltötung infolge eines hohen oxidativen Stresses ist bei der Tumorthherapie wünschenswert. Die Induktion von zytotoxischem, oxidativem Stress in Krebszellen als Bestandteil einer Tumorthherapie ist deshalb Gegenstand vieler Untersuchungen (Fang et al. 2007, Verrax et al. 2009, Sedelnikova et al. 2010).

Infolge von Mitochondrien-Dysfunktion und infolge erhöhter metabolischer Aktivität ist in Krebszellen der oxidative Stress stets höher als in normalen Zellen (Szatrowski und Nathan 1991, Kumar et al. 2008, Nowsheen et al. 2009, Athar et al. 2011). Eine Bestrahlung mit ionisierender Strahlung führt dosisabhängig zu einem zusätzlichen Anstieg der ROS. Daher bietet sich die Möglichkeit, in Tumorzellen durch eine entsprechende Vorbehandlung mit ROS-generierenden Substanzen einen erhöhten oxidativen Stress zu induzieren und sie somit für die anschließende Bestrahlung zu sensibilisieren (Husbeck et al. 2005, Bhosle et al. 2010, Athar et al. 2011). Dabei spielt die antioxidative Abwehr der jeweiligen Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Aktivitäten verschiedener antioxidativer Enzyme, wie z.B. Katalase, Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase u.a., in Tumorzellen häufig reduziert sind (Sato et al. 1992, Hasegawa et al. 2002, Nishikawa 2008). Dies macht die Tumorzellen sensitiver gegenüber erhöhten ROS-Konzentrationen (Sawa et al. 2000, Fang et al. 2002).

Eine Möglichkeit, den oxidativen Stress in Zellen zu erhöhen, stellt die Vorbehandlung mit Natriumselenit (Na_2SeO_3) dar (Husbeck et al. 2006). Natriumselenit wird in den Zellen unter Beteiligung von GSH und NADPH umgewandelt. Dabei entstehen Superoxid-Anionen.

Um Natriumselenit als therapeutisches Mittel wirkungsvoll nutzen zu können, sollte es seine zelltoxische Wirkung in Tumorzellen erzielen und möglichst keine oder nur wenige Auswirkungen auf das gesunde Gewebe haben. Husbeck et al. (2006) untersuchten die Wirkung einer Natriumselenit-Behandlung auf normale Prostataepithelzellen und maligne Prostatakarzinomzellen, welche jeweils demselben Patienten entnommen wurden. Die Natriumselenit-induzierte Apoptoserate war in den malignen Zellen signifikant höher. Diese Autoren haben ebenfalls den antioxidativen Status von normalen und malignen Zellen untersucht und verglichen. Der GSH-Gehalt war in den gepaarten normalen und malignen Zellen der untersuchten drei Patienten nicht unterschiedlich. Der MnSOD-Gehalt war hingegen in allen drei Patienten in den malignen Zellen niedriger, im Vergleich zu den jeweiligen normalen Zellen. Dieser Befund weist darauf hin, dass eine höhere MnSOD-Expression in normalen Zellen zu der beobachteten erhöhten Resistenz dieser Zellen gegenüber Natriumselenit-induzierter Apoptose beiträgt (Husbeck et al. 2006).

Xiang et al. (2009) haben gezeigt, dass eine Natriumselenit-Zugabe zu erhöhter Produktion von Superoxid-Anionen in hormonsensitiven Prostatakarzinom-Zellen LNCaP führte. Durch Natriumselenit-Zugabe konnte über eine vermehrte Bildung von ROS ein erhöhter oxidativer Stress erzeugt werden, der eine Mitochondrien-abhängige Apoptose in diesen Zellen induzierte (Xiang et al. 2009).

Der Mechanismus der Natriumselenit-induzierten Apoptose ist in Krebszellen sehr komplex und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Natriumselenit entfaltet konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkungen. Täglich 55 μg Selenit werden zur Synthese von Selenit-abhängigen Proteinen benötigt. Dosen zwischen 200-300 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ wirken antioxidativ und antikanzerogen, große Dosen von 3.200-5.000 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ wirken hingegen prooxidativ und können DNA-Schäden verursachen (Brozmanová et al. 2010).

Je nach Selenitverbindung wird die DNA auf unterschiedliche Weise geschädigt. Durch eine Natriumselenit-Behandlung entstehen oxidative DNA-Schäden (DNA-Addukte wie z.B. 8-

oxoG) und DNA-Doppelstrangbrüche (Qi et al. 2010). Infolge einer fehlerhaften Addukt-Reparatur können sekundäre DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, die ihrerseits zur Bildung von strukturellen Chromosomenaberrationen führen können (Donkena et al. 2010). Selenocystein führt vermehrt zu Doppelstrangbrüchen und wiederum andere Selenitverbindungen führen weder zu Einzel- noch zu Doppelstrangbrüchen. Ferner kommt es in Abhängigkeit von der Selenitverbindung zum Zellzyklusarrest in unterschiedlichen Zellzyklusphasen und zwar aufgrund inhibitorischer Effekte auf Zyklin-abhängige Kinasen und Proteinkinasen (Zhu et al. 2002).

Fragestellung

Bestrahlung induziert zytotoxische DNA-Schäden, v.a. in Form von Doppelstrangbrüchen. Können diese nicht von den zelleigenen Reparaturmechanismen behoben werden, löst dies eine intrinsische Signalkaskade aus, an deren Ende die Apoptose steht. Neben der Apoptose können Doppelstrangbrüche ebenfalls zum mitotischen Zelltod oder zu vorzeitiger Seneszenz führen. Um herauszufinden, welcher Mechanismus welchen Anteil am strahleninduzierten Zelltod in primären Prostataepithelzellen (PrEC) und in strahlenresistenten metastasierten Prostatakarzinom-Zellen (PC3 und DU-145) einnimmt, wurden in der vorliegenden Arbeit diese drei Endpunkte der Strahlenwirkung untersucht und miteinander verglichen.

Die Schwerionentherapie soll u.a. bei besonders strahlenresistenten Karzinomen größere Heilungsraten, bei gleichzeitig geringerer Nebenwirkungsrate, erzielen als die konventionelle Strahlentherapie. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen einer Ionenbestrahlung auf PrEC im Vergleich mit PC3 und DU-145 Zellen, in Zusammenarbeit mit dem führenden GSI-Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt untersucht und mit Wirkungen der konventionellen Röntgenbestrahlung (LINAC) verglichen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Folgen ionisierender Strahlung auf gesunde Prostataepithelzellen gelegt, da sich die meisten Untersuchungen bisher nur mit den Wirkungen auf das Tumorgewebe beschäftigten.

Die vorliegende Arbeit befasste sich zusätzlich mit der Frage, inwiefern ein erhöhter oxidativer Stress vermehrt zum Zelltod führt. Dieser oxidative Stress wurde durch die Zugabe von Natriumselenit erzeugt. Der antioxidative Status normaler Zellen und Tumorzellen, wurde dabei anhand von zwei Stellvertretern, Glutathion und Superoxid-Dismutase, miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellen

Alle Versuche wurden mit normalen, humanen Prostata-Epithelzellen, PrEC, durchgeführt. PrECs sind adhärenente Zellen, welche alle von einem gesunden Spender stammen. Sie wurden kommerziell von Lonza (Walkersville, USA) erworben. Die routinemäßige Kennzeichnung der PrECs beinhaltet eine morphologische Betrachtung aller Passagen sowie den Nachweis der positiven Anfärbbarkeit für Zytokeratin. Die empfohlene Aussaat der PrEC-Subkulturen beträgt 2.500 Zellen/cm². Typischerweise benötigen diese Subkulturen 6-9 Tage, um konfluent zu werden. Vom Hersteller wurde im Rahmen einer Qualitätskontrolle ein negativer Befund bezüglich Hepatitis A und B, HIV, Mykoplasmen, Bakterien, Pilzen und Hefen vorgelegt.

Von der Firma Lonza wurde ebenso das erforderliche serumfreie Medium bezogen, welches spezifisch auf die Bedürfnisse der PrEC-Zellen abgestimmt wurde. Dies beinhaltet 500 ml eines Basis-Mediums sowie zusätzliche Wachstumsfaktoren: 2 ml BPE, 0,5 ml Hydrocortison, 0,5 ml hEGF, 0,5 ml Epinephrine, 0,5 ml Transferrin, 0,5 ml Insulin, 0,5 ml Retinsäure, 0,5 ml Trijodthyronin sowie 0,5 ml GA-100. Die Aufbewahrung des Mediums erfolgte bei 4°C.

Zur Kultivierung der Zellen benötigte man eine spezielle Trypsin/EDTA-Lösung (100 ml), eine Trypsin-Neutralisierungslösung (100 ml) und eine HEPES-Puffer-Lösung (100 ml). Bei -20°C halten sich diese drei Lösungen sehr lang. Diese Produkte wurden ebenfalls bei der Firma Lonza gekauft. Für unsere Versuche mussten die PrECs bei 4°C aufgetaut werden. Im aufgetauten 4°C Zustand waren sie nicht länger als einen Monat haltbar.

2.2 Bestrahlung

Die Prostata-Epithelzellen (PrEC) wurden mit unterschiedlichen, zunehmenden Strahlendosen zwischen 0 Gy und 6 Gy bestrahlt. Als Strahlenquelle diente in Göttingen

eine Röntgenröhre der Firma Gulmay Medical LTD (Camberley Surrey, England). Die genaue Bezeichnung lautet X-Strahl RS 225. Die Röhrenspannung betrug 200 kV, die Röhrenstromstärke betrug 15 mA. Die Filterung der Röntgenröhre betrug 0,5 mm Kupfer.

Im GSI-Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt wurden die PrEC-Zellen mit Stickstoff-Ionen bestrahlt. Die Initialenergie der Ionen betrug 130 MeV/u. Die Energie im Target betrug 58 MeV/u bei einem LET von 60 keV/ μm .

2.3 Zellkultivierung

Die zur Zellkultivierung genutzten Medien wurden den Bedürfnissen der PrEC, wie sie im menschlichen Organverbund vorhanden sind, nachgeahmt.

Die gekauften Zellen (ca. 500.000 Zellen) wurden auf Trockeneis tiefgefroren in einem Cryovial geliefert. Die Zellen wurden zunächst in flüssigem Stickstoff bei -210°C gelagert. Daraufhin wurden 5 ml Medium (Lonza Clonetics TNS, Walkersville, USA) in Flaschen der Firma Greiner Bio-One (Tissue culture flasks, 25 cm^2 , 50 ml, red filter cap, sterile 690175) (Frickenhausen, Deutschland) pipettiert und bei 37°C und 5 % CO_2 für eine Stunde im Brutschrank gewärmt. Das Cryovial wurde nach Ablauf dieser Stunde unter ständiger Beobachtung in einem 37°C warmen Wasserbad rasch aufgetaut und äußerlich mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Daraufhin wurden die Zellen im Cryovial vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert.

Da die vom Hersteller empfohlene Aussaatdichte bei PrECs 2.500 Zellen/ cm^2 betrug, wurden jeweils 62.500 Zellen pro vorgewärmte 25- cm^2 -Kulturflasche pipettiert und anschließend sofort im Brutschrank kultiviert. Nach 24h wurde das alte Kulturmedium entfernt und 5 ml frisches Medium hinzugefügt. Alle zwei Tage fand ein Mediumwechsel statt. Lediglich über das Wochenende oder wenn Zellen sehr konfluent wurden, gab man zusätzlich 10 ml Medium pro Flasche hinzu, um eine ausreichende Versorgung der PrECs sicherzustellen.

Für die jeweiligen Versuche wurden viele Millionen Zellen benötigt. Die Zellen wurden deshalb in größeren Mengen angezüchtet, einmal passagiert und nach ca. 9 Tagen, wenn sie einen konfluenten Status erreicht hatten, in Flaschen (Greiner Bio-One, 25 cm^2) behandelt und bestrahlt.

Zur Subkultivierung der Zellen wurden die zur Verwendung gekommenen Lösungen immer auf 37°C erwärmt.

In einem sterilen Umfeld (Flow Bank) wurde daraufhin der Überstand in den Flaschen abgenommen und verworfen. Der Zellrasen wurde mit 5 ml HEPES Buffered Saline Solution (Firma Lonza) gewaschen, um eine bessere Wirksamkeit des Trypsins im nächsten Schritt zu erzielen.

Durch die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden die am Flaschenboden wachsenden Zellen abgelöst. Nach einer 2-6 minütigen Inkubation bei 37°C auf einer Wärmeplatte konnten durch leichtes Anklopfen der Flasche auf der Handinnenfläche mehr als 90 % der Zellen vom Boden abgelöst werden. Im nächsten Schritt wurden 4 ml Trypsin Neutralisierungs-Lösung (Lonza) zum Stoppen der Trypsinwirkung hinzugegeben.

Die PrEC-Zellsuspension wurde daraufhin in 15 ml Polypropylen Zentrifugenröhrchen (120 x 17 mm, Firma Sarstedt in Nümbrecht, Deutschland) überführt und die Flaschen mit 2 ml HEPES Buffered Saline Solution (Lonza) gespült, um eventuell noch zurückgebliebene Zellen aufzunehmen. Bei 800 Umdrehungen pro Minute wurde das Röhrchen 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100-200 ml dekantiert und 2-3 ml frisches Medium (Lonza) hinzugefügt, in welchem die Zellen resuspendiert werden könnten. Die Zellzahl wurde in einem Coulter counter bestimmt, so dass die Zellen auf neue Flaschen verteilt werden konnten. Es wurden unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt. Bei den Seneszenz-Versuchen wurden beispielsweise 60.000 Zellen in Gewebekulturschalen (Greiner Bio-One Cellstar®, 35/10 mm) in 2 ml Medium eingesetzt. Zur Weiterkultivierung hingegen wurden die Zellen mit 2.500 Zellen/cm² pro Flasche eingesetzt.

2.4 Apoptose-Auswertung: Morphologischer Assay

Mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren (morphologischer Assay, Tunel-Assay und Caspase-3/7-Aktivität) wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, wie groß der Anteil an apoptotischen Zellen bei unterschiedlicher Vorbehandlung (mit und ohne Natriumselenit) und bei Bestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen (0 Gy bis 4 Gy) war.

Der Anteil an apoptotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen wurde durch den Apoptose-Index (AI) beschrieben.

Mit Hilfe des morphologischen Assays konnten einzelne normale und apoptotische Zellen identifiziert werden. Dabei wurden die Zellkerne mit einer Farbkombination aus Hoechst 33342 und Acridin-Orange angefärbt und konnten dann unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Diese Farbkombination erlaubte eine bessere Anfärbung der Zellkerne als jede Färbung allein. Anhand der Zellkernmorphologie konnten normale Zellen, frühe apoptotische und späte apoptotische Zellen unterschieden werden. Die Zellkerne wurden mit Blaulicht-Filter ausgewertet. Typisch für normale, vitale Zellen war ein runder, mittiger Zellkern. Zellen, die sich in der frühen Apoptose befanden, hatten hingegen einen halbmondförmigen Kern oder einen sehr kleinen, runden Kern. Dies ist bedingt durch die einsetzende Chromatinkondensation, welche zur Kernpyknose führt (Kerr et al. 1972). Zellen, die sich bereits in der späten Apoptose befanden, hatten einen fragmentierten Zellkern. Es bildeten sich kleine, apoptotische Körperchen, so genannte „apoptotic bodies“.

Die relative Anzahl an apoptotischen Zellen wurde durch den Apoptose-Index, AI, charakterisiert:

$$AI = \frac{\text{Anzahl der apoptotischen Zellen}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen}} \times 100 \text{ [in \%]}$$

Für die mikroskopische Auswertung und die dazugehörige Anfärbung mussten die Zellen speziell fixiert werden. Es musste außerdem berücksichtigt werden, dass apoptotische Zellen sich vom Flaschenboden früher oder später lösten und im überstehenden Medium schwammen. Deshalb wurden sowohl das Medium als auch der Zellrasen aus jeder Flasche verarbeitet und die fixierten Zellen aus beiden Quellen vor der Auswertung zusammengefügt.

Dazu wurden sich im Medium befindende Zellen sowie die als Zellrasen abtrypsinieren Zellen zum gewünschten Zeitpunkt abzentrifugiert und der Überstand der PrEC-Suspension bis auf 2 ml abgenommen. 2 ml Medium wurden hinzugefügt und die PrECs resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde 1 ml einer 5 %igen Formaldehyd-Lösung zu den 4 ml Zellen und Medium dazugegeben, um eine 1 %ige Formaldehyd-Lösung zu erhalten. Anschließend wurden beide Röhrchen nochmals zentrifugiert, die Überstände bis auf 1 ml dekantiert, die

Zellen durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert und die Zellsuspension aus einem Röhrchen in das zugehörige andere Röhrchen überführt, welches ursprünglich aus derselben Kulturflasche stammte.

Die fertige Zellsuspension konnte über mehrere Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Vor der Anfärbung und Auswertung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen in dem Zellsuspensionsröhrchen resuspendiert.

Die Färbung der Zellen mit Hoechst 33342 und Acridin-Orange fand immer unmittelbar vor der Auswertung am Mikroskop statt.

Die frische Färbelösung wurde aus 0,8 µg/ml Hoechst 33342 (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 2 µg/ml Acridin-Orange (Firma Sigma-Aldrich) hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt.

Hoechst 33342 ist ein bis-Benzimid, 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol trihydrochlorid, welches spezifisch AT-reiche Regionen der Doppelstrang-DNA anfärbt. Es wird häufig genutzt, um DNA unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Es strahlt dabei blaues Licht aus. Eine substituierte Ethyl-Gruppe führt dazu, dass Hoechst 33342 hydrophober wird und dadurch leichter Plasmamembran-gängig.

Acridin-Orange (3,6-Bis(dimethylamino)acridin) ist ein Nukleinsäure-selektives, kationisches Färbemittel, welches hilfreich bei der Bestimmung des Zellzyklus ist. Es wird zur Differenzierung von DNA und RNA genutzt.

Eine Kombination aus beiden Farbstoffen verspricht einen besseren Kontrast und erlaubt eine bessere Identifizierung der unterschiedlichen Zellkerne als jede Färbung einzeln.

45 µl der Zellsuspension wurden mit 5 µl dieser Färbelösung vermischt, auf zwei Objektträger aufgetropft (jeweils 25 µl pro Objektträger) und mit Deckgläschen abgedeckt. Lichtgeschützt wird diese Lösung nun in Ölimmersion am Fluoreszenzmikroskop in 600-facher Vergrößerung unter Verwendung eines DAPI-Filters (für blaues Licht) untersucht.

Es wurden in mindestens fünf Proben jeweils 50 Zellen auf mehreren Objektträgern ausgewertet. Dabei wurden normale, frühe apoptotische und späte apoptotische Zellen voneinander unterschieden.

Zusätzlich wurde auch der Apoptose-Index für späte Apoptosen berechnet, um ein Maß für eine möglicherweise veränderte Kinetik der Apoptose nach verschiedenen Behandlungen zu erhalten. Der AI_{late} wurde als Anteil später Apoptosen an der Gesamtanzahl der ausgewerteten Zellen berechnet.

2.5 Apoptose-Auswertung: Caspase-3/7-Aktivierung

Caspasen (Cysteine-dependent aspartate-specific Protease) gehören zur Familie der Proteasen, welche ein Cystein im aktiven Zentrum enthalten und Proteine spezifisch hinter Aspartatresten schneiden. Ihre Aktivierung erfolgt auf ein proapoptotisches Signal hin und führt zur Zerstörung zahlreicher zellulärer Proteine, welche für ein Überleben der Zelle unabdingbar sind.

Caspasen liegen im Zytoplasma jeder Zelle konsekutiv als inaktive Vorstufen, sogenannte Procaspasen vor. Sie bestehen aus drei Untereinheiten: der N-terminalen Prodomäne (ca. 23-216 Aminosäuren), einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) und einer großen Untereinheit (ca. 20 kDa) (Bredesen 2000). Sie können im Verlauf der Apoptose kaskadenartig durch proteolytische Schnitte aktiviert werden. Dabei wird die N-terminale Prodomäne abgespalten und anschließend jeweils zwei kleine Untereinheiten und zwei große Untereinheiten zu einem stabilen Tetramer zusammengelagert. Dieses Heterotetramer bildet die aktivierte Caspase (Eldadah und Faden 2000).

Die Firma Promega (Californien, USA) bietet zur Messung der Caspase-3-Aktivität und der Caspase-7-Aktivität ein Nachweisverfahren an (Caspase-Glo[®]-3/7-Assay). Bei vorhandener Caspase-3/7-Aktivität entsteht im Probenmaterial eine messbare Lichtemission (Lumineszenz), die proportional zur Caspase-3/7-Aktivität ist.

Der Assay beinhaltet ein luminogenes Substrat mit der Tetrapeptid Sequenz DEVD (bis-NCBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparic acid amide). Dieses Tetrapeptid liegt als profluoreszierendes Substrat vor und wird selektiv von der Caspase 3 als auch von der Caspase 7 erkannt und abgespalten. Dadurch entsteht ein Substrat, welches durch das im Kit enthaltene Enzym Luciferase (amino- luciferin) unter Lumineszenz gespalten wird.

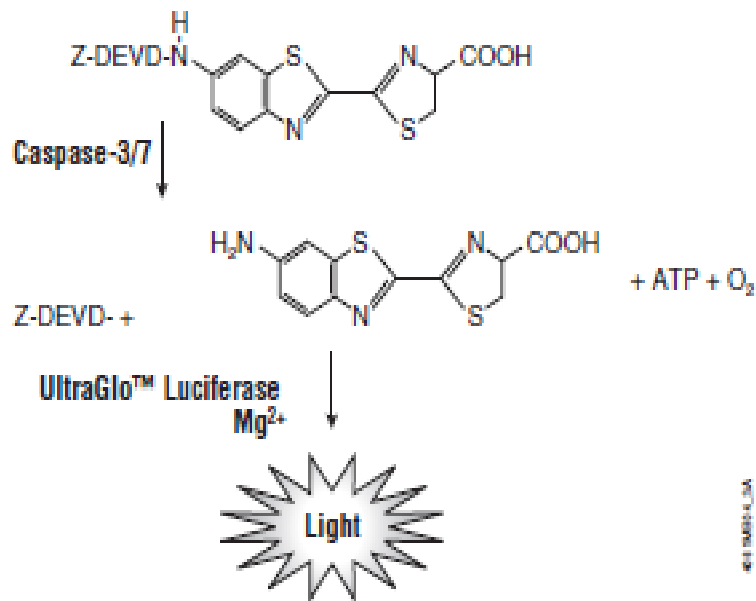


Abbildung 2-1: Lumineszenzreaktion:

Spaltung von DEVD durch die Caspasen 3/7 mit nachfolgender, messbarer Lumineszenzreaktion (Caspase-Glo®-3/7-Assay, Technical Bulletin, Promega Corporation).

Nach Anleitung des Herstellers bestand der erste Schritt des Assays aus der Vermengung des Caspase-Glo-3/7-Puffers mit dem Caspase-3/7-Substrat. Dies fand lichtgeschützt bei Raumtemperatur statt. Dabei entstand das Caspase-Glo-3/7-Reagenz.

Analog der Herstellerempfehlung wurden 96-Well-Platten mit einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Well verwendet. Es wurden drei Arten von Proben vorbereitet: Die Erste war die Nullkontrolle ohne Zellen, welche nur aus Zellkulturmedium und Caspase-Reagenz bestand. Dadurch wurde die Lumineszenz im Hintergrund gemessen. Der Wert der Nullkontrolle wurde später von den experimentell ermittelten Werten abgezogen. Die nächste Probe war eine Negativkontrolle, bestehend aus unbehandelten Zellen im Medium und Caspase-Reagenz. Sie wurde zur Messung der basalen Caspase-Aktivität des Zellkultursystems ermittelt. Weitere Proben bestanden aus vorbehandelten Zellen im Medium und dem Caspase-Reagenz. Das Reagenz wurde im Verhältnis 1:1 mit den Proben vermengt. Es wurden von den drei Proben abwechselnd 100 µl in ein Well pipettiert. Dazu kamen 100 µl

Reagenz in jedes Well. Das Gesamtvolumen in jedem Well betrug nun 200 μ l. Um eine Kontamination des sensiblen Assays zu verhindern, wurde die Platte abgedeckt und bei ca. 400 Umdrehungen pro Minute vorsichtig geschüttelt.

Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, fand die Lumineszenz-Messung nach dreistündiger Inkubationszeit mit dem Reagenz statt. Die Zellzahl in einem Well wurde im Vorhinein mit 10.000 Zellen pro 100 μ l Medium in einer 96-Well-Platte eingestellt.

Die Lumineszenz wurde mit einem Messgerät der Firma Tecan Genios (Männedorf, Schweiz) gemessen. Nach einer Stunde war das maximale Lumineszenz-Signal erreicht. Anhand der Höhe des Lumineszenz-Signals konnte man proportional auf die Caspase-3/7-Aktivität schließen.

2.6 Apoptose-Auswertung: Tunel-Assay

Während der Apoptose kommt es zu charakteristischer DNA-Fragmentierung infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen, die in apoptotischen Zellen durch zelleigene DNA-Endonukleasen induziert werden.

Mit dem Tunel-Assay (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) können diese DNA-Bruchstücke markiert werden.

Hierbei hängt das Enzym TdT mit Fluoreszeिन markierte dNTP-Nukleotide an die entstehenden 3'OH Enden, welche fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können.

Beim Tunel-Assay wurden eine positive sowie eine negative Kontrolle mitgeführt, um die Effizienz der Färbung zu kontrollieren. In der Positivkontrolle sollten späte Apoptosen vorhanden sein. Diese markieren sich als grün gefärbte Zellen. In der Negativkontrolle sollten keine späten Apoptosen nachgewiesen werden können, da sonst auf Fehler in der Versuchsdurchführung geschlossen werden konnte.

Die Zellzahl der Versuchsansätze betrug maximal 2×10^7 /ml pro Kulturflasche.

Die Zellen wurden in einer 12 %igen Paraformaldehydlösung fixiert und konnten bei 4°C lange aufbewahrt werden, bis sie weiter verarbeitet wurden.

Die fixierten Zellsuspensionen wurden 10 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das übrig gebliebene Pellet wurde mit ca. 2 ml PBS (Firma Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen und mit 1 ml Permeabilisierungslösung für 2 min im Kühlschrank inkubiert. Die Permeabilisierungslösung bestand aus 0,1 %igem Triton x 100 (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,1 %iger Natriumcitrat-Lösung (Firma Merck).

Die Zellen wurden anschließend erneut mit ca. 2 ml PBS gewaschen.

Für die positive Kontrolle wurden 100 µl 50 mM Tris H-Cl (Firma Sigma) mit 1 mg/ml BSA (Firma Animed, Dobl, Österreich) und 1 µl DNase 2000 U/µl (Firma USB) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen.

Alle Ansätze wurden mit 5 µl Enzym Solution und 45 µl Markierungs-Solution (in situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Firma Roche, San Francisco, USA) versetzt.

Die negative Kontrolle wurde lediglich mit 50 µl der Markierungs- Solution versetzt.

Alle Proben wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit 2-3 ml PBS gewaschen, bei 1200 Umdrehungen pro Minute 10 min zentrifugiert, dann wurde der Überstand bis auf 250 µl abgenommen und das Zellpellet darin resuspendiert.

Die gefärbten Zellen wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor der Auswertung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Vectashield (Firma Vector Laboratories, Burlingame, Kanada) versetzt. Dies diente dem Schutz der Zellen vor dem Ausbleichen während der Analyse unter dem Mikroskop.

Die Zellsuspension wurde auf zwei Objektträger aufgetropft und am Fluoreszenzmikroskop (Firma Zeiss, Jena, Deutschland), bei 600-facher Vergrößerung unter Verwendung eines FITC Filters, mit grünem Licht, ausgewertet.

Eine Tunel-positive grüne Zelle unter dem Mikroskop wurde als späte Apoptose gewertet, alle anderen Zellen stellten sich grau dar. Man errechnete daraufhin den AI_{late} , also den prozentualen Anteil an späten Apoptosen an der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen, über folgende Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der späten Apoptosen}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen}} \times 100 = AI_{late} \quad [\text{in } \%]$$

2.7 Seneszenz-Auswertung: β -Galaktosidase-Assay

Die Seneszenz beschreibt einen Zustand von Zellen, in welchem sie lebensfähig bleiben, aus der Proliferation ausscheiden und sich in einem permanenten G1-Arrest befinden. Infolge dessen zeigen sie unterschiedliche Genexpressionsmuster. Ein morphologisches Merkmal ist ihre angestiegene Zellgröße (Ewald et al. 2010). Eine messbare β -Galaktosidase-Aktivität ist typisch für seneszente Zellen (Dimri et al. 1995). Anhand einer geeigneten Färbung kann der Anteil an seneszenten Zellen quantifiziert werden.

Der β -Galaktosidase-Assay ist eine effiziente Methode, um den Prozentsatz der lacZ-Expression in Zellen zu bestimmen. Das Gen lacZ kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum wasserunlöslichen, blauen Indigofarbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert (Kück 2005).

Dieser Farbumschlag verursacht eine Blaufärbung der seneszenten Zellen (welche ja über β -Galaktosidase-Aktivität verfügen) und war daher durch lichtmikroskopische Beobachtung quantifizierbar.

Folgende Formel diente der Berechnung:

$$\frac{\text{Gesamtanzahl der blauen Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} \times 100 = \text{relativer Anteil an seneszenten Zellen} \\ (\text{Seneszenz-Index in \%})$$

Der β -Galaktosidase-Assay wurde mit dem β -Galaktosidase Staining Kit nach Anleitung des Herstellers Cell Signaling Technology durchgeführt.

Der verwendete Kit erfasste die β -Galaktosidase-Aktivität bei einem pH-Wert von 6. Zuerst wurde das Wachstumsmedium von den Zellen entfernt, die dann mit 2 ml PBS gewaschen wurden. Mit Hilfe einer Lösung aus 20 %igem Formaldehyd, 2 %igem Glutaraldehyd und PBS wurden die Zellen für 10-15 min bei Raumtemperatur fixiert.

Während dieser Zeit konnte die Färbelösung vorbereitet werden. Zu 930 μ l Färbelösung wurden 20 μ l einer 500 mM Kalium-Ferrocyanid Lösung gegeben. 20 mg X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) Pulver wurden in 1 ml DMF (N,N-dimethylformamide) gelöst. Von diesem Gemisch fügte man 50 μ l zu der Färbelösung hinzu. Daraufhin wurde das Well zwei Mal mit PBS gewaschen und 1 ml der Färbelösung zu den Zellen gemischt.

Nach der Inkubation bei 37°C über die Nacht konnte am Folgetag die lichtmikroskopische Untersuchung bei 200-facher Vergrößerung stattfinden.

Wenn eine lichtmikroskopische Auswertung erst an den Folgetagen möglich war, konnte nach der Entfernung der Färbelösung eine Überschichtung mit 70 %igem Glycerol erfolgen. Die Aufbewahrung der Zellen musste dann bei 4°C erfolgen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Assays fand die Auswertung im Dunkeln statt.

Unter dem Lichtmikroskop der Firma Zeiss konnten ungefärbte (normale) und blau gefärbte (senescente) Zellen unterschieden werden. Es wurden mindestens 5-7 Gesichtsfelder untersucht und mit der oben aufgeführten Formel berechnet, wie hoch der Prozentsatz der seneszenten Zellen war. Definitionsgemäß war auch eine leichte Blaufärbung als Seneszenzmarker zu werten.

2.8 Zellstatus bezüglich der zelleigenen antioxidativen Abwehr:

Glutathion-Assay und Gesamt-SOD-Assay

2.8.1. Glutathion-Assay

Der in unseren Versuchen verwendete Glutathion-Assay wurde von der Firma Cayman Chemical (Catalog No. 703002) (Michigan, USA) bezogen.

Er diente der Quantifizierung des gesamten GSHs, also sowohl in der reduzierten als auch in der oxidierten Form in den PRECs.

Zur Verdeutlichung des chemischen Vorgangs soll das unten aufgeführte Schema dienen.

Im ersten Schritt reagierte GSH mit DTNB (5,5'-dithio-bis-2-(nitrobenzoic acid)). Dabei entstand das gelbfarbige TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid). In einer Begleitreaktion wurde das Disulfid zwischen GSH und TNB gebildet, welches als GSTNB bezeichnet wurde.

GSTNB wurde im nächsten Schritt durch die Glutathion-Reduktase zu TNB und GSH reduziert.

Damit war der Anteil des TNBs direkt proportional zu der Konzentration an GSH.

Maß man nun die Absorption des TNB bei einer Wellenlänge von 405-414 nm, erhielt man eine genaue Angabe über die Menge des GSH.

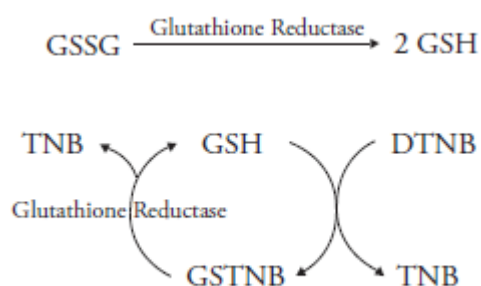


Abbildung 2-2: Recycling von GSH:

Verwertungskreislauf von GSH zur Konzentrationsbestimmung.

(Glutathion Assay Kid, Catalog No. 703002, Cayman Chemical Company).

Der Assay wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Zuerst musste der GSH-MES Puffer vorbereitet werden. Dafür wurden 60 ml Puffer mit 60 ml Aqua Milipore verdünnt. Im nächsten Schritt fand die Verarbeitung der Zellen statt. Die Zellen wurden abgeschabt und bei 4°C 10 min bei 1.000-2.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Das Pellet wurde anschließend in 1-2 ml kalter Pufferlösung homogenisiert und wieder für 15 min bei 4°C mit 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand konnte daraufhin abgenommen und auf Eis aufbewahrt werden.

Die Deproteinierung begann mit der Auflösung von 5 g MPA (Metaphosphorsäure (Firma Sigma Aldrich 239275)) in 50 ml Wasser. Danach wurde 1 ml MPA Lösung mit 1 ml Überstand durch Schütteln vermischt. Nachdem das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, erfolgte die Zentrifugation bei 2.000 Umdrehungen pro Minute 3-4 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen.

Als nächstes wurde die 4 M TEAM (Firma Sigma Aldrich, Katalog No. T58300) Lösung vorbereitet. Dafür mischte man 531 µl TEAM mit 469 µl Wasser.

Bevor man mit den Messungen begann, mussten noch 50 µl TEAM zu 1 ml des Überstandes hinzugefügt werden und sofort durch Schütteln vermischt werden.

Jede notwendige Verdünnung konnte dann mit dem MES Puffer gemacht werden.

Die Quantifizierung von GSSG konnte durch 2-Vinylpyridin erreicht werden. Dazu wurde eine 1 M Lösung zu folgenden Anteilen angesetzt: 108 µl Vinylpyridin und 892 µl Ethanol. Diese Lösung wird im Folgenden als VPD-Lösung bezeichnet.

Von dieser VPD-Lösung wurden 10 µl entnommen und mit 1 ml der Probe durch Schütteln vermischt und bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert.

Die Well-Platten mussten anschließend nach dem Schema des Protokolls so vorbereitet werden, dass das Gesamtvolumen in jedem Well 200 µl betrug.

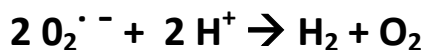
Die Messungen wurden acht Mal hintereinander durchgeführt, in zeitlichen Abständen von 5 min.

2.8.2. Gesamt-SOD-Assay

Mit einem Assay der Firma Cayman Chemical wurde die Gesamt-Superoxid-Dismutase (SOD) in den PrECs bestimmt.

Die Gruppe der Superoxid-Dismutasen, welche Superoxid-Anionen, eine sehr reaktive Sauerstoffspezies, zu Wasserstoffperoxyd umwandelt, gehört zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen. Findet diese Umwandlung nicht statt, können die Superoxid-Anionen Proteine und das Genom schädigen.

Die oxidierte Form des Enzyms reagiert mit einem Superoxid-Anion, wobei Sauerstoff und die reduzierte Form des Enzyms entstehen. Diese Form reagiert weiter mit einem zweiten Superoxid-Anionen und zwei Protonen. Hierbei entsteht Wasserstoffperoxyd und die oxidierte Form des Enzyms.



Vor dem Beginn des Assays mussten mehrere Lösungen vorbereitet werden. In Lösung 1 wurden 3 ml SOD-Assay Puffer mit 27 ml Aqua bidest verdünnt. Mit diesem Puffer konnte später der Radikal-Detektor (Tetrazoliumsalz) verdünnt werden.

Die zweite Lösung bestand aus 2 ml Sample Puffer Konzentrat und 18 ml Aqua bidest. Dieser Sample Puffer wurde verwendet, um SOD-Standards vorzubereiten und um SOD-Proben vor der Messung zu verdünnen.

19,95 ml der Lösung 1 wurden im nächsten Schritt mit 50 µl Radikal-Detektor vermengt und mit einer dünnen Folie abgedeckt. Dieses Gemisch war zwei Stunden stabil.

Die SOD-Assay Xanthine Oxidase wurde aufgetaut und 50 µl davon mit 1,95 ml der Lösung 2 vermischt.

Auch der SOD-Standard (Cu/Zn) wurde aufgetaut und auf Eis aufbewahrt. Daraufhin wurde die SOD-Stocklösung hergestellt. Sie bestand aus 20 µl SOD Standard und 1,98 ml des verdünnten Sample Puffers (Lösung 2).

Gemäß der vom Hersteller vorgegebenen Tabelle wurden nun unterschiedliche Mengen der SOD-Stocklösung und Lösung 2 in sieben vorbereitete Glasröhrchen gefüllt.

Dieser Assay wurde bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

Die Wells wurden mit 200 µl verdünnter Radikal-Detektor (Lösung 1) und 10 µl der SOD Standardröhrchen vermengt. In die Proben-Wells wurden ebenfalls 200 µl Lösung 1 hinzugefügt, aber anstelle einer SOD-Lösung wurden 10 µl der Probe hinzugefügt.

Durch die rasche Zugabe von 20 µl verdünnter Xanthine Oxidase in alle Wells wurde die Reaktion initiiert. Die genaue Uhrzeit der Zugabe musste notiert werden.

Das Endvolumen in jedem Well betrug 230 µl.

Unter ständigem Schütteln wurde die Platte 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption der Lösungen konnte mit dem Plattenleser bei einer Wellenlänge von 440-460 nm detektiert werden.

2.9 Koloniebildungsassay

Mit dem Koloniebildungsassay wurde die klonogene Aktivität der behandelten und bestrahlten PrEC-Zellen bestimmt. Für die Kolonien wurde aus der Suspension einer Flasche (Firma Greiner Bio- One, Frickenhausen, Deutschland, 25 cm²) ihre Gesamtzahl mittels Coulter Counter bestimmt und daraus das Volumen in ml berechnet, das der jeweils benötigten Zellzahl pro Flasche entsprochen hatte.

Abhängig von der Bestrahlungsart und -dosis sowie von der Natriumselenit-Behandlung wurde eine unterschiedliche Zellanzahl pro 25 cm² Flasche benötigt. Diese wurde in Vorversuchen ermittelt (siehe folgende Tabelle).

In Vorversuchen wurde ebenfalls eine optimale Natriumselenit-Konzentration ermittelt. Eine Natriumselenitkonzentration von 7,5 µm bewirkte in den PC3-Prostatakarzinom-Zellen die größte Strahlensensibilisierung. Diese Konzentration wurde dann auch für die Versuche mit PrEC-Zellen verwendet.

Dosis (Gy)	Anzahl der Zellen/Flasche
0	500, 1.000
1	1.000, 2.000
2	2.000, 3.000
3	3.000, 5.000
4	5.000,10.000,15.000

Tabelle 2-1: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay, ohne Natriumselenit-Vorbehandlung nach **Röntgenbestrahlung**.

Dosis (Gy)	Anzahl der Zellen/Flasche
0	500, 1.000
1	2.000, 4.000, 8.000
2	3.000, 5.000, 10.000
3	5.000, 10.000, 15.000
4	10.000, 20.000, 30.000

Tabelle 2-2: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay, ohne Natriumselenit-Vorbehandlung nach **N-Ionen-Bestrahlung**.

6h: 7,5 µM Na-Selenit mit Dosis (6Gy)	Anzahl der Zellen/Flasche
0	500, 1.000
1	1.000, 1.500, 3.000
2	5.000, 10.000, 15.000
3	10.000, 15.000
4	10.000, 20.000, 50.000, 100.000

Tabelle 2-3: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay nach 6-stündiger Natriumselenit-Vorbehandlung nach **Röntgenbestrahlung**.

6h: 7,5 μ M Na-Selenit mit Dosis (6Gy)	Anzahl der Zellen/Flasche
0	5.000, 10.000
2	10.000, 20.000, 30.000

Tabelle 2-4: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay nach 6-stündiger Natriumselenit-Vorbehandlung nach **N-Ionen-Bestrahlung**.

Die ermittelte Zellzahl wurde daraufhin in neue Flaschen (Firma Greiner Bio-One, 25 cm²) pipettiert, worin sich bereits 5 ml Medium befanden.

Die Kolonien wurden 9 Tage ohne Mediumwechsel bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und mittels Absaugen des Kulturmediums und vorsichtigem Waschen der Zellen mit 5 ml PBS-CMF wurde das Kolonienwachstum gestoppt. Nachdem die Zellen 1-2 Tage im Trockenschrank getrocknet wurden, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 70 %igem Ethanol für 30 min. Nach eintägigem Trocknen der Flaschen wurden die Zellkolonien mit Kristallviolett gefärbt.

Kristallviolett (C.I. 42555) ist ein violetter Triphenylmethan, der von der Firma Baacklab (Schwerin, Deutschland) bezogen wurde. Zunächst wurde die Färbelösung angesetzt. Hierfür wurden 0,1 ml Stocklösung (Konzentration 1g/ml), 40 ml abs. Alkohol und 160 ml Aqua bidest miteinander vermengt. Die hergestellte Färbelösung hat eine Endkonzentration von 1,23 mM.

5 ml dieser Lösung wurden vorsichtig zu jeder Flasche hinzugegeben und bei Zimmertemperatur der Kolonien 20-30 min gefärbt. Nach Ablauf der Färbezeit wird die Färbelösung abgenommen und die Kolonien 3x mit Leitungswasser gewaschen. Die Flaschen wurden über Nacht im Trockenschrank getrocknet, bis sie am nächsten Tag ausgewertet werden konnten.

Die Auswertung der Kolonien erfolgte mikroskopisch (Auflichtmikroskop, Firma Zeiss). Zellformationen, die mehr als 50 Zellen beinhalteten, wurden als eine Kolonie definiert.

Jede Versuchsreihe wurde mehrfach durchgeführt und auch innerhalb einer Versuchsreihe wurden mindestens drei Versuchsansätze mit unterschiedlichen Zellzahlen durchgeführt. Der Grund dafür war, dass man das genaue Überleben der unterschiedlich behandelten und

bestrahlten Zellen vor dem Versuch nicht kannte. Aus den wiederholten Messungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Die relative Überlebensrate der behandelten und bestrahlten Zellen S/S_0 wurde aus der Kolonienzahl pro Gesamtzellzahl in den unbehandelten Flaschen (plating efficiency, S_0) und aus der Kolonienzahl pro Gesamtzellzahl der behandelten Flaschen berechnet (S).

3. Ergebnisse

3.1 Morphologischer Assay: Strahleninduzierte Apoptose in PrEC mit und ohne Natriumselenit-Vorbehandlung

Mit Hilfe des morphologischen Assays können typische morphologische Veränderungen bei apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Hierfür werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche die eindeutige Erkennung von apoptotischen Zellen ermöglichen und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden können. Die untersuchten PrEC wurden unterschiedlich vorbehandelt (6h Vorbehandlung mit und ohne 7,5 μ M Natriumselenit) und mit Röntgenstrahlen ansteigender Dosen (0 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy) bestrahlt. Der relative Anteil an apoptotischen Zellen (Apoptose-Index (AI)) wurde nach unterschiedlicher post-radiatio Kultivierungszeit (24h, 48h, 72h) bestimmt. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte innerhalb dieser Versuchsreihe über die Varianzanalyse one-way ANOVA und Post-ANOVA, Tukey HSD Test.

Zunächst wurde der Apoptose-Index in unbehandelten PrEC (0 Gy, ohne Natriumselenit) untersucht. Der relative Anteil der strahleninduzierten Apoptose lag in der Kontrolle nach 24h Kultivierung bereits bei (25,2 \pm 5,2) %. Mit zunehmender Kultivierungszeit stieg der AI weiter an. Nach 48h wurde in der Kontrolle ein AI von (26,9 \pm 9,0) % ermittelt und nach 72h befanden sich bereits (37,9 \pm 8,7) % der Zellen in der Apoptose.

Wie aus der Abbildung 3-1 ersichtlich, hat eine alleinige Röntgenbestrahlung mit Dosen bis 4 Gy keinen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) des AI zum Zeitpunkt 24h bis 72h nach Bestrahlung induziert. Die höchste Apoptoserate wurde zum Zeitpunkt 72h sowohl in unbestrahlten als auch bestrahlten Zellen beobachtet. Der Apoptose-Index erreichte ungefähr 40 %. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Kulturen beobachtet ($p < 0,05$). Die PrEC-Zellen erwiesen sich in Bezug auf strahleninduzierte Apoptose als relativ resistent. Die hohe spontane Apoptoserate kann als Folge der nicht optimalen Kulturbedingungen der primären Prostataepithelzellen verstanden werden.

Der Einfluss einer Natriumselenit-Vorbehandlung auf die Induktion der Apoptose wurde bei einer Konzentration von 7,5 μ M untersucht. Diese Konzentration resultierte aus einer

maximalen Zelltötungsrate im Koloniebildungsassay. Höhere Konzentrationen waren so toxisch, dass keine Kolonien gebildet wurden. Deshalb wurde diese Konzentration auch für die Apoptose-Induktion gewählt.

Aus Abbildung 3-1 kann entnommen werden, dass eine alleinige Vorbehandlung mit Natriumselenit zum Zeitpunkt 24h bis 72h nach der Vorbehandlung keine zusätzliche Apoptose in PrEC-Zellen induzierte ($p < 0,05$). Nach 72-stündiger Kultivierung scheint die Natriumselenit-Vorbehandlung zu einem leicht verminderten AI zu führen, da sich der AI von $(37,9 \pm 8,7) \%$ bei 0 Gy ohne Natriumselenit auf $(26,8 \pm 3,3) \%$ (bei 0 Gy + $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit) signifikant ($p < 0,05$) erniedrigte.

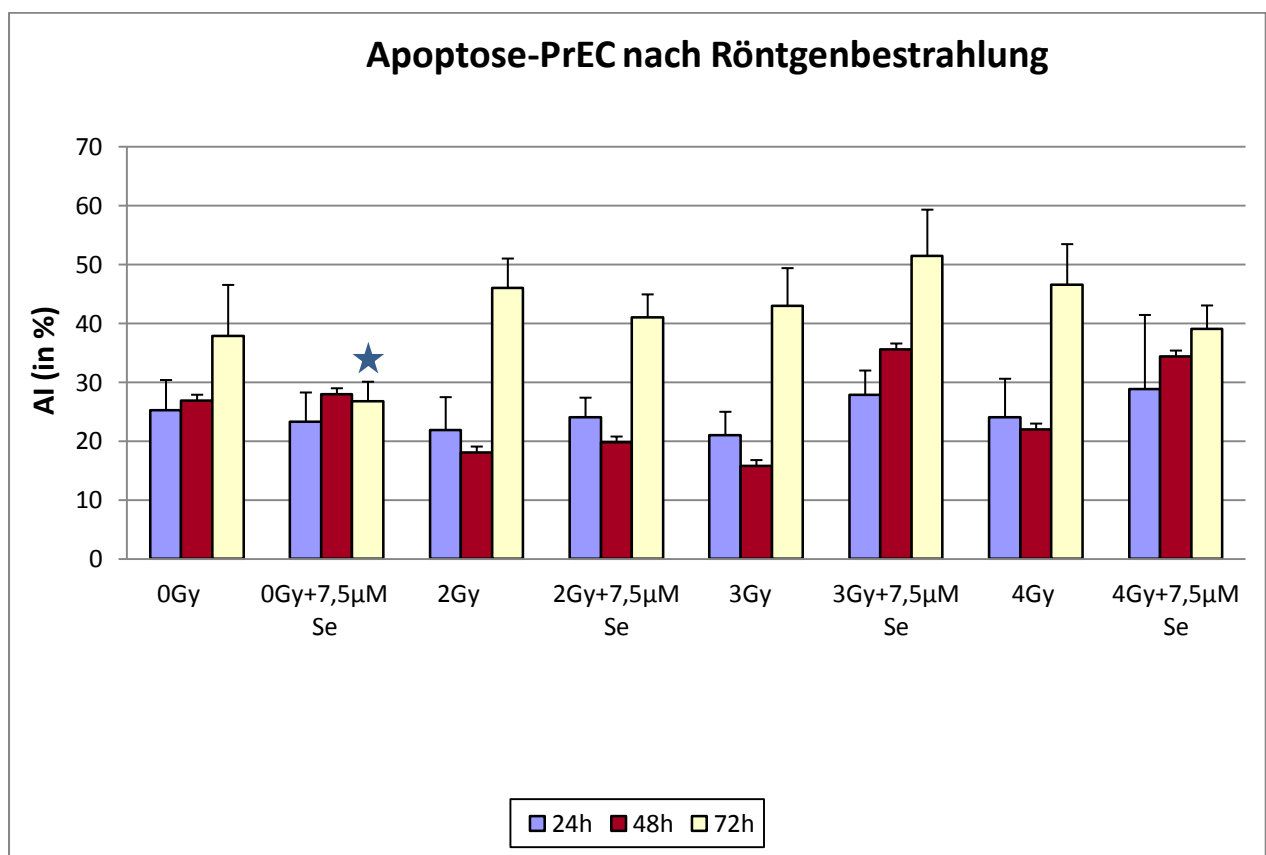


Abbildung 3-1: Apoptose-Index in PrEC nach Röntgenbestrahlung:

Apoptose-Index (AI) in PrEC nach Röntgenbestrahlung mit Dosen von 0 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy, ohne und mit einer 6h-Vorbehandlung mit $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit. Der Anteil an apoptotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen (Apoptose-Index (AI)) in % ist für verschiedene Dosen

mit und ohne Natriumselenit-Vorbehandlung für unterschiedliche Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h) dargestellt.

Die Zellkerne wurden mit einer Farbkombination aus Hoechst 33342 und Acridin-Orange angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen. Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich von unbehandelten Zellen: ★

Abbildung 3-1 veranschaulicht die Auswirkungen einer Kombination aus Vorbehandlung mit $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit und Bestrahlung (bis 4 Gy). Diese Kombination induziert nach 24h keine signifikant erhöhten Apoptoseraten ($p < 0,05$) in PrEC.

Die maximalen AI-Werte, die nach 72h erreicht worden sind, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$).

Apoptose-Induktion durch eine Kombination aus Natriumselenit-Vorbehandlung und Bestrahlung mit schweren Ionen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Dies war aufgrund technischer Probleme in der GSI-Anlage (in Darmstadt) nicht möglich.

Mit dem morphologischen Assay ist anhand der Struktur des Zellkerns zusätzlich eine Differenzierung zwischen frühen und späten Apoptosen möglich. Klassisch für Zellen, die sich in der späten Apoptose befinden, ist ein fragmentierter Zellkern mit typischen apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“) (Kerr et al. 1994).

Der Apoptose-Index für späte Apoptosen (AI_{late}) wurde zusätzlich berechnet, um ein Maß für eine möglicherweise veränderte Kinetik der Apoptose nach unterschiedlicher Kultivierungszeit und nach verschiedenen Behandlungen (Bestrahlung \pm Natriumselenit-Vorbehandlung) zu erhalten.

Der Anteil an späten Apoptosen lag in der Kontrolle nach 24h bei ($3,8 \pm 2,9$) % und verblieb nach einer $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit-Vorbehandlung und einer Bestrahlung mit 4 Gy bei ($2,7 \pm 2,2$) %. Auch nach 48h und 72h Kultivierungszeit ließen sich bis zu einer Strahlendosis von 4 Gy \pm $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit keine signifikanten Anstiege des AI_{late} ermitteln ($p < 0,01$). Der Anteil des AI_{late} schwankte zwischen 3-10 % bei einer Kultivierungszeit zwischen 24h bis 72h und einer Strahlendosis von 0 Gy bis 4 Gy \pm $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit.

Folglich war nach 72h und einer maximalen Strahlendosis von 4 Gy noch kein signifikanter Anstieg des AI_{late} festzustellen. Es dauert offensichtlich länger als 72h, bis die DNA-Fragmentierung eingeleitet wird.

Diese Annahme wurde durch weiterführende Experimente bekräftigt, wo nach einer Kultivierungszeit von 96h der Anteil an späten Apoptosen signifikant anstieg ($p < 0,01$). Der AI_{late} lag bei 0 Gy, ohne Natriumselenit nach 96h bei $(19,3 \pm 0,6) \%$. In der Kontrolle lag der AI_{late} nach 24h bei lediglich $(3,8 \pm 2,9) \%$. Der signifikante Anstieg der späten Apoptosen nach 96h ließ sich auch nach einer Röntgenbestrahlung bis $4 \text{ Gy} \pm 7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit wiederfinden ($p < 0,05$). (Daten sind in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt).

3.2 Caspase-3-Aktivität in unterschiedlich behandelten PrEC-Zellen

Die Caspase 3 ist ein Schlüsselenzym der Apoptose und ist für die partielle oder totale proteolytische Spaltung von Enzymen verantwortlich (ausführende „executor“ Caspase). Aus diesem Grund ist ihre Aktivität ein wichtiger Marker für die Apoptose in normalen Zellen und in Tumorzellen, sofern sie über Caspase 3 verfügen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich eine unterschiedliche Behandlung der PrEC-Zellen auf die Caspase-3-Aktivität auswirkt. Die Aktivität wurde in Zellen gemessen, die mit unterschiedlichen Strahlendosen (0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy) bestrahlt wurden und mit und ohne Natriumselenit vorbehandelt wurden. Die Caspase-3-Aktivität wurde 6h und 24h nach Bestrahlung gemessen.

Die Ergebnisse der Messungen zum Zeitpunkt 6h nach Bestrahlung sind in Abbildung 3-2 dargestellt. Die Caspase-3-Aktivität in unbehandelten Zellen war sehr hoch und betrug (4483 ± 276) RLU. Diese hohe Caspase-3-Aktivität in der Kontrolle lässt sich mit suboptimalen Kultivierungsbedingungen erklären. Diese suboptimalen Kultivierungsbedingungen wurden ebenfalls beim morphologischen Assay manifest: Hier wurde ein relativ hoher Apoptose-Index von 25 % in der Kontrolle (nach 24h) bestimmt.

Eine Vorbehandlung mit $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit führte zu keiner signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung der Caspase-3-Aktivität. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests geprüft.

Wie in Abbildung 3-2 dargestellt, führte eine Bestrahlung mit Dosen von 0,5 Gy bis 4 Gy in PrEC-Zellen zu einer signifikant ($p < 0,01$) verminderten Caspase-3-Aktivität. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit Natriumselenit hatte keinen Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität. Beim Vergleich der Kontrolle mit unbestrahlten mit Natriumselenit behandelten Zellen blieben die Messwerte gleich niedrig.

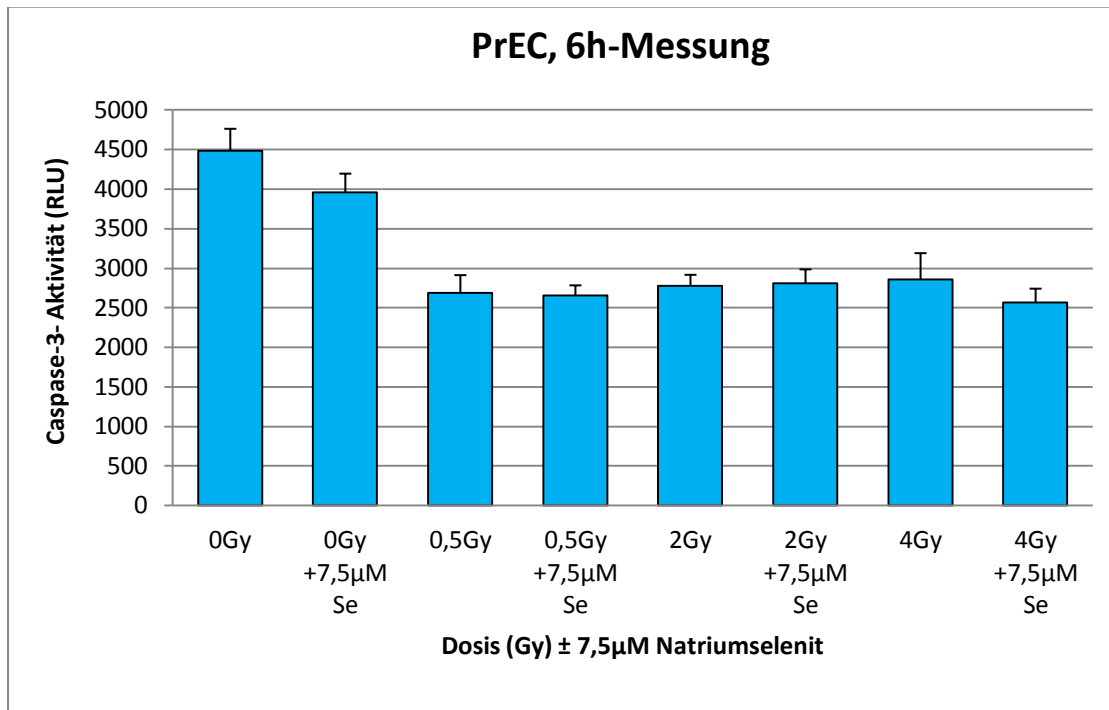


Abbildung 3-2: Caspase-3-Aktivität in PrEC, 6h-Messung:

Caspase-3-Aktivität in relativen Einheiten (relative units, RLU) in PrEC-Zellen nach 6h Kultivierungszeit. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen. Die Zellen wurden entweder nur bestrahlt oder vor der Bestrahlung 6h mit 7,5 µM Natriumselenit vorbehandelt.

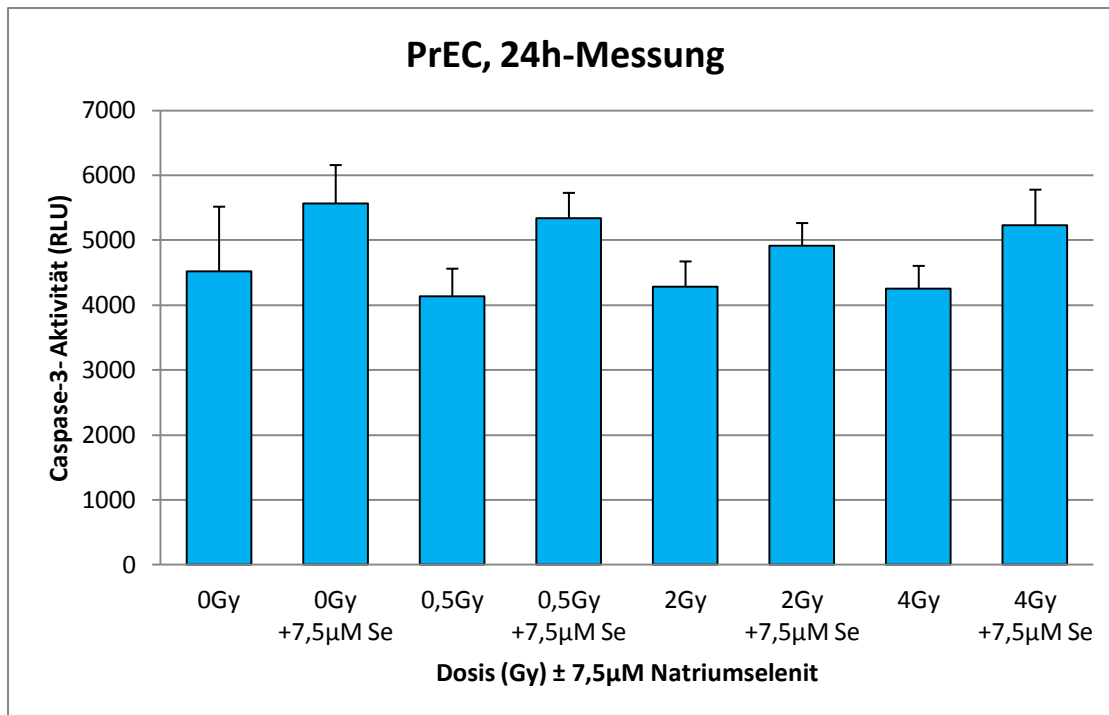


Abbildung 3-3: Caspase-3-Aktivität in PrEC, 24h-Messung:

Caspase-3-Aktivität (RLU) in PrEC-Zellen nach 24h Kultivierungszeit. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen. Die Zellen wurden entweder nur bestrahlt oder vor der Bestrahlung 24h mit 7,5 µM Natriumselenit vorbehandelt.

In Abbildung 3-3 sind die Ergebnisse der Messungen zum Zeitpunkt 24h nach Bestrahlung dargestellt. Auch hier wurde in der Kontrolle (unbestrahlte Zellen) eine sehr hohe Caspase-3-Aktivität von (4520 ± 998) RLU festgestellt, die aber nicht signifikant ($p < 0,05$) von dem Wert der 6h Messungen abweicht. Die alleinige Vorbehandlung mit 7,5 µM Natriumselenit führte zu keiner signifikanten Änderung der Caspase-3-Aktivität ($p < 0,01$).

Eine Bestrahlung mit Dosen von 0,5 Gy, 2 Gy und 4 Gy resultierte nach 24h in einer genauso hohen Caspase-3-Aktivität, wie sie in unbestrahlten Zellen vorhanden war und somit zu einer Aktivität, die signifikant ($p < 0,01$) höher als die zum Zeitpunkt 6h nach Bestrahlung gemessene war. Eine Vorbehandlung mit Natriumselenit in Kombination mit Bestrahlung resultierte in einer gleich hohen Aktivität wie die alleinige Bestrahlung.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem morphologischen Assay, da auch dort weder Bestrahlung noch Vorbehandlung mit 7,5 μM Natriumselenit, bzw. die Kombination aus beiden, eine signifikante Apoptose in PrEC induzierte.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass offensichtlich die Zellen, die durch suboptimale Kulturbedingungen schon zum Beginn der Kultivierung in die Apoptose eintreten, durch eine Bestrahlung erst die Apoptose vermeiden und versuchen, die strahleninduzierten Schäden zu reparieren. Erst 24h nach Bestrahlung kehren sie endgültig in den apoptotischen Prozess zurück.

3.3. Auswertung der späten Apoptosen mittels Tunel-Assay

Der Tunel-Assay dient der Detektion von späten Apoptosen. Da wir beim morphologischen Assay eine geringe Anzahl an späten Apoptosen vorfanden, diente diese Versuchsreihe der Bestätigung des geringen prozentualen Anteils an späten Apoptosen an der Gesamtzahl der ausgewerteten PrEC-Zellen (AI_{late}).

Für die statistische Auswertung wurden die 95 % Poisson-Vertrauensbereiche (PVB) für seltene Ereignisse berechnet und mögliche statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem χ^2 -Test getestet.

Die späten apoptotischen Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 72h ausgewertet. Die Tunel-Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop bestätigte die Ergebnisse des morphologischen Assays. Der Anteil an späten Apoptosen an der Gesamtzahl der Zellen war in der Kontrolle nach 72h mit 1 % sehr gering. Die Auswertung des morphologischen Assays ergab einen AI_{late} von 3 % in der Kontrolle (nach 72h). Eine Kombination aus Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy und 7,5 μM Natriumselenit-Vorbehandlung ergab einen AI_{late} von 5,8 % im Tunel-Assay und 3,0 % im morphologischen Assay. Eine weitere Steigerung der Strahlendosis auf 4 Gy führte zu einem Anstieg des AI_{late} nach 72h auf das Zehnfache des Kontrollwertes, nämlich 10 % (Tunel-Assay) bzw. 11 % (morphologischer Assay).

Tunel-Assay			morphol. Assay	
PrEC, 72h	AI late (%)	95% PVB	AI late (%)	95% PVB
0Gy	1	⟨0,3; 2,0⟩	3	⟨1,5; 6,4⟩
2Gy+ 7,5 μM Se	5,8	⟨3,2; 9,6⟩	3	⟨1,3; 6,5⟩
4Gy	10	⟨3,2; 23,4⟩	11	⟨7,3; 16,0⟩

Tabelle 3-1: Vergleich Tunel-Assay und morphologischer Assay:

Tunel-Färbung in PrEC-Zellen, welche mit 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt wurden und mit 7,5 μM Natriumselenit vorbehandelt wurden (bei 2 Gy). Die späten apoptotischen Zellen wurden nach 72h Kultivierungszeit ausgewertet. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde bei 600-facher Vergrößerung unter Verwendung eines FITC-Filter durchgeführt. Links sind die Ergebnisse der Tunel-Versuchsreihe aufgeführt, rechts die Ergebnisse des morphologischen Assays. PVB sind die berechneten 95 % Poisson Vertrauensbereiche für seltene Ereignisse.

Die Ergebnisse des Tunel-Assays und des morphologischen Assays sind entsprechend dem χ^2 -Test nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

Geringfügige Schwankungen der Ergebnisse beider Assays bestehen aufgrund der unterschiedlichen Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. Innerhalb der Tunel-Versuchsreihe konnten mehr Zellen ausgezählt werden als dies im morphologischen Assay möglich war.

3.4 Vergleich des antioxidativen Zellstatus in PrEC, DU-145 und PC3-Zelllinien, anhand von GSH- und Gesamt-SOD-Messungen

Die Hauptfunktion von Antioxidanzien ist der Schutz der Zellen vor oxidativem Stress, indem sie die bei der Zellatmung entstandenen reaktiven oxidativen Spezies (ROS), wie Superoxidradikale und Wasserstoffperoxide, abfangen. Glutathion (GSH) und Superoxid-

Dismutasen (SOD) sind wichtige Vertreter dieser Gruppe. Darüber hinaus ist GSH an der Umwandlung des Natriumselenits in Superoxidanion und in anderen Natriumselenit-Verbindungen beteiligt.

Die statistische Signifikanz wurde bei dieser Versuchsreihe mit Hilfe des Student t-Tests geprüft.

3.4.1 Intrazellulärer GSH-Spiegel

Die GSH-Aktivität in unbehandelten PrEC betrug $(0,91 \pm 0,04) \times 10^{-6}$ μM GSH/Zelle. Durch eine Natriumselenit-Vorbehandlung mit $7,5 \mu\text{M}$ erhöhte sich die gemessene GSH-Aktivität signifikant auf $(1,15 \pm 0,04) \times 10^{-6}$ μM GSH/Zelle ($p < 0,01$). Die alleinige Vorbehandlung der PrEC mit Natriumselenit bewirkt folglich einen signifikanten Anstieg der Menge an GSH/Zelle.

In unbehandelten DU-145 Zellen wurde eine weitaus geringere Konzentration an GSH/Zelle $(0,40 \pm 0,02) \times 10^{-6}$ μM GSH/Zelle gemessen, verglichen mit den normalen PrEC-Zellen. Nach einer Behandlung mit $20 \mu\text{M}$ Natriumselenit kam es zu einem signifikanten Anstieg auf das Dreifache des Kontrollwertes: $(1,23 \pm 0,01) \times 10^{-6}$ μM GSH/Zelle ($p < 0,01$). Natriumselenit führte in DU-145 Zellen noch ausgeprägter als in PrEC-Zellen zur Induktion von GSH. Durch eine vermehrte Bildung von GSH vermögen sich diese Zelllinien besser vor oxidativem Stress zu schützen.

Die Messung der unbehandelten PC3-Zelllinie ergab vergleichbare Werte wie die PrEC. Jedoch sank die Menge an GSH/Zelle signifikant von $(1,02 \pm 0,01) \times 10^{-6}$ μM GSH/Zelle in der Kontrolle auf $(0,41 \pm 0,01) \times 10^{-6}$ μM GSH/Zelle nach einer Zugabe von $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit ($p < 0,01$). Natriumselenit führte in dieser Zelllinie zu einer GSH-Depletion. PC3-Zellen schützen sich folglich weniger durch eine GSH-Bildung vor oxidativem Stress wie er durch Natriumselenit induziert wird als PrEC und DU-145.

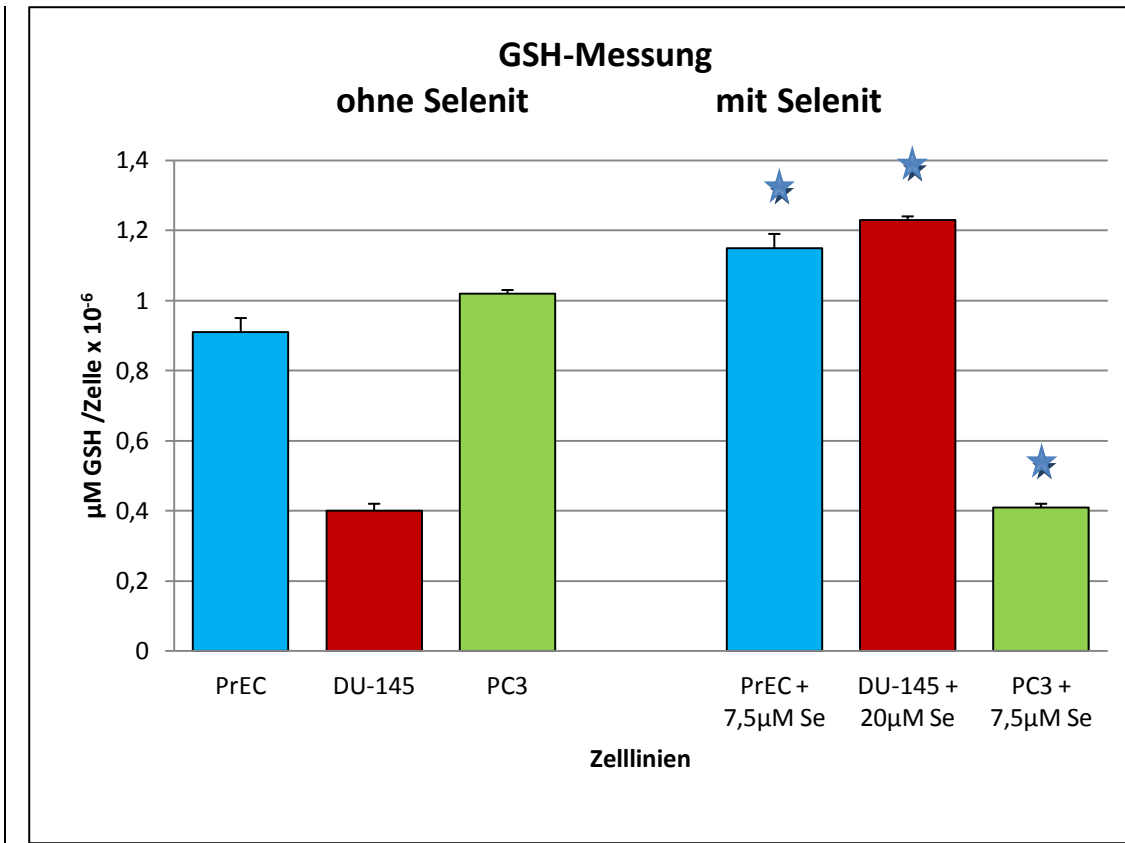


Abbildung 3-4: GSH-Messungen an drei Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) mit und ohne

Natriumselenit:

Darstellung der Ergebnisse aus GSH-Messungen an drei Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3); die Zellen wurden wie unter 2.8.1. beschrieben aufbereitet und je nach Zelllinie mit unterschiedlichen Mengen an Natriumselenit (PrEC + 7,5 µM Natriumselenit, DU-145 + 20µM Natriumselenit, PC3 + 7,5 µM Natriumselenit) und ohne Natriumselenit (PrEC, DU-145, PC3) behandelt. Die Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen. Links die Ergebnisse ohne Natriumselenit und rechts die Ergebnisse mit Natriumselenit. Auf der Ordinate ist die Menge an GSH in µM GSH/Zelle x 10⁻⁶ linear aufgetragen. Jede Messung wurde acht Mal wiederholt.

Signifikant unterschiedlich von dem Kontroll-Messwert: ★

3.4.2 Intrazellulärer Gesamt-SOD-Spiegel

Die Messung der Gesamt-SOD-Konzentration in den unbehandelten PrEC ergab einen Wert von $(0,94 \pm 0,04) \times 10^{-6}$ RLU/Zelle (relative units/Zelle). Die Vorbehandlung mit $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit führte zu einem signifikanten Anstieg auf $(1,53 \pm 0,05) \times 10^{-6}$ RLU/Zelle ($p < 0,01$). PrEC schützen sich demzufolge durch eine gesteigerte Produktion von SOD vor oxidativem Stress.

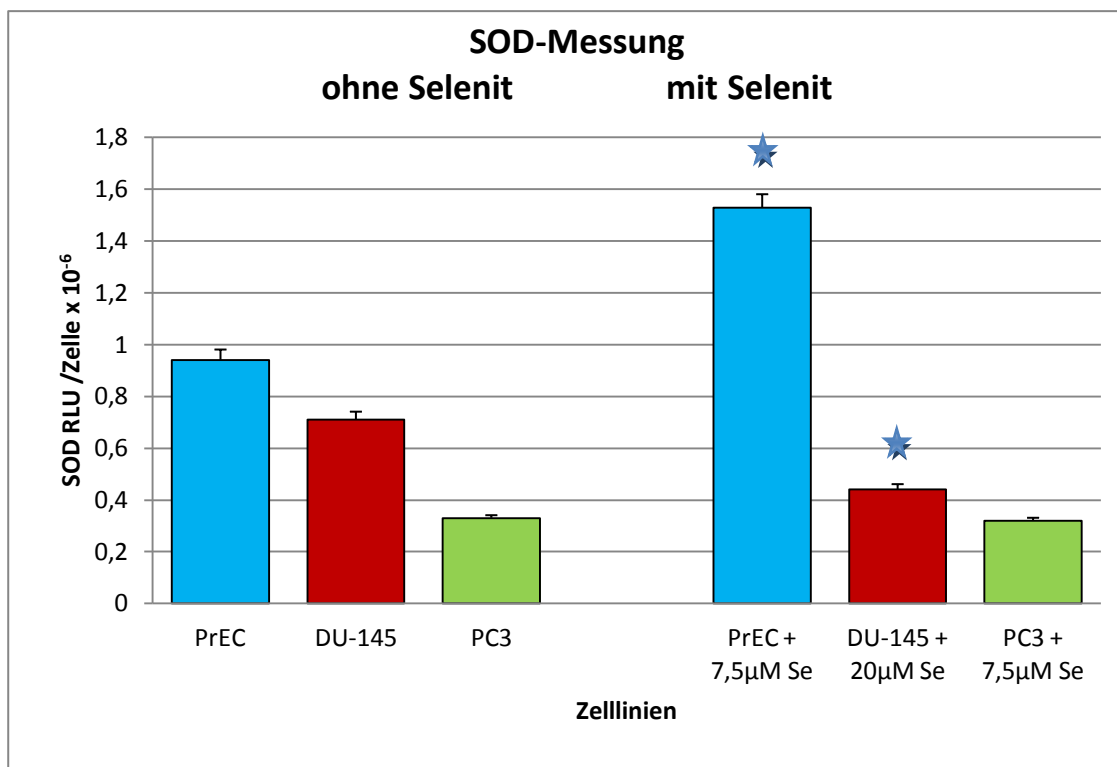


Abbildung 3-5: SOD-Messungen an drei Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) mit und ohne Natriumselenit:

Darstellung der Ergebnisse der Gesamt-SOD-Messungen an drei Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3); die Zellen wurden wie unter 2.8.2. beschrieben aufbereitet und je nach Zelllinie mit unterschiedlichen Mengen an Natriumselenit (PrEC + $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit, DU-145 + $20 \mu\text{M}$ Natriumselenit, PC3 + $7,5 \mu\text{M}$ Natriumselenit) und ohne Natriumselenit (PrEC, DU-145, PC3) behandelt. Die Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen. Links die Ergebnisse ohne Natriumselenit und rechts die Ergebnisse mit Natriumselenit. Auf der Ordinate ist die Menge an SOD in

RLU/Zelle $\times 10^{-6}$ linear aufgetragen. Signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) von unbehandelten Kontrollen: ★

Wie in Abbildung 3-5 dargestellt, ergibt die Kontrolle der DU-145 mit $(0,71 \pm 0,03) \times 10^{-6}$ RLU/Zelle niedrigere Werte als die Kontrolle der PrEC. Eine 20 μM Natriumselenit-Vorbehandlung induzierte eine signifikante Verminderung auf $(0,44 \pm 0,02) \times 10^{-6}$ RLU/Zelle ($p < 0,01$). Diese SOD-Depletion spielt offensichtlich in DU-145-Zellen keine Rolle, da diese Zellen auf eine Natriumselenit-Zugabe in Folge einer Erhöhung des GSH-Gehaltes ziemlich unempfindlich reagieren.

Natriumselenit hatte keinen signifikanten Einfluss auf die SOD-Bildung in der PC3-Zelllinie ($p < 0,01$). Die Werte der Kontrolle lagen bei $(0,33 \pm 0,01) \times 10^{-6}$ RLU/Zelle und verminderten sich nach einer 7,5 μM Natriumselenit-Vorbehandlung auf $(0,32 \pm 0,01) \times 10^{-6}$ RLU/Zelle. Auffallend ist jedoch, dass die SOD-Konzentration in den PC3-Zellen sowohl in der Kontrolle als auch nach Natriumselenit-Vorbehandlung sehr gering ist. Durch diese geringen Mengen an antioxidativ wirksamen SOD reagieren diese Zellen empfindlicher auf erhöhten oxidativen Stress wie er durch Natriumselenit ausgelöst werden kann.

3.5. Der Einfluss von Bestrahlung und Natriumselenit-Vorbehandlung auf die Induktion der vorzeitigen Seneszenz

In dieser Arbeit wurde die Induktion der vorzeitigen Seneszenz in bestrahlten, gesunden Zellen und in Tumorzellen untersucht. Um die möglichen Auswirkungen von erhöhtem oxidativen Stress auf die Seneszenz zu erfassen, wurde ebenfalls der Einfluss einer Natriumselenit-Vorbehandlung auf die Seneszenzrate untersucht. Der relative Anteil an seneszenten Zellen wurde nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h) bestimmt.

Abbildung 3-6 zeigt die Ergebnisse für die bestrahlten PrEC-Zellen. In der Kontrolle (0 Gy, ohne Natriumselenit) stieg der Anteil der seneszenten Zellen von 8,6 % nach 24h auf 20,6 % nach 72h an. Nach einer Strahlendosis von 4 Gy (ohne Natriumselenit) konnte ein Anstieg von 10,3 % nach 24h auf 21,5 % nach 72h verzeichnet werden. Über alle Strahlendosen gemittelt wurde in den PrEC-Zellen eine dosisunabhängige Seneszenzrate von 15,3 %

beobachtet, die von der Seneszenzrate in unbestrahlten Zellen nicht signifikant unterschiedlich war ($p < 0,05$).

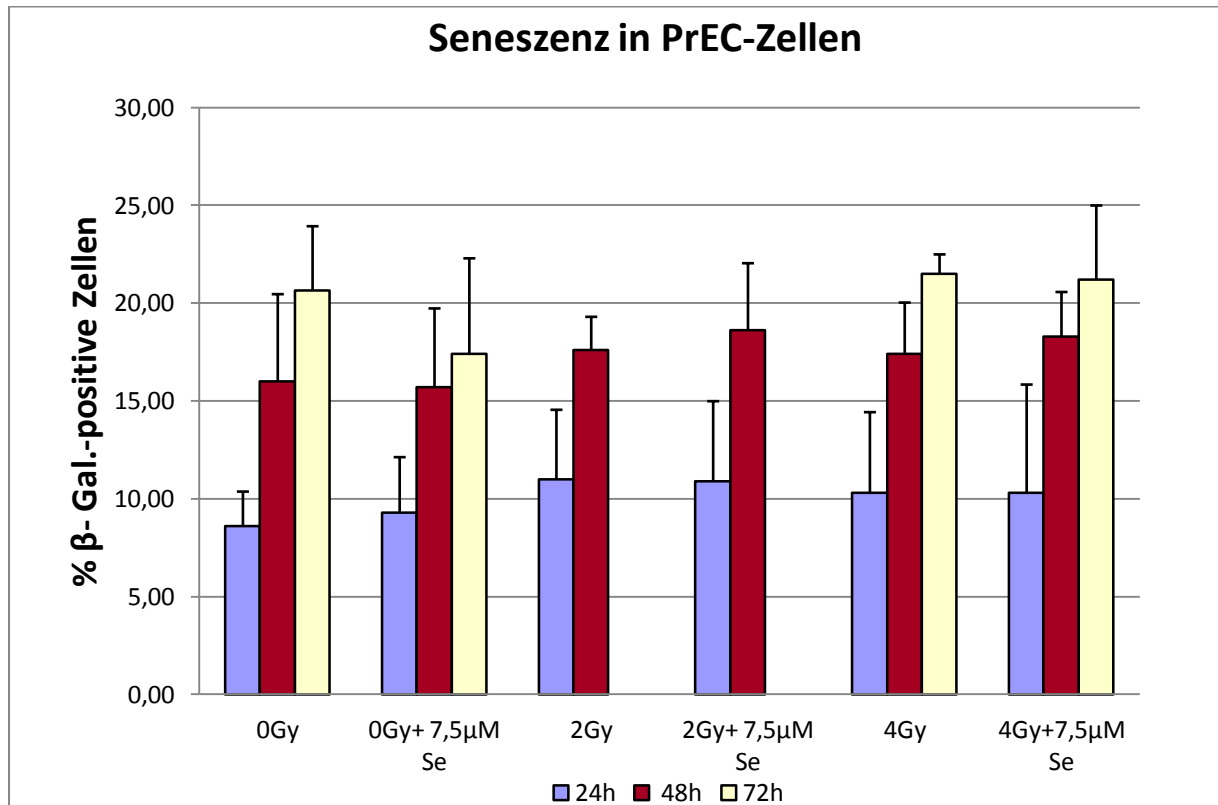


Abbildung 3-6: Seneszenz in PrEC-Zellen:

Seneszenzrate in bestrahlten PrEC-Zellen. Die Anzahl der β -Galaktosidase-positiven, seneszenten Zellen ist für verschiedene Strahlendosen mit und ohne Natriumselenit-Vorbehandlung in % angegeben. Unterschiedliche Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h) sind farblich unterschiedlich dargestellt. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Ein Einfluss der Natriumselenit-Vorbehandlung auf die Seneszenzrate konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Nach 24h lag der Anteil seneszenten Zellen in der Kontrolle bei den bereits erwähnten 8,6 %. Bei 0 Gy + 7,5 μ M Natriumselenit wurden Werte von 9,3 % ermittelt. Nach längerer Kultivierungszeit bot sich ein ähnliches Bild: Nach 48h lag die Kontrolle bei 16,0 % und 0 Gy + 7,5 μ M Natriumselenit bei 15,7 %. Es kann dementsprechend

geschlussfolgert werden, dass Natriumselenit alleine zu keiner signifikanten Induktion der Seneszenz in PrEC führt ($p < 0,05$).

Die Seneszenzrate wurde für $D = 4$ Gy nach 96h bestimmt, jedoch ergaben sich auch dann keine signifikanten Unterschiede in der Induktion der Seneszenz, weder durch Natriumselenit und Röntgenbestrahlung alleine noch durch die Kombination aus beidem ($p < 0,05$). Die Daten sind in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt.

Abbildung 3-7 stellt die Ergebnisse der Seneszenz-Versuche für die DU-145 Zellen nach alleiniger Röntgenbestrahlung und nach Bestrahlung kombiniert mit einer Natriumselenit-Vorbehandlung ($20 \mu\text{M}$) dar. Über alle Strahlendosen gemittelt waren in diesen Tumorzellen niedrigere Seneszenzraten als in normalen PrEC-Zellen zu beobachten. Der Prozentsatz der β -Galaktosidase-positiven Zellen lag selten über 10 %. In Vorversuchen zur strahleninduzierten Apoptose wurde in DU-145 Zellen eine höhere Natriumselenit-Konzentration ermittelt, die zur Auslösung einer signifikanten Apoptoserate notwendig war. Da dies vermutlich auch auf die Induktion der Seneszenz übertragbar ist, kam bei den DU-145 Tumorzellen eine Konzentration von $20 \mu\text{M}$ Natriumselenit zur Verwendung. Im Unterschied zu PrEC-Zellen und PC3-Tumorzellen, bei denen eine Konzentration von $7,5 \mu\text{M}$ ausreichend war.

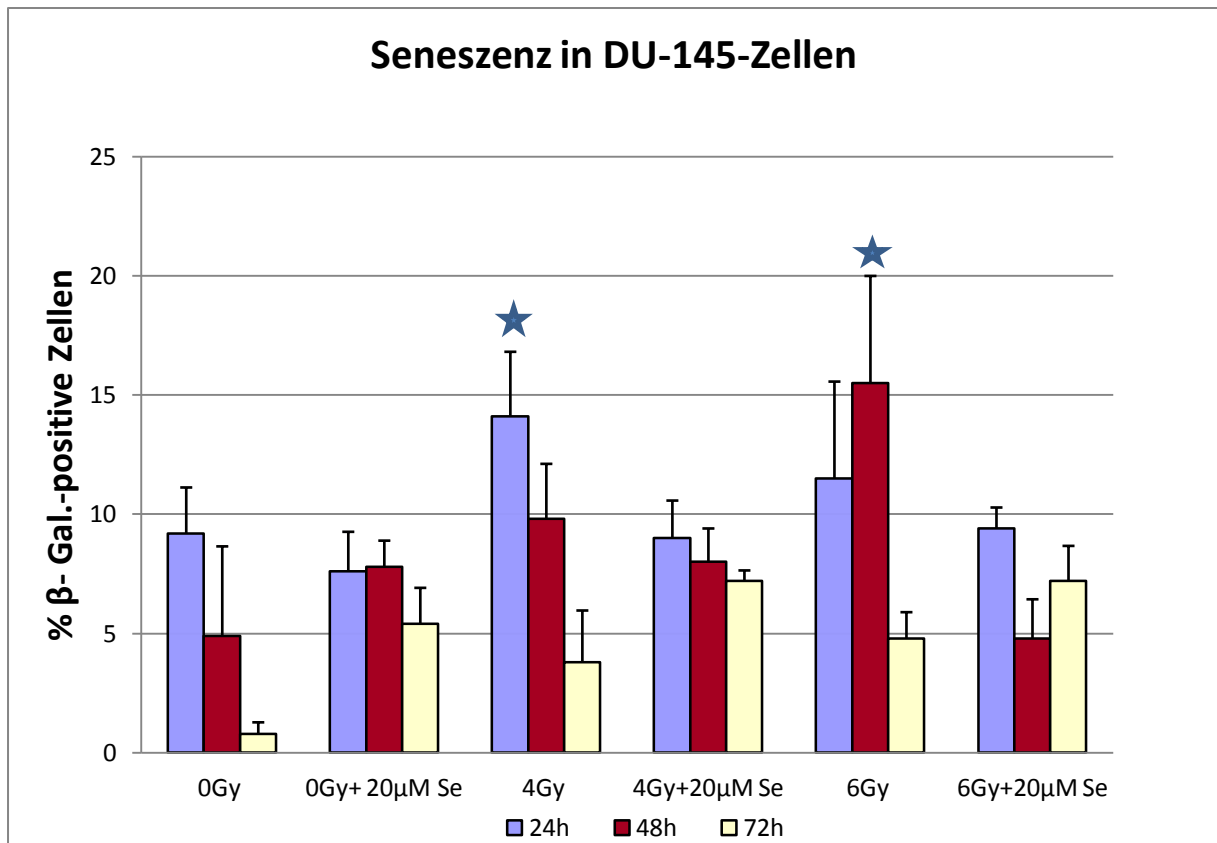


Abbildung 3-7: Seneszenz in DU-145-Zellen:

Seneszenz in DU-145-Zellen nach Röntgenbestrahlung und Natriumselenit-Vorbehandlung. Die Anzahl der β -Galaktosidase-positiven Zellen (in %) ist in Abhängigkeit von der zunehmenden Strahlendosis (0 Gy, 4 Gy, 6 Gy) jeweils mit und ohne 20 μ M Natriumselenit-Vorbehandlung aufgetragen. Unterschiedliche Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h) sind farblich verschieden dargestellt. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen. Signifikant unterschiedlich von der unbestrahlten Kontrolle: ★

Die Anzahl an seneszenten Zellen in der Kontrolle war nach 24h mit 9,2 % am größten und nahm mit steigender Kultivierungszeit ab. Der relative Anteil der seneszenten Zellen lag nach 72h nur noch bei 0,8 %. Ähnliche Werte wurden auch nach einer Bestrahlung mit 4 Gy erzielt. Nach 24h waren 14,1 % der Zellen in einem permanenten G1-Arrest, nach 48h noch 9,8 %. Nach 72h fielen die Werte weiter ab auf 3,8 %. Eine weitere Steigerung der Strahlendosis auf 6 Gy erzielte vergleichbare Werte (11,5 % nach 24h, 15,5 % nach 48h, 4,8

% nach 72h). Folglich nimmt die Anzahl der seneszenten Zellen mit steigender Kultivierungszeit ab. Dies lässt sich bei allen Strahlendosen feststellen.

Die Abbildung 3-7 verdeutlicht des Weiteren die kleinen Effekte einer Bestrahlung auf die DU-145-Zellen. Durch eine Röntgenbestrahlung mit 4 Gy oder 6 Gy erhöhte sich der Anteil seneszenten Zellen signifikant auf etwa 15 % ($p < 0,01$). Aufgrund der lediglich geringen Effekte hat die strahleninduzierte Seneszenz jedoch auch in diesen Zellen keine Bedeutung.

Die alleinige Vorbehandlung mit 20 μM Natriumselenit bewirkte ebenfalls nach 72h keinen signifikanten Anstieg der Seneszenzrate ($p < 0,05$).

Eine Kombination aus Natriumselenit-Vorbehandlung und Bestrahlung schützte sogar die DU-145 vor dem kleinen Strahleneffekt. Für alle Kulturzeiten wurde nach einer kombinierten Behandlung eine signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Seneszenzrate als in nur bestrahlten Zellen beobachtet.

Abbildung 3-8 veranschaulicht die Ergebnisse der Seneszenz-Untersuchungen in der PC3-Zelllinie. Der Anteil der β -Galaktosidase-positiven, seneszenten Zellen erreicht im Mittel nicht mehr als 12 %, unabhängig von einer Natriumselenit-Vorbehandlung oder der Strahlendosis.

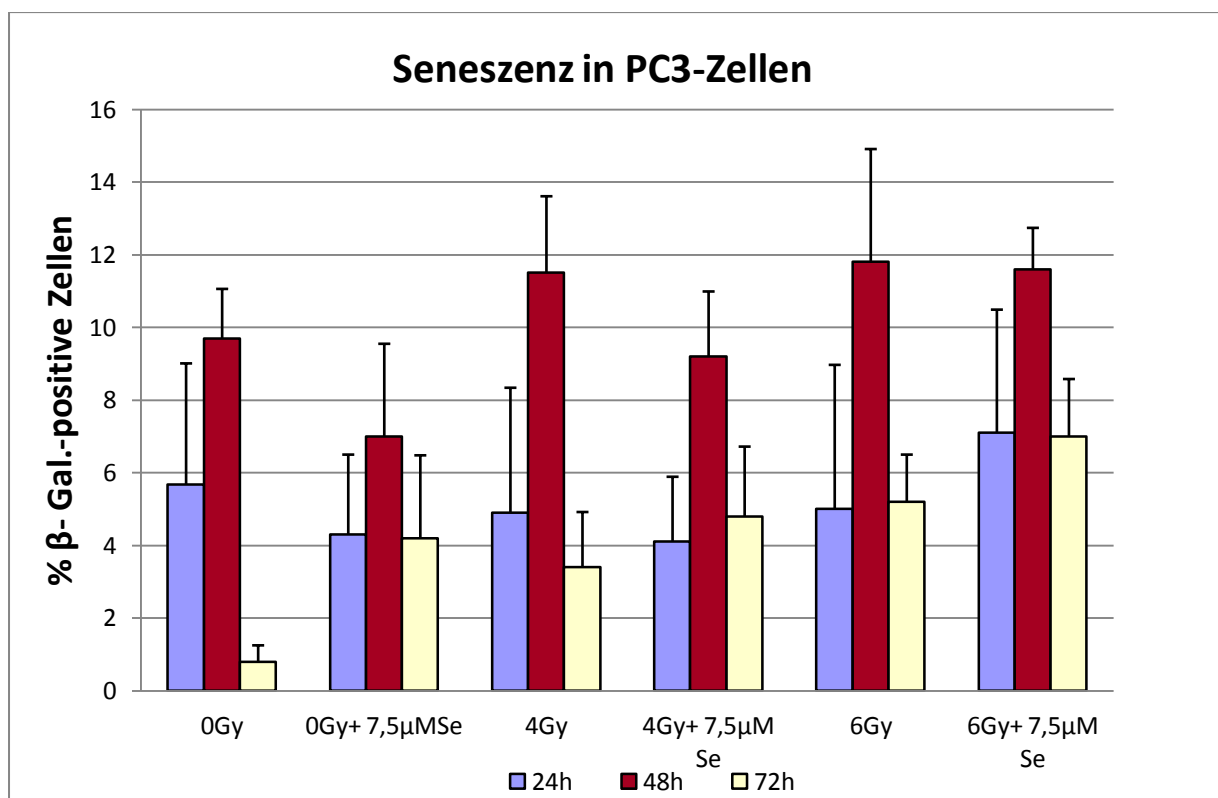


Abbildung 3-8: Seneszenz in PC3-Zellen:

Seneszenz in PC3-Zellen nach Röntgenbestrahlung und Natriumselenit-Vorbehandlung. Die Anzahl der β -Galaktosidase-positiven, seneszenten Zellen (in %) wurden für Strahlendosen von 0 Gy, 4 Gy und 6 Gy jeweils mit und ohne 7,5 μ M Natriumselenit dargestellt. Unterschiedliche Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h) sind farblich verschieden dargestellt. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Die Seneszenz wurde bei allen drei Zelllinien auch nach 96h und 168h Kultivierungszeit untersucht. Da sich keine weiteren signifikanten Effekte aufzeigen ließen, wurden diese Daten in den Abbildungen nicht gezeigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in PrEC-Zellen weder Bestrahlung (bis 6 Gy) noch Natriumselenit-Vorbehandlung noch deren Kombination signifikante Effekte auf die Seneszenzrate bewirkten.

In DU-145-Zellen und in PC3-Zellen induzierte sowohl die Bestrahlung von 4 Gy (nach 24h) als auch 6 Gy (nach 48h) eine signifikant höhere Seneszenzrate im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Dieser Effekt war aber sehr klein und wurde durch eine Natriumselenit-Vorbehandlung verhindert.

3.6. Klonogenes Überleben der PrEC-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder mit Stickstoff-Ionen und Vorbehandlung mit Natriumselenit

In der vorliegenden Arbeit gingen wir der Frage nach, ob die dicht-ionisierende Schwerionenstrahlung, wie z.B. Stickstoff-Ionen (N-Ionen), effektiver PrEC abtötet als die Röntgenstrahlung. Dazu untersuchten wir das klonogene Überleben der PrEC-Zellen nach Röntgenbestrahlung und verglichen es mit der N-Ionenbestrahlung. Zusätzlich analysierten wir, ob eine Natriumselenit-Vorbehandlung in Kombination mit Röntgenbestrahlung das klonogene Überleben stärker vermindert als die alleinige Röntgenbestrahlung.

Wie aus der Abbildung 3-9 ersichtlich, induzierten N-Ionen mit einem LET von 70 KeV/ μ m mehr Zelltod in PrEC-Zellen als die Röntgenstrahlung. Dieser Effekt ist aber relativ klein und stellt somit keinen Nachteil einer Ionenbestrahlung-Therapie dar.

Anhand der Abbildung 3-9 lässt sich die relative biologische Wirksamkeit (RBW) der N-Ionen bei 37 %igem und bei 10 %igem Überleben berechnen.

$$\text{RBW}_{37\%} = 1,35\text{Gy}/0,65\text{Gy} = \mathbf{2,1}$$

$$\text{RBW}_{10\%} = 2,65\text{Gy}/1,60\text{Gy} = \mathbf{1,7}$$

Die RBW ist also dosisabhängig und in normalen PrEC-Zellen nicht größer als ca. 2.

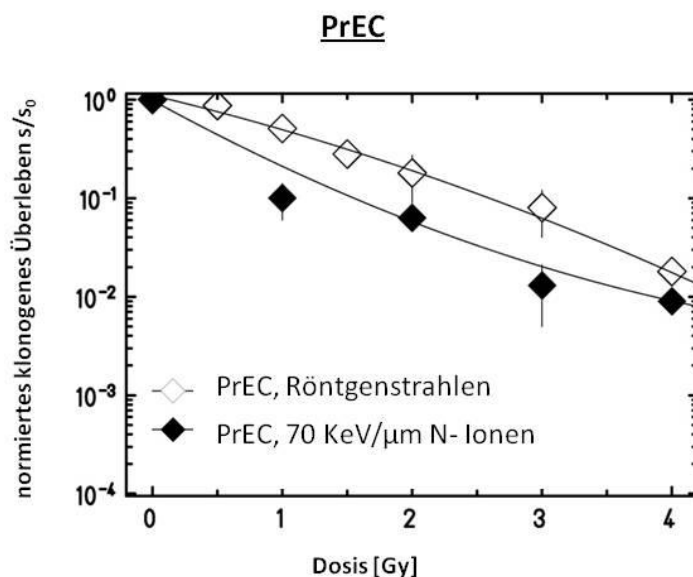


Abbildung 3-9: klonogenes Überleben der PrEC nach Röntgen- und N-Ionen-Bestrahlung:

Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der PrEC-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Konfluent gewachsene Zellmonolayer wurden mit 6 MeV Röntgenstrahlung oder mit 70keV/μm N-Ionen bestrahlt. Das relative klonogene Überleben S/S_0 ist halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Dosis aufgetragen. Einzelne Punkte sind Mittelwerte aus sechs wiederholten Messungen. Die Kurven wurden entsprechend der Gleichung $\log (S/S_0) = -$

$(\alpha D + \beta D^2)$ angepasst. Vertikale Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

In weiteren Versuchen wurde das klonogene Überleben von PrEC-Zellen nach Röntgenbestrahlung mit und ohne Natriumselenit untersucht. Die Versuche konnten nicht analog mit N-Ionenbestrahlung durchgeführt werden aufgrund von technischen Problemen der Ionenbeschleuniger-Anlage (in Darmstadt).

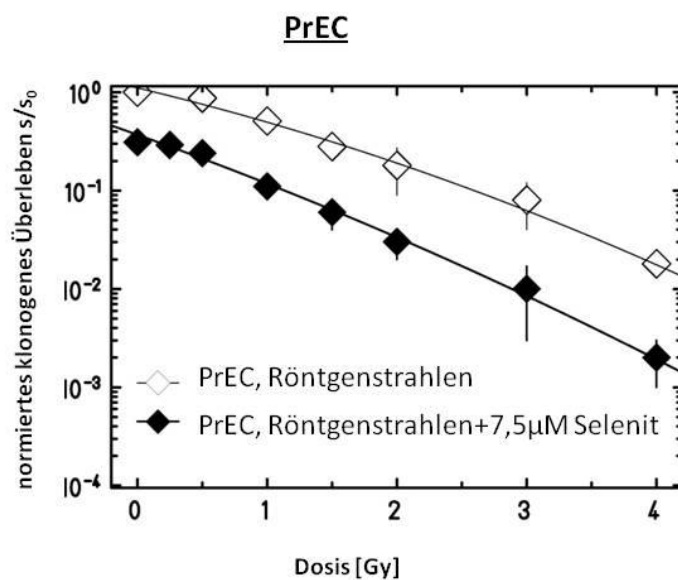


Abbildung 3-10: klonogenes Überleben der PrEC nach Röntgenbestrahlung mit und ohne Natriumselenit:

Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostata-Zelllinie PrEC, in Abhängigkeit von der Strahlendosis mit Röntgenstrahlung ohne Natriumselenit im Vergleich zu Röntgenbestrahlung mit 7,5 μM Natriumselenit-Vorbehandlung. Das relative klonogene Überleben S/S_0 bezogen auf die auf Eins normierte unbestrahlte Kontrolle ist halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Strahlendosis aufgetragen. Einzelne Punkte repräsentieren Mittelwerte. Vertikale Fehlerbalken sind

Standardabweichungen. Die Kurven wurden entsprechend der Gleichung $\log(S/S_0) = -(\alpha D + \beta D^2)$ angepasst.

Die Abbildung 3-10 verdeutlicht, dass eine alleinige Behandlung der PrEC-Zellen mit 7,5 μ M Natriumselenit zu einem verminderten Überleben von nur 45 % führt. Ohne Natriumselenit-Vorbehandlung wäre eine Strahlendosis von 1,25 Gy nötig, um das gleiche Überleben zu erreichen. Die Berechnung des Verstärkungsfaktors (VF) von Natriumselenit ergibt bei 37 %, 10 % und 1 % Überleben:

VF_{37%} = 1, 40Gy/0, 10Gy=14

VF_{10%} = 2, 60Gy/1, 15Gy=2,3

VF_{1%} = 4, 45Gy/2, 90Gy=1,5

Daraus resultiert, dass durch die Zugabe von Natriumselenit mehr Zellen getötet werden als ohne Natriumselenit. Je niedriger die Strahlendosis gewählt wurde, desto größer war der Verstärkungsfaktor von Natriumselenit. Eine Zugabe von Natriumselenit führt zu einem stark verminderten klonogenen Überleben von PrEC-Zellen. Eine kombinierte Natriumselenit-Vorbehandlung und anschließende Bestrahlung resultiert ebenfalls in einem verminderten klonogenen Zellüberleben.

4. Diskussion

Das Prostatakarzinom (PCA) ist der häufigste maligne Tumor des Mannes noch vor dem Kolon- und Bronchialkarzinom (Haberland et al. 2010). Obwohl das PCA als langsam wachsender Tumor gilt und verschiedene Therapiemöglichkeiten existieren, stirbt immer noch jeder zehnte Patient an den Folgen dieser Erkrankung. Bedauerlicherweise sind 10 % der Erkrankten 60 Jahre alt oder jünger.

Reaktive oxidative Spezies (ROS) können Zellen direkt sowie indirekt schädigen. Ein direkter Schaden führt über einen erhöhten oxidativen Stress sowohl zu oxidativen Basenschäden als auch zu sekundären Doppelstrangbrüchen der DNA und infolgedessen zur chromosomalen Instabilität und zum Zelltod (Cerutti et al. 1994). Bekräftigt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse von Mániková et al. Sie wiesen Doppelstrangbrüche als Antwort auf Natriumselenit in *Saccharomyces cerevisiae* nach (Mániková et al. 2010).

Ein indirekter Schaden aktiviert Mitochondrien-abhängig die intrinsische Signalkaskade der Apoptose. Der erhöhte oxidative Stress führt zum Abfall des Membranpotentials in Mitochondrien und zur Freisetzung von Cytochrom c. Dadurch werden die Effektorcaspasen 3 und 9 aktiviert, welche die Apoptose einleiten. Mitochondrien sind folglich die zentralen Zellorganellen bei der ROS-induzierten Apoptose (Ferrin et al. 2011).

Menter et al. (2000) zeigten, dass Natriumselenit in Prostatakrebszellen häufiger die Apoptose induzierte als in normalen Zellen. Eine mögliche Ursache könnte der permanent erhöhte oxidative Stress in malignen Prostatazellen im Vergleich zu normalen Zellen sein (Khandrika et al. 2009). Die Sensitivität gegenüber Natriumselenit scheint mit der Expression von Antioxidanzien und damit indirekt mit der Höhe der induzierten Apoptose zu korrelieren. Aus einem relativen Mangel an Antioxidanzien kann eine erhöhte Sensitivität gegenüber Natriumselenit resultieren, da ROS nicht ausreichend neutralisiert werden können. Beispiele dieser intrinsischen Zell-Abwehrmechanismen sind die antioxidativen Reaktionen unter Beteiligung von Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalase oder Glutathion (GSH). Xiang et al. (2009) beschrieben, dass eine vermehrte Produktion der MnSOD (Mangan-SOD) die Zellen vor der Natriumselenit-induzierten Apoptose schützen kann. MnSOD ist als anti-oxidatives Enzym in der Mitochondrien-Matrix lokalisiert. Seine

Hauptfunktion ist der Schutz vor oxidativem Stress durch die Umwandlung von Superoxidradikalen in Wasserstoffperoxid (Husbeck et al. 2006).

Oberley et al. zeigten bereits 1979, dass Krebszellen geringere Mengen an MnSOD besitzen als normale Zellen. Dies zeigten auch Baker et al. (1997) und Bostwick et al. (2000) in Bezug auf Prostatakrebszellen. Vor dem Hintergrund dieser Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit der antioxidative Status von PrEC, DU-145 und PC3-Zellen miteinander verglichen. Natriumselenit führte dabei in PrEC zur Hochregulation der Gesamt-SOD-Expression, um Superoxidradikale, welche beim Natriumselenit-Metabolismus entstehen, neutralisieren zu können. Erwartungsgemäß wurde in PrEC nach einer Vorbehandlung mit Natriumselenit auch ein signifikanter Anstieg des GSH/Zelle beobachtet. PrEC schützen sich folglich sowohl mit der Hochregulation von SOD als auch von GSH vor Superoxidradikalen, die als Nebenprodukt im Natriumselenit-Metabolismus entstehen.

Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass PrEC bei 7,5 μM Natriumselenit resistent gegenüber dem erhöhten oxidativen Stress sind. Das Ergebnis dieser Arbeit stimmt mit den Erkenntnissen von Husbeck et al. (2006) überein, der bei einer ähnlichen Fragestellung feststellte, dass normale Zellen eine höhere MnSOD-Expression aufzeigen als maligne Zellen. Sun Y et al. (2010), die anstelle von Natriumselenit als ROS-Generator Parthenolid verwendeten, beobachteten ebenfalls erhöhte GSH-Konzentrationen in PrEC.

Wie erwartet enthalten unbehandelte DU-145 Zellen weniger Gesamt-SOD als PrEC. Darüber hinaus reagieren sie mit einem signifikanten Abfall der Gesamt-SOD-Konzentration auf die Natriumselenit-Behandlung. Im Gegensatz dazu haben DU-145, ähnlich wie PrEC, als Reaktion auf Natriumselenit das GSH hochreguliert. Folglich schützen sie sich vor oxidativem Stress ähnlich wie PrEC.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten des Weiteren, dass in den unbehandelten PC3-Zellen ebenfalls eine relativ niedrige Gesamt-SOD-Konzentration vorhanden ist. Dies stimmt mit Baker et al. (1997) und Husbeck et al. (2005) überein. In PC3-Zellen konnte im Unterschied zu DU-145 Zellen ein signifikantes Absinken der GSH-Konzentration nach einer Natriumselenit-Behandlung beobachtet werden. Analog zu diesen Ergebnissen ermittelten auch Wen et al. (2002) ein Absinken der Menge an GSH in PC3-Zellen. Jedoch verwendeten Wen et al. (2002) Parthenolid zur ROS-Induktion in den PC3-Zellen und nicht Natriumselenit.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich DU-145 Zellen besser vor oxidativem Stress schützen können als PC3-Zellen. DU-145 nehmen eine Mittelstellung zwischen PrEC und PC3 in der Reaktion auf Natriumselenit ein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass normale Prostataepithelzellen über eine höhere Gesamt-SOD-Expression verfügen als Prostatakrebszellen. Diese erhöhte SOD-Expression spielt eine bedeutende Rolle in der Abwehr von Superoxidradikalen, welche beim Natriumselenit-Metabolismus erzeugt werden. Gesunde Zellen schützen sich dadurch besser vor dem Natriumselenit-induzierten Zelltod.

Maligne Zellen aus Metastasen haben unterschieden Expressionsprofile. Dies wurde am Beispiel von PC3 und DU-145 gezeigt. Deshalb müssten in weiteren Studien diese Profile an vielen Patienten bestimmt werden, um eine mögliche therapeutische Verwendung eines ROS-Induktors zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, spielt die Apoptose eine wichtige Rolle im Natriumselenit-induzierten Zelltod in Tumorzellen (Chen XJ et al. 2012). Die vermehrte Entstehung von ROS kann bis zu einem gewissen Grad durch Antioxidanzien neutralisiert werden. Ist die Kapazität der Zelle jedoch überschritten, führt dies zur Inhibition des Zellzyklus und zur Auslösung der Apoptose. Dies ist in einer Reihe vorausgehender Studien sowohl für Androgen-abhängige Zelllinien (LNCaP, LAPC-4) als auch für Androgen-unabhängige Zelllinien (PC3, DU-145) gezeigt worden (Menter et al. 2000, Zhong und Oberley 2001, Husbeck et al. 2005). Aufgrund der schwierigen Kultivierung der PrEC ist die Datenlage bezüglich dieser Zelllinie relativ dünn. Trotzdem müssen die Konsequenzen einer Natriumselenit-Behandlung auf das umgebende gesunde Gewebe voraussagbar sein, bevor ROS-induzierende Wirkstoffe klinisch angewendet werden können.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die alleinige Vorbehandlung mit 7,5 μM Natriumselenit bis nach 72h keine vermehrte Apoptose in PrEC induziert.

Menter et al. (2000) untersuchten ebenfalls die Apoptose in PrEC. Sie gelangen qualitativ zum gleichen Ergebnis. Auch hier erwiesen sich normale Zellen als resistent gegenüber Natriumselenit, jedoch lag der Apoptose-Index in seiner Kontrolle im einstelligen Prozentbereich und in dieser Arbeit bei 25 %. Dieser Unterschied lässt sich durch suboptimale Kultivierungsbedingungen und der inhärenten Variabilität zwischen den primären Kulturen von verschiedenen Spendern (Husbeck et al. 2006) erklären.

Die PrEC erwiesen sich ebenfalls gegen eine alleinige Röntgenbestrahlung bis 4 Gy als resistent.

Da man synergistische Effekte zwischen einer Natriumselenit-Behandlung und Röntgenbestrahlung bezüglich der Induktion der Apoptose vermutet (Xiang et al. 2009), explorierten wir den Effekt einer kombinierten 7,5 μ M Natriumselenit-Vorbehandlung und einer Bestrahlung bis 4 Gy. Diese Kombination induzierte jedoch nicht signifikant mehr Apoptose in PrEC. Ähnliches beschrieben auch Tian et al. 2010, die keine Strahlensensibilisierung durch Natriumselenit-Vorbehandlung und Röntgenstrahlung in intestinalen Kryptzellen fanden.

Weitere Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, dass Natriumselenit oder andere ROS-induzierenden-Substanzen in Prostatakrebszellen zu einer Strahlensensibilisierung führen. Sun Y et al. (2010) gingen dieser Fragestellung gezielt nach und analysierten das Verhalten von PrEC und PC3-Zellen bezüglich des Parthenolid-induzierten Zelltodes. Parthenolid sensibilisiert demnach selektiv PC3-Zellen gegenüber Strahlung und erhöht den strahleninduzierten Zelltod. Als Ursache wird ein erhöhter oxidativer Stress diskutiert, der zum einen durch eine vermehrte Bildung von ROS erzielt wird und zum anderen durch die Herunterregulation von antioxidativen Enzymen (SOD und Katalase), welche durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase eingeleitet wird. Dies führt zum selektiven Parthenolid-induzierten Zelltod in PC3-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in PrEC weder eine Strahlensensibilisierung noch ein erhöhter oxidativer Stress gemessen (Sun Y et al. 2010). Normale Zellen können zusätzlich anfallende ROS offensichtlich durch die Hochregulation von Antioxidanzien besser unschädlich machen und somit ihre Homöostase aufrechterhalten. Diese Ergebnisse sind zu einem gewissen Maß auf Natriumselenit übertragbar.

Powolny und Singh (2010) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass PrEC resistenter gegenüber oxidativem Stress sind als Krebszellen. Sie untersuchten dies mit Hilfe des prooxidativ wirksamen Phenethyl Isothiocyanate (PEITC). PEITC erzeugt Mitochondrien-abhängig ROS und leitet in PC3-Zellen vermehrt Apoptose ein, nicht aber in PrEC. Ursächlich dafür ist die unterschiedliche Expression von Genen der antioxidativen Abwehr in PC3-Zellen im Vergleich zu PrEC (Powolny und Singh 2010).

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Natriumselenit in malignen Zellen (PC3, DU-145 und LNCaP) das Wachstum stärker inhibiert (z. B. Menter et al. 2000) und häufiger zur

Apoptose führt (z. B. Husbeck et al. 2006) als in normalen Zellen. In Androgen-abhängigen Zellen entfaltet Natriumselenit die stärkste Wirkung, gefolgt von PC3 und DU-145-Zellen. Virsik-Köpp et al. (persönliche Mitteilung) ermittelten einen Apoptose-Index von 60 % in PC3-Zellen nach alleiniger Vorbehandlung mit 7,5 μ M Natriumselenit und einer Kultivierungszeit von 72h (siehe folgende Abbildung). DU-145 Zellen reagierten resistenter auf Natriumselenit. Bei einer Dosis von 7,5 μ M Natriumselenit wurde bis nach 72h kaum Apoptose induziert (ca. 5 %).

Apoptose in DU-145 und PC3

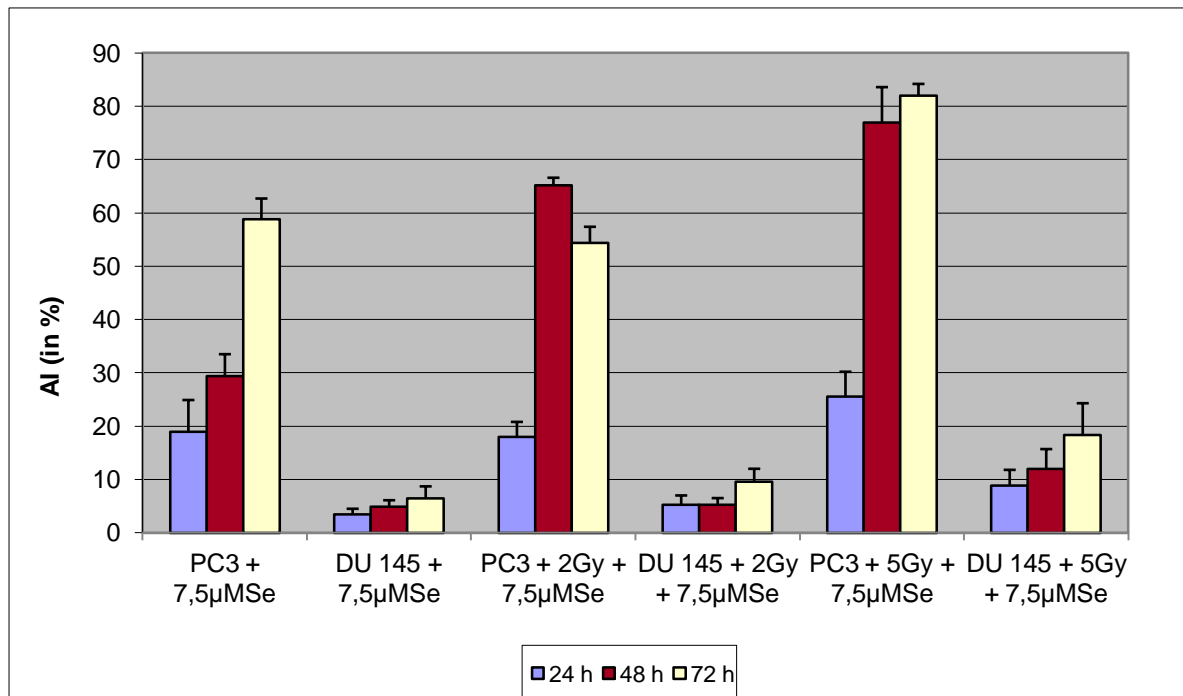


Abbildung 4-1: Apoptose in DU-145 und PC3 nach 24h bis 72h:

Apoptose-Index in PC3 und DU-145 nach Röntgenbestrahlung mit Dosen von 2 Gy und 5 Gy, ohne und mit einer 6h Vorbehandlung mit 7,5 μ M Natriumselenit. Der Anteil an apoptotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen (Apoptose-Index (AI)) in %, ist für verschiedene Dosen mit und ohne Natriumselenit-Vorbehandlung für unterschiedliche Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h) dargestellt. Die Zellkerne wurden mit einer Farbkombination aus Hoechst 33342 und Acridin-Orange angefärbt

und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen. (Übernommen aus Virsik-Köpp et al., persönliche Mitteilung).

In dem sehr unterschiedlichen Verhalten dieser beiden strahlenresistenten Zelllinien spiegelt sich vermutlich die unterschiedliche Expression und Hochregulation (bei erhöhtem oxidativem Stress) der antioxidativen Enzyme wider.

In DU-145 führte eine Bestrahlung von 5 Gy + 7,5 μ M Natriumselenit lediglich in 10-20 % der Zellen zur Apoptose. Eine p53-unabhängige Apoptose ist im Unterschied zu den PC3-Zellen in diesen Zellen, die TP53 mutiert besitzen, durch Natriumselenit kaum induzierbar.

Um neben dem morphologischen Assay eine weitere Bestätigung der Apoptose-Ergebnisse zu erhalten, wurde die Caspase-3-Aktivität in PrEC gemessen. Die relativ hohe Apoptoserate in der Kontrolle des morphologischen Assays wurde mit der Caspase-3-Aktivitäts-Messung bestätigt. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die ROS-vermittelte Apoptose in PrEC Caspase-3-abhängig abläuft. Die alleinige Natriumselenit-Vorbehandlung (7,5 μ M) ergab weder nach 6h noch nach 24h einen signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivitäten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen des morphologischen Assays deutlich überein. Die Caspase-3-Aktivitäts-Messung bestätigte demnach den fehlenden Effekt von Natriumselenit auf die Induktion der Apoptose in PrEC. Xiang et al. (2009) erhielten bereits nach 3h und einer Behandlung mit 2,5 μ M Natriumselenit einen signifikanten Anstieg der Caspase-3- und -9-Aktivität in LNCaP-Zellen. Ein Aktivitätsmaximum wurde nach 12h und 18h detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in malignen Zellen bereits ab einer geringeren Menge an Natriumselenit die Caspase-3-abhängige Apoptose erfolgreich eingeleitet wird, während normale Zellen noch resistent sind.

Sowohl eine Bestrahlung der PrEC mit Dosen bis 4 Gy als auch die Kombination aus Natriumselenit und Bestrahlung führten zu keinem signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Auch diese Ergebnisse stimmen mit dem morphologischen Assay überein.

Um Hinweise auf eine möglicherweise veränderte Kinetik der Apoptose zu erhalten, wurde der Anteil an späten apoptotischen Zellen auch mit dem Tunel-Assay untersucht. Übereinstimmend mit dem morphologischen Assay und der Messung der Caspase-3-Aktivität war der Anteil der späten apoptotischen Zellen nach 72h sehr gering und stieg nach Zugabe von Natriumselenit nicht signifikant an.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Apoptose-Induktion stimmen somit in allen drei Versuchen überein. Sowohl im morphologischen Assay als auch in der Messung der Caspase-3-Aktivität als auch im Tunel-Assay induzierte weder die alleinige Natriumselenit-Vorbehandlung noch eine Bestrahlung bis 4 Gy eine signifikante Apoptose in PrEC. Bei der Kombination aus beidem galt zu prüfen, inwiefern Natriumselenit für den strahleninduzierten Zelltod sensibilisierte (Husbeck et al. 2005, Sun Y et al. 2010, Tian et al. 2010). Jedoch hat Natriumselenit im Rahmen dieser Versuche die PrEC nicht für ionisierende Strahlen bezüglich der Apoptose sensibilisieren können.

Im Hinblick auf eine mögliche Therapie mit Natriumselenit sind diese Ergebnisse als äußerst günstig anzusehen, da Natriumselenit bei supraphysiologischen Konzentrationen selektiv Tumorzellen abtötet, wohingegen sich normale Zellen noch wirkungsvoll schützen können. Diese Ergebnisse implizieren, dass ein möglicher Weg einer selektiven Tumorthherapie über die Nutzung des differentiellen intrazellulären Redox-Status von Krebszellen ablaufen könnte (Sun Y et al. 2010). Husbeck et al. (2006) gehen sogar so weit, das Absinken von MnSOD als prädiktiven Marker für das Ansprechen einer Prostatakrebstherapie auf Natriumselenit anzusehen.

Das therapeutische Potential von Natriumselenit ist durch die vorliegenden Ergebnisse angedeutet. Natriumselenit oder andere ROS-induzierende Agenzien könnten zukünftig eine wichtige Rolle in der Tumorbehandlung einnehmen, falls sich in weiteren Versuchen bestätigen ließe, dass sie selektiv in Tumorzellen den Zelltod einleiten können, ohne dabei gesunde Zellen signifikant zu schädigen. In dieser Hinsicht besteht noch weiterer Klärungsbedarf in klinischen Studien.

Trotz aller erfolgversprechenden Ergebnisse dürfen unerwünschte Nebenwirkungen von Natriumselenit nicht außer Acht gelassen werden. Hohe Dosen an Natriumselenit können DNA-Schäden induzieren, was zu einem erhöhten Zweitmalignom-Risiko führen kann (Waters et al. 2005). Momentan wird ebenfalls eine hemmende Wirkung von Natriumselenit auf die Angiogenese diskutiert. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass Natriumselenit den Angiogenesefaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) inhibiert (Brozmanová et al. 2010).

Ferner gilt es weitere Agenzien zu untersuchen welche, ähnlich wie Natriumselenit, über eine Generierung von ROS zu erhöhtem oxidativem Stress führen und Mitochondrien-

vermittelt die intrinsische Apoptose induzieren. Es existieren zahlreiche weitere Substanzen mit einem anderen Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum als Natriumselenit. An dieser Stelle ist Casticin zu nennen, eine wichtige Komponente von Fructus Viticis, welches das Wachstum von verschiedenen Krebszellen hemmt (Chen D et al. 2011).

Oxidativer Stress kann zudem erfolgreich durch Monensin induziert werden. Monensin wirkt stark proapoptotisch und antiandrogen, indem es die Expression des Androgen-Rezeptors in Prostatakrebszellen vermindert (Ketola et al. 2011). Antiandrogene blockieren die Wirkung von Testosteron durch Bindung an den Androgenrezeptor, ohne eine intrinsische Signalkaskade auszulösen. Da die Testosteronproduktion dadurch nicht gehemmt wird, bleiben Nebenwirkungen wie Hitzewallungen und Schweißausbrüche aus. Diese und weitere Symptome werden unter dem Begriff „Androgenentzugssyndrom“ zusammengefasst und belasten Patienten oft sehr. Die antiandrogene Therapie ist im fortgeschrittenen Stadium indiziert, wenn das PCA einen hormonrefraktären Zustand erreicht hat. Monensin und Casticin sind somit, neben Natriumselenit und Parthenolid, vielversprechende Möglichkeiten in der Behandlung des PCA.

Wie bereits dargelegt, führen ein vermehrter oxidativer Stress, eine Radiotherapie oder andere DNA-schädigende Agenzien zur Apoptose oder in Abhängigkeit vom Zelltyp zu einem permanenten, p53-abhängigen G1-Zellzyklusarrest (Di Leonardo et al. 1994, Muller 2009). Roninson (2003) vermutet eine inverse Korrelation zwischen den verschiedenen Mechanismen des Zelltodes. Ein Abfall der Apoptoserate geht demnach mit einem entsprechenden Anstieg der Seneszenz und des mitotischen Zelltod einher. Vorausgegangene Studien belegen, dass die Seneszenz in Tumorzellen am stärksten durch Medikamente induziert wurde, welche mit der DNA interagieren wie Doxorubicin. Eine Bestrahlung rief eine etwas schwächere Reaktion hervor (Roninson 2003). Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Anteil der Natriumselenit- und der strahleninduzierten Seneszenz in unterschiedlichen Zelllinien zu bestimmen und zu quantifizieren. Die Rolle des Tumorsuppressorgens p53 wird in diesem Zusammenhang noch näher erläutert werden.

Verschiedene klinische Studien deuten darauf hin, dass die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) genauso erfolgreich in der Verhinderung des Tumorwachstums ist wie der Chemotherapie-induzierte Zelltod (Desai und Stadler 2006, Martin und Schilder 2006), jedoch durch niedrigere Dosen an Chemotherapeutika und folglich nebenwirkungsärmer

erzielt werden kann. Dadurch werden eher chronische Tumore entstehen, welche den Patienten aufgrund geringerer Nebenwirkungen eine bessere Lebensqualität ermöglichen (Ewald et al. 2010). Der Nutzen der TIS bezieht sich sowohl auf frühe als auch auf späte Krebsstadien. Man errechnet sich positive Effekte in prämaligen Tumorstadien, da seneszente Zellen bereits in vielen gutartigen Tumoren nachgewiesen wurden, wie z. B. beim benignen Nävus der Haut. Dort persistiert das Zellwachstum über Jahre, ohne maligne zu entarten; außerdem bei der benignen Prostatahyperplasie und dem Lungenadenom, nicht aber beim Adenokarzinom der Lunge. Dies deutet darauf hin, dass die Seneszenz eine endogene Barriere der malignen Transformation darstellt, was zur Vermutung führt, dass Seneszenz in Tumoren auf einen benigneren oder günstigeren Ausgang hindeutet (Collado et al. 2005), indem es das Wachstum in fortgeschrittenen Tumoren verlangsamt und zu einem verminderten metastatischen Potential führt (Ewald et al. 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Zelllinien untersucht. Neben zwei malignen Zelllinien, DU-145 und den PC3, wurde die TIS auch in normalen Prostataepithelzellen (PrEC) untersucht, um Rückschlüsse zu ziehen, inwiefern gesunde Zellen in einen permanenten Zellzyklusarrest eintreten, nachdem sie bestrahlt und mit Natriumselenit behandelt wurden.

Da die Radiotherapie die konventionelle Therapie-Option beim Prostatakarzinom darstellt und es bei mittlerem bis hohem Risiko Ausfallraten von 25-40 % gibt (Udayakumar et al. 2011), ist es wichtig Methoden zu entwickeln, welche die Effizienz der Radiotherapie verbessern können, beispielsweise durch eine vermehrte Seneszenz-Induktion in Krebszellen wie den DU-145 und PC3.

Zunächst wurde die Seneszenz in normalen PrEC untersucht. Weder eine Bestrahlung mit 4 Gy noch eine Natriumselenit-Vorbehandlung noch die Kombination aus beidem führte zu signifikant erhöhten Seneszenzraten. Diese Erkenntnisse implizieren, dass PrEC sehr resistente Zellen sind, die sich sowohl vor der Apoptose als auch vor der Seneszenz ausreichend schützen können.

Ähnlich wie bei den Apoptose-Versuchen ist der Anteil seneszenter Zellen in der Kontrolle nach 24h mit 8 % bereits relativ hoch und steigt mit zunehmender Kultivierungszeit auf 21 % (nach 72h) an. Ursächlich dafür sind sehr wahrscheinlich suboptimale in-vitro Kultivierungsbedingungen. Die höchsten Werte wurden nach 72h in PrEC detektiert.

Allgemein war in den PrEC ein relativ hohes Niveau der Seneszenz wiederzufinden. Dies verdeutlicht die unten abgebildete Grafik.

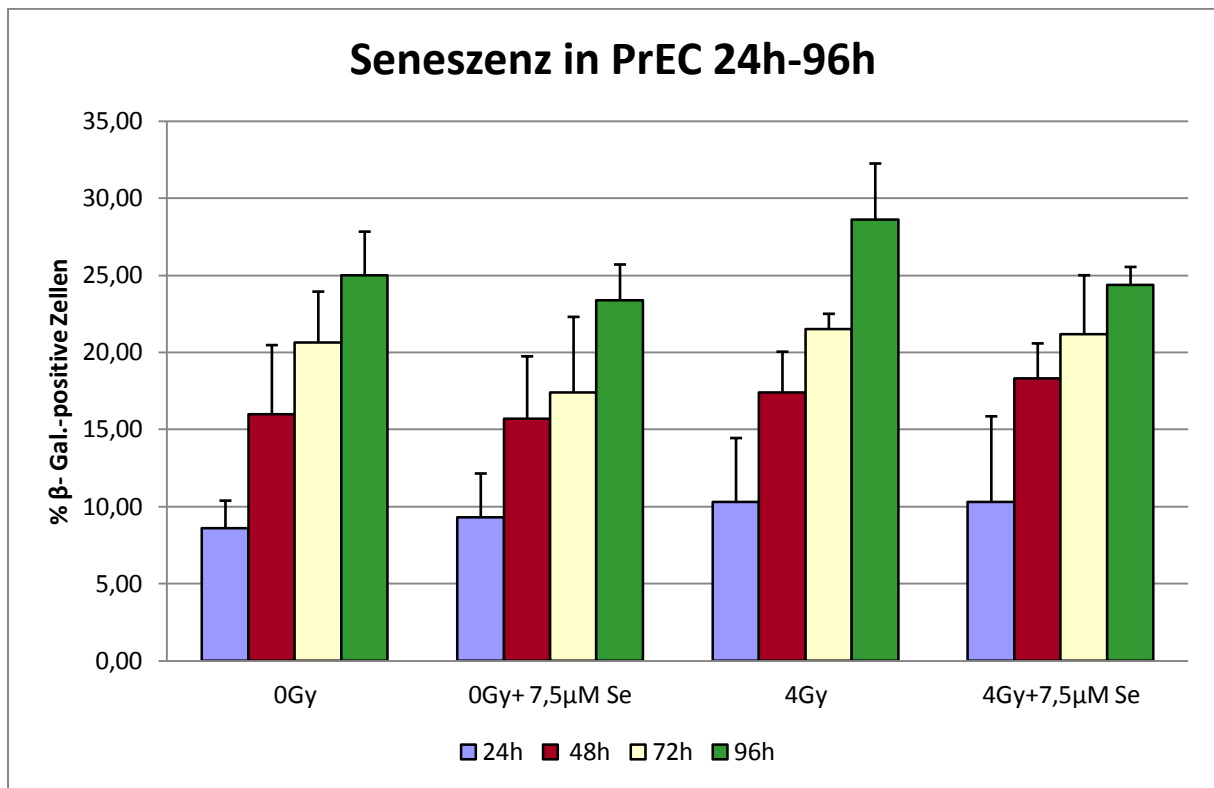


Abbildung 4-2: Seneszenz in PrEC 24h-96h nach Röntgenbestrahlung und Natriumselenit-Vorbehandlung:

Auf der Ordinate ist die relative Anzahl an β -Galaktosidase-positiven Zellen (in %) in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0 Gy und 4 Gy) angegeben, jeweils mit und ohne 7,5 μ M Natriumselenit. Unterschiedliche Kultivierungszeiten (24h, 48h, 72h, 96h) wurden farblich verschieden dargestellt. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen. Anhand der Abbildung ist der Anstieg der Seneszenzrate mit zunehmender Kultivierungszeit zu sehen.

Eine Bestrahlung mit 4 Gy führt nach 72h in über 20 % und nach 96h bereits in fast 30 % der PrEC zur Seneszenz. Dieser relativ hohe Wert verdeutlicht die Bedeutung der Seneszenz in PrEC. Laut Lehmann et al. (2007) ist die zelluläre Seneszenz der wichtigste Mechanismus des Zelltodes beim Prostatakarzinom nach Röntgenbestrahlung bei Zellen mit verbleibender p53-

Funktion. Andere Zelltodmechanismen (Apoptose, Zellzyklusarrest, mitotische Katastrophe) spielen eine untergeordnete Rolle. Im Rahmen dieser Versuche wurden lediglich Prostatakarzinom-Zellen mit mutiertem p53 untersucht. Jedoch implizieren die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass die Seneszenz auch in normalen Prostataepithelzellen mit intakter p53-Funktion eine bedeutende Rolle spielt.

DU-145 Zellen gehen im Vergleich zu PrEC schneller in die Seneszenz. Höchstwerte wurden bereits nach 24h ermittelt. Jedoch gehen insgesamt relativ wenige Zellen (10 %) in den permanenten G1-Arrest. Natriumselenit scheint in DU-145 Zellen keinen zusätzlichen Effekt auf die Seneszenz zu haben.

Eine Bestrahlung mit 4 Gy induziert nach 24h signifikant mehr Seneszenz in DU-145. Die Bestrahlung der DU-145 scheint demzufolge vermehrt zu strahleninduzierter Seneszenz zu führen. Lehmann et al. (2007), die ebenfalls die DU-145 untersuchten, ermittelten bei einer Strahlendosis von 4 Gy nach 5 Tagen 5 % β -Galaktosidase-positive Zellen. Dieses Ergebnis ist nur eingeschränkt mit den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da die Seneszenz im Rahmen unserer Versuche lediglich nach 24-72h untersucht wurde. Da wir aber nach 24h Höchstwerte detektierten und bereits nach drei Tagen weniger als 5 % seneszente Zellen vorfanden, kann angenommen werden, dass wir nach einer Kultivierungszeit von 5 Tagen ebenfalls unter 5 % seneszente Zellen erhalten hätten, da zwischen drei und fünf Tagen kein Anstieg der Seneszenzraten zu erwarten ist. Übereinstimmender Weise beschrieb Lehmann et al. (2007) ebenfalls eine p53-abhängige Strahlen-induzierte Seneszenz in DU-145.

Um Aussagen bezüglich der Seneszenz in p53-defizienten Zellen machen zu können, wurden PC3-Zellen untersucht. Erwartungsgemäß wurden in PC3-Zellen die geringsten Seneszenzraten von den drei untersuchten Zelllinien ermittelt. Gemittelt lag der Wert bei unter 5 %. Die Seneszenz scheint demnach eine untergeordnete Rolle im Zelltod der PC3-Zellen zu spielen. Ursächlich ist vermutlich der Verlust der p53-Funktion, der die p53-abhängige Seneszenz verhindert (Lehmann et al. 2007). Höchstwerte ergaben sich nach 48h. PC3-Zellen brauchen folglich länger als DU-145, bis die Signalkaskade der Seneszenz vollständig abgelaufen ist.

Die Seneszenzraten der PC3 stiegen nach 72h durch Natriumselenit signifikant an. Abacavir, ein Medikament zur Bekämpfung von HIV, erzielte im Rahmen einer anderen Studie

vergleichbare Ergebnisse. Ähnlich wie Natriumselenit führt Abacavir zu vermehrter Seneszenz in PC3-Zellen nach 72h. Neben der Seneszenz reduziert Abacavir signifikant das Zellwachstum und induziert den Zelltod sowohl in PC3 als auch in LNCaP-Zellen (Carlini et al. 2010).

Die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy sowie die Kombination aus 6 Gy und Natriumselenit leiten ebenfalls nach 72h häufiger die Seneszenz ein als in der Kontrolle, jedoch auf einem sehr niedrigen Niveau zwischen 4-7 %.

Über alle Strahlendosen gemittelt erhielten wir in den unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche Seneszenzraten. In PrEC wurde der größte Anteil von über 15 % detektiert. In den malignen Zelllinien DU-145 und PC3 scheint die Seneszenz eine untergeordnete Rolle als Zelltodmechanismus zu spielen. Unter 10 % der DU-145-Zellen gingen in den permanenten G1-Arrest und lediglich 5 % der PC3-Zellen. Als Hintergrund wird das Vorhandensein des Tumorsuppressorgens p53 diskutiert. P53 spielt eine bedeutende Rolle in der zellulären Antwort auf oxidativen Stress und DNA-Schäden. Ist die DNA von Zellen irreparabel beschädigt, werden sie über eine p53-abhängige Signalkaskade eliminiert. Bedauerlicherweise ist p53 in circa 50 % der Malignome inaktiviert (Zawacka-Pankau et al. 2010), was zu einem selektiven Überlebensvorteil von Krebszellen führt. Zellen mit funktionellem p53 (wie PrEC) scheinen sensitiver auf Stress zu reagieren, der die Seneszenz stimuliert, als Zellen mit mutiertem p53, wie DU-145 und PC3 (Ewald et al. 2010). Bei Zellen mit einem mutierten p53-Allel, wie den DU-145, ist der Anteil an seneszenten Zellen höher als in Zellen mit zwei mutierten p53-Allelen, wie den PC3. In DU-145 wurde immerhin jede zehnte Zelle seneszent. In PC3-Zellen wurde kaum Seneszenz detektiert. Dies steht in Übereinstimmung damit, dass p53 verschiedene Funktionen in der Zellzyklus-Regulation bei der Antwort auf DNA-Schäden und bei der Wachstumsregulation besitzt (DiLeonardo et al. 1994).

Neben der p53-abhängigen Seneszenz scheinen jedoch auch p53-unabhängige Signalwege zu existieren. Wie bereits dargelegt, können Zellen mit fehlendem p53, wie PC3, zu einem geringen Teil in den permanenten G1-Arrest eintreten (Chang et al. 1999 a, Schwarze et al. 2005), jedoch zeitverzögert (Ewald et al. 2010). Diese Annahme korreliert mit den Ergebnissen von Chang et al. (1999 b), der Kolonkarzinom- und Fibrosarkomzellen untersuchte, in welchen p53 homozygot inaktiviert ist. Dies vermindert die Seneszenz zwar

deutlich, verhindert die Medikamenten- oder Bestrahlungs-induzierte Seneszenz jedoch nicht vollständig. Demzufolge ist p53 ein positiver Regulator der beschleunigten Seneszenz in Tumorzellen, aber nicht absolut erforderlich für die Signalkaskade. Es kann spekuliert werden, dass die Reaktion über eine ähnliche Signalkaskade abläuft, nämlich über die p53-verwandten Tumorsuppressorgene p63 und p73 (Roninson 2003, Guo und Mills, 2007).

P73 induziert die Transkription von Genen, welche in die Regulation des programmierten Zelltodes involviert sind. P73 transkribiert sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Gene (Jost et al. 1997, Irwin und Kaelin 2001). Es wurde beschrieben, dass Zellen mit mutiertem p53 die p73-abhängige Apoptose einleiten, wenn sie DNA-schädigenden Agentien ausgesetzt sind (Zawacka-Pankau et al. 2010). Dies rückt vor allem deswegen in den Fokus der Forschung, da neuere Studien belegten, dass p73 in Karzinomen häufig nicht inaktiviert ist und ebenfalls die Apoptose induziert, abhängig aber auch unabhängig vom p53-Status. Aus diesem Grund hofft man, zukünftig therapeutische Strategien entwickeln zu können, welche in malignen, p53-mutierten Zellen gezielt die p73-abhängige Apoptose induzieren. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass p53 und p73 stark miteinander interagieren, vor allem bei mutiertem p53 (Zawacka-Pankau et al. 2010).

Proapoptotische Effekte wurden ebenfalls für p63 in humanen Leberzellen nachgewiesen (Gressner et al. 2005). Über eine Aktivierung des Todesrezeptors CD95 wird die Effektorcaspase 9 stimuliert, was im programmierten Zelltod endet.

In Studien (Cox und Kline 1983) wurde berichtet, dass eine komplette Regression des Prostatakarzinoms zum Teil erst nach einem Jahr und länger nach einer Bestrahlung beobachtet wurde. Diese langsame Rückbildung des Tumors scheint im Zusammenhang mit Bestrahlungs-induzierter Seneszenz zu stehen (Roninson 2003).

Diese Erkenntnisse deuten an, dass die TIS eine neue Möglichkeit repräsentiert, welche die Tumorthherapie in Zukunft verbessern kann. Jedoch bleibt abzuwarten, ob weitere experimentelle Daten ein ähnlich optimistisches Ergebnis erzielen und ob man effiziente Seneszenz-induzierende Mittel findet, welche in einem therapeutischen Ausmaß erfolgreich eingesetzt werden können. Inwiefern eine p73- und p63-abhängige Signalkaskade bei p53-mutierten Karzinomzellen den Zelltod induzieren kann, bleibt noch weiter zu klären.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit die klonogene Aktivität der PrEC durch eine Natriumselenit-Vorbehandlung eingeschränkt wird. Anhand der Ergebnisse des Koloniebildungsassays überleben lediglich 45 % der PrEC nach alleiniger Natriumselenit-Behandlung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass Natriumselenit in PrEC weder Apoptose noch Seneszenz in diesem Umfang induziert. Es stellt sich somit die Frage, wie dieses Zellsterben zustande kommt.

Natriumselenit kann durch die Bildung von ROS reaktive DNA-Schäden induzieren. Durch Fehlreparatur dieser Schäden kann es zur Bildung von sekundären DNA-Doppelstrangbrüchen kommen. DNA-Doppelstrangbrüche werden repariert oder sie induzieren Apoptose oder Seneszenz. Fehlreparierte Doppelstrangbrüche resultieren in der Bildung von Chromosomenaberrationen, die ihrerseits zum mitotischen Zelltod führen können.

Da der Koloniebildungsassay jedoch alle strahleninduzierten Zelltodmechanismen zusammenfasst, weil er das Langzeitüberleben von Zellen misst, welche unbegrenzt proliferieren können, werden neben der Apoptose und der Seneszenz auch der mitotische Zelltod sowie die Nekrose und die Autophagie mit eingeschlossen (Bromfield et al. 2003). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass Natriumselenit in PrEC den mitotischen Zelltod oder die Autophagie induziert. Studien deuten an, dass hierbei vor allem die Autophagie einen wichtigen Stellenwert einnimmt, da Natriumselenit durch die Generierung von Superoxiden zu einer Caspase-unabhängigen (Edick et al. 2007), ROS-vermittelten Autophagie führt (Kim et al. 2007, Chen Y et al. 2009). Dieser Sachverhalt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Eine noch wahrscheinlichere Erklärung für das verminderte proliferative Überleben der PrEC-Zellen könnte die unter in vitro-Bedingungen begrenzte Teilungsfähigkeit dieser Zellen sein. Sie können sich infolge der suboptimalen Bedingungen in vitro nur 10-20 Mal teilen. Möglicherweise wird durch die Natriumselenit-Zugabe diese Situation weiter verschlechtert.

Der Verstärkungsfaktor von Natriumselenit liegt bei Strahlendosen bis 2 Gy bei 14 und bei größeren Dosen von 3-4 Gy bei 1,5. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Sensibilisierung durch Natriumselenit bei größeren Strahlendosen abnimmt. Natriumselenit tötet demzufolge PrEC in vitro am wirkungsvollsten im klinisch relevanten Dosis-Bereich bis 2 Gy ab.

Die Datenlage bezüglich anderer Koloniebildungsassay mit PrEC ist sehr unzureichend aufgrund der Empfindlichkeit und der schlechten Kultivierbarkeit dieser Zelllinie. Sun Y et al. (2010) versuchten vergeblich das Koloniewachstum mit PrEC zu untersuchen. Sie nutzten alternativ eine Wachstumskurve, um Aussagen über die PrEC treffen zu können. Anstelle von Natriumselenit verwendeten sie Parthenolid, um vermehrt oxidativen Stress in PrEC zu erzeugen. Ähnlich wie bei unseren Ergebnissen ermittelten sie ein geringeres Wachstum der PrEC bei der Zugabe von Parthenolid als in der unbehandelten Kontrolle. Jedoch überlebten durch Parthenolid quantitativ mehr Zellen als durch Natriumselenit. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich die größere Effektivität von Natriumselenit in der Induktion des Zelltodes in PrEC-Zellen. Übereinstimmend mit unserem Ergebnis führte Gammastrahlung zu einem verminderten Überleben der PrEC. Rein qualitativ wurde in der Studie von Sun Y et al. (2010) Vergleichbares ermittelt, jedoch auf einem unterschiedlichen Niveau. In den vorliegenden Ergebnissen wurde ein viel geringeres Überleben ermittelt, sowohl nach einer Bestrahlung als auch nach einer Natriumselenit-Behandlung, als in den Ergebnissen von Sun Y et al. Diese Abweichungen sind zum einen durch unterschiedliche Spender zu erklären und zum anderen stellen die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden eine Einschränkung der Vergleichbarkeit dar.

Bromfield et al. (2003) scheiterten ebenfalls am Koloniebildungsassay der PrEC. Jedoch ermittelten sie bei PrEC eine Überlebensfraktion von 5 % bei einer Bestrahlung von 2 Gy. Dieser Wert unterscheidet sich von unseren Ergebnissen, die bei 20 % lagen. Diese Differenz liegt vermutlich an den interindividuellen Unterschieden der verschiedenen Spender. In den malignen DU-145 Zellen wurde von Bromfield et al. (2003) eine Überlebensfraktion von 55 % bei 2 Gy ermittelt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass maligne Prostatazellen resistenter gegenüber einer Bestrahlung sind als normale Zellen. Diese Hypothese bestätigten die Ergebnisse von Virsik-Köpp et al. (persönliche Mitteilung), welche bei einer Bestrahlung von 2 Gy ein Überleben von 60 % in DU-145 ermittelte. In der PC3-Zelllinie lag die Überlebensfraktion nach einer Bestrahlung von 2 Gy bei 50 %. Dieser Wert ist ebenfalls mit dem ermittelten Ergebnis von 31 % von Bromfield et al. (2003) qualitativ vergleichbar.

Da es *in vitro* schwierig ist PrEC-Zellen zu kultivieren und Koloniewachstum zu bekommen, müsste die Wirkung des Natriumselenits eigentlich in Tierversuchen untersucht werden, um eine Aussage zur Zelltötung machen zu können.

Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass dies womöglich ein Artefakt ist aufgrund suboptimaler Kulturbedingungen der Zellen.

Sun Y et al. (2010) untersuchten zusätzlich den Effekt von Parthenolid auf PC3-Zellen. Laut diesen Erkenntnissen führt Parthenolid in PC3-Zellen zu einer Strahlensensibilisierung und dadurch zum vermehrten Absterben der Krebszellen nach Gammabestrahlung. Der Einfluss einer kombinierten Natriumselenitbehandlung und Bestrahlung auf PC3 im klonogenen Überleben wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht näher untersucht. Jedoch bestätigte Virsik-Köpp et al. (persönliche Mitteilung) ebenfalls für DU-145, dass eine zusätzliche 20 μM Natriumselenit-Behandlung für eine Röntgenbestrahlung sensibilisiert und signifikant das klonogene Überleben der DU-145 Zellen vermindert (Daten gezeigt). Es kann folglich angenommen werden, dass ein erhöhter oxidativer Stress, der entweder durch Natriumselenit oder durch Parthenolid induziert wird, gegen eine anschließende Bestrahlung sensibilisiert und dadurch das klonogene Überleben der malignen Zelllinien vermindert.

Die unten aufgeführte Abbildung zeigt das klonogene Überleben der drei untersuchten Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) und setzt sie in einen direkten Vergleich miteinander.

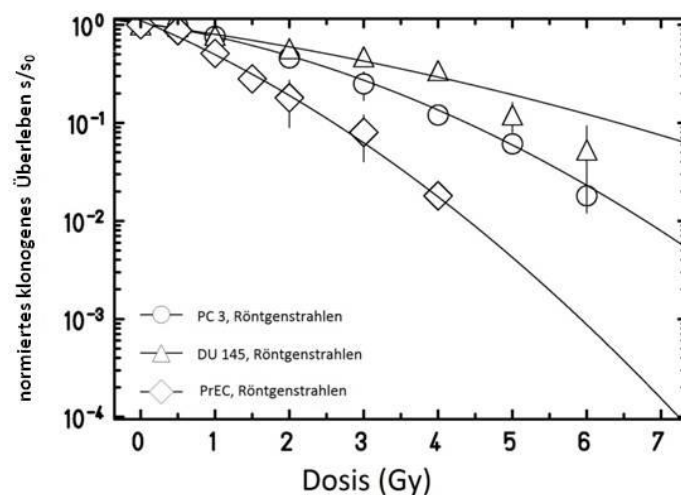


Abbildung 4-3: Klonogenes Überleben der PrEC, DU-145 und PC3:

Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der PrEC, PC3 und DU-145-Zellen, in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Konfluent gewachsene Zellmonolayer wurden mit Dosen bis 6 Gy bestrahlt. Das relative klonogene Überleben S/S_0 ist halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Dosis aufgetragen. Einzelne Punkte sind Mittelwerte aus sechs wiederholten Messungen. Die Kurven wurden entsprechend der Gleichung $\log(S/S_0) = -(\alpha D + \beta D^2)$ angepasst. Vertikale Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Wie bereits angesprochen, sterben PrEC zwar im Überleben; dies ist aber weder durch Apoptose noch durch Seneszenz begründbar. Bromfield et al. (2003) ermittelten ebenfalls, dass PrEC im Koloniebildungsassay sensitiver auf Bestrahlung reagierten als das Ausmaß der strahleninduzierten Apoptose vermuten lässt. Das Ausmaß der Apoptose korreliert nicht mit dem Ausmaß des klonogenen Überlebens. Natriumselenit verhindert in PrEC somit die Proliferation und das Wachstum der Zellen durch einen noch unklaren Mechanismus.

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit vergleicht die Effektivität der konventionellen Röntgenbestrahlung mit der N-Ionenbestrahlung bezüglich des klonogenen Überlebens von PrEC. Ionenbestrahlung und hierbei vor allem die Schwerionenbestrahlung bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Röntgenstrahlung. Kraft et al. (1999) zeigten, dass die Schwerionenbestrahlung eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW, relative biological effectiveness, RBE) erzielt, was der Hauptgrund für die Verwendung in der Radiotherapie ist. Die RBW bei einem Überleben von 37 % lag in den vorliegenden Studien bei 2,1. Dieser Wert stimmt mit den Daten von Sugahara und Kamada (2009) überein, welche in Tumorzellen von einem RBW von 2-3 bei Kohlenstoff-Ionen berichten. Folglich ist die doppelte Strahlendosis der Röntgenstrahlung nötig, um die gleichen biologischen Effekte in PrEC zu erzielen wie mit der Ionenbestrahlung.

Die erhöhte Wirksamkeit der (N-)Ionenbestrahlung konnte bei normalen PrEC somit auch in dieser Studie gezeigt werden. Die günstige Tiefendosis-Verteilung bei der Ionentherapie führt aber dazu, dass Normalgewebe sehr geschont wird (Okada et al. 2010) und deshalb die zelltötende Wirkung einer Ionenbestrahlung im normalen Gewebe eher unbedeutend ist. Studien in Japan haben gezeigt, dass diese Therapie-Option auf jeden Fall für die Behandlung

von lokal begrenzten Prostatakarzinomen und insbesondere im lokal fortgeschrittenen Stadium geeignet ist (Shimazaki et al. 2010). Da Prostatakarzinomzellen gegen Röntgenstrahlung-Therapie häufig resistent sind und durch hohe Ausfallraten von bis zu 40 % gekennzeichnet sind (Udayakumar et al. 2011), kann die Ionenstrahlung besonders in diesen Fällen wirkungsvoll eingesetzt werden und stellt damit eine erfolgversprechende Therapiealternative dar.

5. Zusammenfassung

Neben der primären Operation stellt die externe Strahlentherapie einen gleichwertigen Ansatz in der kurativen Therapie des Prostatakarzinoms dar, jedoch mit unterschiedlichem Nebenwirkungsspektrum. Durch Röntgenstrahlen kommt es zu einer direkten Schädigung der Zielzelle durch Doppelstrangbrüche und zu einer indirekten Schädigung durch die Bildung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS). Kann die Zelle den entstandenen DNA-Schaden nicht reparieren, kommt es zum Zelltod. Dies kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Anteil die Apoptose, die vorzeitige Seneszenz oder andere Mechanismen am Zelltod nach einer Bestrahlung einnehmen und inwiefern verschiedene Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) unterschiedliche Kaskaden initiieren. Ein weiterer Teil dieser Arbeit erörtert, inwiefern eine Natriumselenit-Supplementation den oxidativen Stress in der Zielzelle erhöht und dadurch vermehrt den Tod der Zelle induziert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit führten Natriumselenit und eine kombinierte Natriumselenit-Vorbehandlung und anschließende Bestrahlung zwar zu einem stark verminderten klonogenen Überleben der PrEC, diese Ergebnisse sind aber im Kontext der suboptimalen Kulturbedingungen nicht direkt auf Patienten übertragbar. PrEC erwiesen sich in Bezug auf die Strahlen- und Selenit-induzierte Apoptose als relativ resistent. Um neben dem morphologischen Assay eine weitere Bestätigung der Apoptose-Ergebnisse zu erhalten, wurde die Aktivität der Caspase 3 in PrEC gemessen. Der Caspase-3-Aktivitäts-Assay bestätigte demnach den fehlenden Effekt von Selenit auf die Induktion der Apoptose in PrEC. Bezüglich der Therapie-induzierten Seneszenz (TIS) bewirkte weder eine Bestrahlung bis 4 Gy noch eine Natriumselenit-Vorbehandlung noch die Kombination aus beidem signifikante Effekte in PrEC. In DU-145-Zellen und in PC3-Zellen induzierte sowohl die Bestrahlung von 4 Gy (nach 24h) als auch 6 Gy (nach 48h) eine signifikant höhere Seneszenzrate im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Dieser Effekt war aber sehr klein und wurde durch eine Natriumselenit-Vorbehandlung verhindert. Trotz allem deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass die TIS eine neue Möglichkeit repräsentiert, welche die Tumorthherapie in Zukunft verbessern kann, da Tumorzellen vermehrt absterben, wohingegen gesunde PrEC resistent sind.

Da weder eine Röntgenbestrahlung noch ein erhöhter oxidativer Stress (durch Natriumselenit) in PrEC zu vermehrter Apoptose oder Seneszenz führten, galt zu klären, wie sich die unterschiedlichen Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) zu schützen vermögen. Da Antioxidanzien in der Lage sind, ROS, die nach einer Bestrahlung entstehen, zu neutralisieren, untersuchten wir zwei wichtige Stellvertreter dieser Gruppe: GSH und Gesamt-SOD.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass normale Zellen größere Mengen an SOD besitzen als Krebszellen. Diese erhöhte SOD-Expression spielt eine bedeutende Rolle in der Neutralisation von Superoxidradikalen, welche beim Selenit-Metabolismus erzeugt werden. Gesunde Zellen, wie die PrEC, schützen sich dadurch besser vor dem Selenit-induzierten Zelltod. Maligne Zelllinien besitzen geringere Mengen an Antioxidanzien. Wir belegten dies für die Expression von SOD in DU-145 sowie für GSH in PC3. Inwieweit dies zum selektiven Absterben von Tumorzellen durch Selenit beiträgt (Xiang et al. 2009), bleibt weiter zu erörtern.

Da eine vielversprechende Therapie-Option beim Prostatakarzinom die Schwerionen-Therapie darstellt, beschäftigte sich ein weiterer Teil dieser Arbeit mit dem Vergleich der Überlebensraten nach der konventionellen Röntgenbestrahlung und der N-Ionen-Bestrahlung. Schwere Ionen vermindern in PrEC das klonogene Überleben stärker als Röntgenstrahlen. Dieser Effekt ist jedoch aufgrund der günstigen Ionen-Dosisverteilung sehr klein (sehr niedrige Dosis im Normalgewebe versus hohe Dosis im Tumor), so dass keine Nachteile bei der Therapie mit schweren Ionen angenommen werden müssen. Weiterführende experimentelle und klinische Versuche sollten über diesen Sachverhalt zukünftig mehr Aufschluss geben.

Im Hinblick auf eine mögliche Therapie mit Selenit sind diese Resultate als günstig anzusehen, da Selenit bei supraphysiologischen Dosen selektiv Tumorzellen abtötet, wohingegen sich normale Zellen noch wirkungsvoll schützen können.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1-1: Altersspezifische Erkrankungsdaten für 1980, 1990 und 2006	1
Abb. 1-2: Vergleich Röntgenstrahlung und Ionenstrahlung	4
Abb. 1-3: Ursachen von DNA-Schäden und deren Folgen	7
Abb. 1-4: Schematische Darstellung einer Reihe von Faktoren, welche zur Einleitung der vorzeitigen Seneszenz führen	9
Abb. 1-5: Oxidation von GSH	11
Abb. 2-1: Lumineszenzreaktion	22
Abb. 2-2: Recycling von GSH	27
Abb. 3-1: Apoptose-Index in PrEC nach Röntgenbestrahlung	35
Abb. 3-2: Caspase-3-Aktivität in PrEC, 6h Messung	38
Abb. 3-3: Caspase-3-Aktivität in PrEC, 24h Messung	39
Abb. 3-4: GSH-Messungen an drei Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) mit und ohne Natriumselenit	43
Abb. 3-5: SOD-Messungen an drei Zelllinien (PrEC, DU-145, PC3) mit und ohne Natriumselenit	44
Abb. 3-6: Seneszenz in PrEC-Zellen	46
Abb. 3-7: Seneszenz in DU-145-Zellen	48
Abb. 3-8: Seneszenz in PC3-Zellen	49
Abb. 3-9: klonogenes Überleben der PrEC nach Röntgen- und N-Ionen-Bestrahlung	51
Abb. 3-10: klonogenes Überleben der PrEC nach Röntgenbestrahlung mit und ohne Natriumselenit	52
Abb. 4-1: Apoptose in DU-145 und PC3 nach 24h bis 72h	58
Abb. 4-2 Seneszenz in PrEC 24h-96h nach Röntgenbestrahlung und Natriumselenit- Vorbehandlung	63
Abb.4-3 Klonogenes Überleben der PrEC, DU-145 und PC3	69
	74

6.2 Tabellenverzeichnis:

Tab. 2-1: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay, ohne Natriumselenit-Vorbehandlung nach Röntgenbestrahlung	31
Tab. 2-2: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay, ohne Natriumselenit-Vorbehandlung nach N-Ionen-Bestrahlung	31
Tab. 2-3: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay nach 6-stündiger Natriumselenit-Vorbehandlung nach Röntgenbestrahlung	31
Tab. 2-4: Anzahl der Prostataepithelzellen pro Flasche beim Koloniebildungsassay nach 6-stündiger Natriumselenit-Vorbehandlung nach N-Ionen-Bestrahlung	32
Tab. 3-1: Vergleich Tunel-Assay und morphologischer Assay	41

7. Literaturverzeichnis

Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegmans A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK (2010):
Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment
outcomes. *Oncogene*; 29(46):6085-98

Athar M, Chaudhury NK, Hussain ME, Varshney R (2011):
Hoechst 33342 induced reactive oxygen species and impaired expression of cytochrome c
oxidase subunit 1 leading to cell death in irradiated human cancer cells. *Mol Cell Biochem*;
352(1-2):281-92

Baker AM, Oberley LW, Cohen MB (1997):
Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate*; 32(4):229-
33

Barzilai A, Rotmann G, Shiloh Y (2002):
ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage.
DNA Repair; 1(1):3-25

Bhosle SM, Ahire VR, Henry MS, Thakur VS, Huilgol NG, Mishra KP (2010):
Augmentation of radiation-induced apoptosis by ellagic acid. *Cancer Invest*; 28(3):323-30

Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, Oberley LW, Yan T, Zhong
W, Jiang X et al. (2000):
Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic
intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*; 89(1):123-34

Bredesen DE (2000):
Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J Neurotrauma*; 17(10):801-10

Bromfield GP, Meng A, Warde P, Bristow RG (2003):
Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill.
Prostate Cancer Prostatic Dis; 6(1):73-85

Brozmanová J, Mániková D, Vlčková V, Chovanec M (2010):

Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch toxicol*; 84(12):919-38

Carlini F, Ridolfi B, Molinari A, Parisi C, Bozzuto G, Toccaceli L, Formisano G, De Orsi D, Paradisi S, Grober OM et al. (2010):

The Reverse Transcription Inhibitor Abacavir Shows Anticancer Activity in Prostate Cancer Cell Lines. *PLoS One*; 5(12): e14221

Caruso R, Fedele F, Lucianò R, Branca G, Parisi C, Paparo D, Parisi A (2011):

Mitotic catastrophe in malignant epithelial tumors: the pathologist's viewpoint. *Ultrastruct Pathol*; 35(2):66-71

Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, Lettéron P, Feldmann G, El-Benna J, Fromenty B et al. (2007):

High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol*; 46(5):858-68

Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P (1994):

The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect*; 102(Suppl 10):123-130

Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB (1999 a):

A senescent-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res*; 59(15):3761-3767

Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, Roninson IB: (1999 b):

Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*; 18(34):4808-4818

Chen D, Cao J, Tian L, Liu F, Sheng X (2011):

Induction of apoptosis by Casticin in cervical cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial signaling pathways. *Oncol Rep*; 26(5):1287-94

Chen XJ, Duan FD, Zhang HH, Xiong Y, Wang J (2012):
Sodium Selenite-Induced Apoptosis Mediated by ROS Attack in Human Osteosarcoma U2OS Cells. *Biol Trace Elem Res*; 145(1):1-9

Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009):
Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*; 16(7):1040-1052

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M et al. (2005):
Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*; 436(7051):642

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008):
Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*; 6(12):2853-68

Cox JD, Kline RW (1983):
Do prostatic biopsies 12 months or more after external irradiation for adenocarcinoma, Stage III, predict long-term survival? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 9(3):299-303

Desai AA, Stadler WM (2006):
Novel kinase inhibitors in renal cell carcinoma: progressive development of static agents. *Curr Urol Rep*; 7(1):16-22

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

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O et al. (1995):
A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92(20):9363-9367

Donkena KV, Young C, Tindall D (2010):
Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer. *Obstet Gynecol Int*; 2010:302051

Edick MJ, Tesfay L, Lamb LE, Knudsen BS, Miranti CK (2007):
Inhibition of Integrin-mediated Crosstalk with Epidermal Growth Factor Receptor/Erk or Src Signaling Pathways in Autophagic Prostate Epithelial Cells Induces Caspase-independent Death. *Mol Biol Cell*; 18(7):2481-2490

Eldadah BA, Faden AI (2000):
Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma*; 17(10):811-29

Eriksson D, Stigbrand T (2010):
Radiation-induced cell death mechanismus. *Tumour Biol*; 31(4):363-72

Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF (2010):
Therapy-Induced Senescence in Cancer. *J Natl Cancer Inst*; 102(20):1536-46

Fang J, Sawa T, Akaike T, Maeda H (2002):
Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res*; 62(11):3138-3143

Fang J, Nakamura H, Iyer AK (2007):
Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target*; 15(7-8):475-86

Ferrin G, Linares CI, Muntané J (2011):
Mitochondrial Drug Target in Cell Death and Cancer. *Curr Pharm Des*; 17(20):2002-16

Franco R, Cidlowski JA (2009):
Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*; 16(10):1303-14

Friesen C, Kiess Y, Debatin KM (2004):
A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ*; 11(Suppl 1):73-85

Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV (2002):
The role of IKK in consticutive activation of Nf-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci*; 115(Pt 1): 145-151

Green D, Reed J (1998):
Mitochondria and apoptosis. *Sci*; 281(5381):1309-1312

Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze-Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, Lena AM, Candi E, Terrinoni A, Catani MV et al. (2005):

TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J*; 24(13):2458-71

Guo X, Mills AA (2007):

P63, cellular senescence and tumor development. *Cell Cycle*; 6(3):305-311

Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth BM (2010):

German cancer statistics 2004. *BMC Cancer*; 10:52

Hada M, Georgakilas A (2008):

Formation of clustered DNA after high LET Irradiation: A Review. *J Radiat Res*; 49(3):203-210

Hamada N, Imaoka T, Masunaga S, Ogata T, Okayasu R, Takahashi A, Kato TA, Kobayashi Y, Ohnishi T, Ono K, Shimada Y, Teshima T (2010):

Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy. *J Radiat Res*; 51(4):365-83

Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K, Amino N (2002):

Decreased expression of glutathione peroxidase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Cancer Lett*; 182(1):69-74

Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK (2011):

Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci*; 12(10):7114-62

Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W (2000):

Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*; 407(6802):390-5

Husbeck B, Peehl DM, Knox SJ (2005):

Redox modulation of human prostate carcinoma cells by selenite increases radiation-induced cell killing. *Free Radic Biol Med*; 38(1):50-7

Husbeck B, Nonn L, Peehl D, Knox S-J (2006):

Tumor-Selective Killing by Selenite in Patient-Matched Pairs of Normal and Malignant Prostate Cells. *Prostate*; 66(2):218-25

Igney FH, Krammer PH (2002):

Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*; 2(4):277-88

Irwin MS, Kaelin WG (2001):

P53 family update:p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ*; 12(7):337-49

Jost CA, Martin MC, Kaelin WG Jr (1997):

P73 is a simian (correction of human) p53-related protein, that can induce apoptosis.

Nature; 389(6647):191-4

Kalen AL, Sarsour EH, Venkataraman S, Goswami PC (2006):

Mn-superoxide dismutase overexpression enhances G2 accumulation and radioresistance in human oral squamous carcinoma cells. *Antioxid Redox Signal*; 8(7-8):1273-81

Kerr JF, Wyllie AH, Currire AR (1972):

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer; 26(4): 239-257

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994):

Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*; 73(8):2013-26.

Ketola K, Vainio P, Kallioniemi O, Iljin K (2011):

Monensin is a Potent Inducer of Oxidative Stress and Inhibitor of Androgen Signalling Leading to Apoptosis in Prostate Cancer Cells: *Mol Cancer Ther*; 9(12):3175-85

Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK (2009):

Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett*; 282(2):125-136

Kim EH, Sohn S, Kwon HJ, Kim Su, Kim MJ, Lee SJ, Choi KS (2007):

Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res*; 67:6314-6324

Kraft G, Scholz M, Bechthold U (1999):

Tumor therapy and track structure. *Radiat Environ Biophys*; 38(4):229-37

Krebs in Deutschland 2005/2006.

Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft

der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin 2010

Kück U:

Praktikum der Molekulargenetik. Springer Verlag Berlin 2005, S. 324

Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK (2008):

Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*; 68(6):1777–1785

Lehmann BD, McCubrey JA, Jefferson HS, Paine MS, Chappell WH, Terrian DM (2007):

A Dominant Role for p53-Dependent Cellular Senescence in Radiosensitization of Human Prostate Cancer Cells. *Cell Cycle*; 6(5):595-605

Mániková D, Vlášková D, Lodušová J, Letavayová L, Vigašová D, Krascenitsová E, Vlčková V, Brozmanová J, Chovanec M (2010):

Investigations on the role of base excision repair and non-homologous end-joining pathways in sodium selenite-induced toxicity and mutagenicity in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mutagenesis; 25(2):155-162

Marech I, Vacca A, Ranieri G, Gnoni A, Dammacco F (2012):

Novel strategies in the treatment of castration-resistant prostate cancer (Review). *Int J Oncol*; 40(5):1313-20

Martin L, Schilder RJ (2006):

Novel non-cytotoxic therapy in ovarian cancer: current status and future prospects. *J Natl Compr Canc Netw*; 4(9):955-966

Menter D, Sabichi A, Lippmann S (2000):

Selenium Effects on Prostate Cell Growth. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 9(11):1171-1182

Muller M (2009):

Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal*; 11(1):59-98

Nishikawa M (2008):

Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett*; 266(1):53-9

Nowsheen S, Wukovich RL, Aziz K, Kalogerinis PT, Richardson CC, Panayiotidis MI, Bonner WM, Sedelnikova OA, Georgakilas AG (2009):

Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues. *Mutat Res*; 674(1-2):131-6

Oberley LW, Beuttner GR (1979):

Role of superoxide dismutase in cancer: a Review. *Cancer Res*; 39(4):1141-1149

Okada T, Kamada T, Tsuji H, Mizoe J, Baba M, Kato S, Yamada S, Sugahara S, Yasuda S, Yamamoto N et al. (2010):

Carbon Ion Radiotherapy: Clinical Experiences at National Institute of Radiological Science (NIRS). *J Radiat Res*; 51(4):355-364

Powolny AA, Singh AV (2010):

Differential Response of Normal (PrEC) and Cancerous Human Prostate Cells (PC-3) to Phenethyl Isothiocyanate-Mediated Changes in Expression of Antioxidant Defense Genes. *Pharm Res*; 27(12):2766-2775

Qi Y, Schoene N, Lartey F, Cheng W (2010):

Selenium Compounds Activate ATM- dependent DNA Damage Response via the Mismatch Repair Protein hMLA1 in Colorectal Cancer Cells; *Journal of Biological Chemistry*; 285(43):33010-7

Ranawat P, Bansal MP (2008):

Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: possible involvement of p38 and JNK MAPKs-in vitro studies. *Mol Cell Biochem*; 309(1-2):21-32

Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG (2002):

Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J*; 366(Pt 1):45-55

Roninson IB (2003):

Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res*; 63(11):2705-2715

Ruth AC, Roninson IB (2000):

Effects of the multidrug transporter p-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res*; 60(10):2576-8

Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H (1992):

Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol*; 12(6):2525-33

Sawa T, Wu J, Akaike T, Maeda H (2000):

Tumor-targeting chemotherapy by a xanthine oxidase-polymer conjugate that generates oxygen-free radicals in tumor tissue. *Cancer Res*; 60(3):666-71

Schlemmer HP (2008):

Prostate carcinoma. *Radiologe*; 48(1):45-51

Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrad DF (2005):

The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia*; 7(9):816-823

Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM (2010):

Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*; 704(1-3):152-9

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997):

DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM 2. *Cell*; 91(3):325-334

Shimazaki J, Tsuji H, Ishikawa H, Okada T, Akakura K, Suzuki H, Harada M, Tsujii H (2010):

Carbon ion radiotherapy for treatment of prostate cancer and subsequent outcomes after biochemical failure. *Anticancer Res*; 30(12):5105-11

Soussi T, Lozano G (2005):

P53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*; 331(3):834-42

Sugahara S, Kamada T (2009):

Present status of carbon ion radiotherapy for malignant tumors. *Gan To Kagaku Ryoho*; 36(11):1795-800

Sun J, Chen Y, Li M, Ge Z (1998):

Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radic Biol Med*; 24(4):586-93

Sun Y, Clair DK, Xu Y, Crooks PA, Clair WH (2010):

A NADPH Oxidase-Dependent Redox Signaling Pathway Mediates the Selective Radiosensitization Effects of Parthenolide in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*; 70(7):2880-90

Szatrowski TP, Nathan CF (1991):

Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*; 51(3):794-8

Takahashi T, Mitsuhashi N, Furtura M Hasegawa M, Ohno T, Saito Y, Sakurai H, Nakano T, Niibe H (1998):

Apoptosis induced by heavy ion (carbon) irradiation of two human tumors with different radiosensitivities in vivo: relative biological effectiveness (RBE) of carbon beam. *Anticancer Res*; 18(1A):253-6

Tian J, Ning S, Knox SJ (2010):

Sodium selenite radiosensitizes hormonerefractory prostate cancer xenograft tumors but not intestinal crypt cells in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 78(1):230-6

Udayakumar TS, Stoyanova R, Hachem P, Ahmed MM, Pollack A (2011):

Adenovirus E2F1 overexpression sensitizes LNCaP and PC3 prostate tumor cells to radiation in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 79(2):549-58

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008):

Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*; 15(7):1153-62

Verheij M (2008):

Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer Metastasis Rev*; 27(3):471-480

Verheij M, Bartelink H (2000):

Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res*; 301(1):133-142

Verrax J, Pedrosa RC, Beck R, Dejeans N, Taper H, Calderon PB (2009):
In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. *Curr Med Chem*; 16(15):1821-30

Vizioli MG, Possik PA, Tarantino E, Meissl K, Borrello MG, Miranda C, Anania MC, Pagliardini S, Seregni E, Pierotti MA et al. (2011):
Evidence of oncogene-induced senescence in thyroid carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*; 18(6):743-757

Waters DJ, Shen S, Glickman LT, Cooley DM, Bostwick DG, Qian J, Combs JF, Morris JS (2005):
Prostate cancer risk and DNA damage: Translational significance of selenium supplementation in a canine model. *Carcinogenesis*; 26(7):1256-1262

Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG (2002):
Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone arthenolide. *J Biol Chem*; 277(41):38954-64

Xiang N, Zhao R, Zhong W (2009):
Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*; 63(2):351-362

Yamakawa N, Takahashi A, Mori E, Imai Y, Furusawa Y, Ohnishi K, Kirita T, Ohnishi T (2008):
High LET radiation enhances apoptosis in mutated p53 cancer cells through Caspase-9 activation. *Cancer Sci*; 99(7):1455-60

Yoshifumi M, Takehide A, Takashi K, Mayumi I, Takashi I, Takenori O (2004):
Effects of Carbon-Ion Beams on Human Pancreatic Cancer Cell Lines That Differ in Genetic Status. *Am J Clin Oncol*; 27(1):24-28

Zawacka-Pankau J, Kostecka A, Sznarkowska A, Hedström E, Kawiak A (2010):
P73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle*; 9(4):720-8

Zhao Y, Seefeldt T, Chen W, Carlson L, Stoebner A, Hanson S, Foll R, Matthees D, Palakurthi S, Guan X (2009):

Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X- ray irradiation. *Free Radic Biol Med*; 47(2):176-183

Zhong W, Oberley TD (2001):

Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Cancer Res*; 61(19):7071-7078

Zhu Z, Jiang W, Ganther HE, Thompson HJ (2002):

Mechanisms of cell cycle arrest by methylseleninic acid. *Cancer Res*; 62(1):156-164

Danksagung

Bei Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas bedanken, für ihre stetige Hilfsbereitschaft, ihre grenzenlose Geduld und Diskussionsfreudigkeit sowie für die vielen Ideen und Verbesserungsvorschläge bei der Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Anke Gregius für ihre tolle Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten und ihre vielen Erklärungen.

Lebenslauf:

Am 28.06.1986 wurde ich als Tochter der Einzelhandelskauffrau Karin Lächner, geb. Heißwolf, und des Groß- und Einzelhandelskaufmanns Friedrich Lächner in Crailsheim (Baden-Württemberg) geboren.

Von 1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule Kirchberg/Lendsiedel, anschließend erfolgte die weitere Schulbildung am naturwissenschaftlichen Gymnasium Schloss-Schule Kirchberg. Im Sommer 2005 legte ich dort mein Abitur ab.

Im WS 2006/07 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Rahmen des Studiums absolvierte ich im September 2008 erfolgreich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum).

Zum SS 2009 erhielt ich einen Vollstudienplatz und konnte mein Studium an der Georg-August-Universität Göttingen im klinischen Studienabschnitt weiterführen.

Zurzeit befinde ich mich im 10. klinischen Semester und werde im Februar 2012 mein praktisches Jahr im Universitätsspital Bern beginnen. Mein Studium werde ich voraussichtlich im WS 2012/13 mit dem Staatsexamen beenden.