

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

Funktionelle Analyse molekularer Mechanismen der strahleninduzierten Apoptose, die nicht über direkte DNA-Schäden vermittelt werden - Vorhaben 3607S04531

Auftragnehmer:

**Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
Institut für Strahlenbiologie**

M. Angermeier

S. Moertl

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-67/12

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de: 0221-201209289626

Salzgitter, September 2012

Schlussbericht
FuE Vorhaben 3607S04531 (StSch 4531)

Thema: Funktionelle Analyse molekularer Mechanismen der strahleninduzierten Apoptose, die nicht über direkte DNA-Schäden vermittelt werden

Laufzeit: 01.01.2008 bis 30.06.2011

Autoren: Dr. Marita Angermeier
Dr. Simone Moertl
Institut für Strahlenbiologie,
Helmholtz Zentrum München, Neuherberg

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzfassung	3
2	Kurzdarstellung des Vorhabens	5
2.1	Aufgabenstellung	5
2.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	5
2.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	6
1. Phase (01.01.2008 - 31.12.2008)		6
2. Phase (01.01.2009 – 31.12.2009)		7
3. Phase (01.01.2010 – 30.06.2011)		7
2.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	8
Wissenschaftliche Grundlagen		8
Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte		9
Angabe der verwendeten Fachliteratur		10
	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	11
3	Eingehende Darstellung	12
3.1	Erzielte Ergebnisse	12
3.1.1	Optimierungsphase	13
3.1.2	Apoptose im Modellsystem HeLa	13
3.1.3	ROS und Lipidperoxidation als DNA schadensunabhängige Apoptoseauslöser	18
3.1.4	Bedeutung von apoptose-relevanten Faktoren bei Etoposid-Behandlung	20
3.1.5	Das Modellsystem Scl II	22
3.1.6	Das Modellsystem Jurkat	25
3.1.7	Lipidperoxide als DNA Schadensunabhängige Apoptoseauslöser	28
3.2	Charakterisierung von Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien aus einem Patienten- und einem Kontroll-Kollektiv	31
3.2.1	Apoptose nach Bestrahlung	31
3.2.2	Apoptose nach Etoposid- bzw. Wasserstoffperoxid-Behandlung	33
3.2.3	Mechanistische Charakterisierung von strahleninduzierter Apoptose	37
3.2.4	Zusammenfassung	40
3.3	Netzwerk strahleninduzierter apoptotischer Prozesse	43
4	Erfolgte und geplante Veröffentlichungen	45
5	Anlagen	
5.1	Abbildungen: Strahlenabhängige Regulation apoptose-relevanter Proteine	
5.2	Erfolgskontrollbericht	

1 Kurzfassung

Die Wirkungen geringer Strahlenexpositionen stellen neue Anforderungen an den Strahlenschutz. Untersuchungen haben gezeigt, dass die individuelle Empfindlichkeit gegenüber der tumorigenen Wirkung ionisierender Strahlung beträchtlich variiert. Individuelle Variabilität in der Strahlensensibilität ist meist genetisch bedingt. So zeigen Patienten mit den chromosomalen Instabilitätssyndromen Ataxia telangiectasia (A-T), Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) und Bloom Syndrom (BS) eine starke Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen sowie ausgeprägte Immundefekte, und sie entwickeln überdurchschnittlich oft Leukämien und Lymphome. Dieser Zusammenhang zwischen Strahlenüberempfindlichkeit und erhöhter Tumorinzidenz, sowie das gehäufte Auftreten von erhöhter Strahlenempfindlichkeit bei der Behandlung genetisch nicht charakterisierter Tumorpatienten legt nahe, dass innerhalb der Bevölkerungsgruppe von Tumorpatienten genetische Disposition für Strahlenüberempfindlichkeit überrepräsentiert sein kann.

Erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit zeigt sich v.a. in der Störung zellulärer Reaktionen auf die ausgelösten Schäden, wie Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose. Apoptose dient als wichtiger genetisch determinierter Parameter für die individuelle Strahlensensitivität. Erhöhte Empfindlichkeit kann durch vermehrte Apoptose verursacht werden, Tumorresistenzen können durch erniedrigte Apoptose bedingt sein. Verbesserte Kenntnisse im Bereich der unterschiedlichen molekularen Mechanismen strahleninduzierter Apoptose sind damit sowohl für den Strahlenschutz als auch für eine optimale Strahlentherapie von großer Bedeutung.

Im vorliegenden Projekt wurde die Einleitung strahleninduzierter Apoptose mechanistisch untersucht. Da ionisierende Strahlung sowohl direkt DNA-Schäden induziert als auch reaktive Sauerstoffspezies generiert, lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Unterscheidung und Gewichtung von DNA-Schadens-vermittelter Apoptose und Apoptose, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht wird. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden etablierte Zellkulturmodelle und aus Patientenmaterial gewonnene EBV-immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien verwendet. Die Patienten-Zelllinien wurden im Rahmen einer Kooperation vom Institut für Epidemiologie (HMGU) und einem früheren BfS-geförderten Projekt (StSch4362) zur Verfügung gestellt. Sie stammen aus der LUCY (Lung Cancer in the Young)-Studie sowie aus dem Proben-Kollektiv der Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA). In diesen Zelllinien wurde die strahlen-induzierte Apoptose, die durch direkte Strahlenwirkung an der DNA und durch Wirkung von strahleninduzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursacht wird mit der Etoposid-induzierten ROS-unabhängigen Apoptose verglichen. Das Ausmaß der Apoptoseinduktion wurde mit der Apoptose des primären Ausgangsmaterials verglichen und

die Aktivierung von apoptose-relevanten Faktoren wurde mittels Protein-Expressionsarrays untersucht.

Die ausgewählten Linien zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Apoptoseinduktion und wurden in hoch, mittel und niedrig apoptotisch eingeteilt. Der Vergleich zwischen primären und immortalisierten Zellen zeigte, dass sich die beiden Zellsysteme deutlich voneinander unterscheiden und die EBV transformierten Zelllinien nur bedingt als Ersatz für primäre Zellen in mechanistischen Untersuchungen zur strahleninduzierten Apoptose geeignet sind. Die Analyse der Expression von Apoptose-relevanten Faktoren zeigte Veränderungen von Komponenten aus Schadens-vermittelten und aus ROS-induzierten Prozessen. Ein Vergleich der Proteinexpression zwischen hoch- und niedrig-apoptotischen Linien ergab eine veränderte Expression für die Proteine Bcl-2, FADD und XIAP.

Als etablierte Zellkulturmodelle zur Untersuchung von Apoptosemechanismen wurden Epithelzellen (Hela), Keratinozyten (Sc1 II) und die T-Zelllinie Jurkat eingesetzt. In diesen Zellsystemen wurden apoptose-relevante Faktoren mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Anschließend wurde der Einfluss der modulierten Proteine auf die Apoptose bestimmt. Überraschenderweise ergab ein Vergleich von strahleninduzierter Apoptose und etoposidinduzierter Apoptose eine in etwa gleiche Identifikation von Faktoren die das Apoptoseverhalten beeinflussen. Ein Vergleich zwischen den Linien ergab, dass nur Caspase-8 in allen drei Systemen einen einheitlichen Einfluss auf das Apoptoseverhalten hat. Dieses Ergebnis unterstreicht die zelltyp-spezifität von Apoptoseprozessen, gleichzeitig wird dadurch aber auch die Bedeutung von rezeptor-vermittelten Prozessen in der strahleninduzierten Apoptose hervorgehoben.

Im Rahmen der Analysen an HeLa Zellen wurde auch die strahleninduzierte Lipidperoxidation untersucht. Durch den Nachweis von Malondialdehyd gelang der transiente Nachweis von strahleninduzierten Lipidperoxiden in Zellysaten und Zellkulturüberständen. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen Grad der Apoptoseinduktion und Lipidperoxidkonzentration gefunden werden.

2 Kurzdarstellung des Vorhabens

2.1 Aufgabenstellung

Ziel des Projektes war die funktionelle Analyse verschiedener molekularer Mechanismen, die für die strahleninduzierte Apoptose verantwortlich sind. Es sollte zwischen direkter DNA-Schaden vermittelter Apoptose und Apoptose, die indirekt durch strahlengenerierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht wird unterschieden werden. Zum einen sollte in einem definierten und etablierten Zellsystem verschiedene molekulare Mechanismen untersucht werden, die durch direkte Strahlenwirkung an der DNA oder durch indirekte ROS-vermittelte Prozesse zu strahleninduzierter Apoptose führen. Dabei wurden Gene bzw. Genprodukte aus verschiedenen Apoptosemechanismen spezifisch herunterreguliert und deren Einfluss auf die Apoptose durch eine Analyse verschiedener Apoptoseendpunkte ermittelt. Aus den einzelnen Ergebnissen sollte ein Modell entwickelt werden, durch das der quantitative Anteil der ROS-vermittelten pro- und antiapoptotischen Prozesse ermittelt werden kann. Zum anderen sollte unterschiedliches Apoptoseverhalten in immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien aus der LUCY- (Lung Cancer in the Young) und KORA- (KOoperationsstudie im Raum Augsburg) Kohorte mechanistisch charakterisiert werden. Dazu sollten eventuelle Veränderungen an Proteinen der verschiedenen Apoptoseprozesse untersucht werden und ggf. auftretende Änderungen im Netzwerk apoptotischer Prozesse sollten dann ebenfalls in das zu erstellende Modell einfließen.

2.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In eigenen Vorarbeiten wurden in verschiedenen Systemen im Vorfeld strahleninduzierte Apoptosemechanismen untersucht. Dadurch konnten bereits Kenntnisse der rezeptorvermittelten Apoptose erworben werden. So wurde z.B. die Bedeutung des DNA-Reparaturproteins NBS1 für die Unterdrückung strahleninduzierter, ROS abhängiger Apoptose nachgewiesen (Sagan D, 2007). In einem durch das BfS geförderten Ringprojekt (StSch. 4467) wurden die primären Lymphozyten aus einem Kollektiv von bei der Strahlentherapie auffälligen und unauffälligen Tumorkranken bezüglich ihres Apoptoseverhaltens nach Bestrahlung untersucht und mit den von ihnen abgeleiteten EBV immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien verglichen. Diese Ergebnisse lieferten wichtige Basiskenntnisse für das gegenwärtige Projekt. In einem ebenfalls BfS-geförderten Vorläuferprojekt (StSch 4439) wurde die strahleninduzierte Apoptose in primären Lymphozyten der Patienten aus den LUCY- und KORA-Kollektiven quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Apoptoseverhalten der primären Lymphozyten individueller

Spender beträchtlich variiert. Zellen, die dabei auffällig hohe oder niedrige Apoptose zeigten, wurden zusammen mit einigen unauffälligen Proben im Institut für Epidemiologie am Helmholtz Zentrum München immortalisiert und standen für die Analyse der Netzwerke für Apoptosemechanismen zur Verfügung. Dazu wurde sowohl im Vorläufer- als auch im gegenwärtigen Projekt zunächst überprüft, ob das Apoptoseverhalten mit den Daten des primären Materials übereinstimmte.

Aufgrund der vielen Vorarbeiten standen nicht nur die entsprechenden Zelllinien aus Patientenmaterial und Zellkultur zur Verfügung, sondern auch eine hohe Expertise in Bezug auf die verschiedensten Testsysteme im Labor. Viele biochemische und molekularbiologische Methoden mussten nicht mehr etabliert werden und konnten sofort mit den vorhandenen technischen Kapazitäten durchgeführt werden. Für den Nachweis und die Quantifizierung von Apoptose standen so verschiedene Methoden zur Verfügung, aus denen die geeignetsten ausgewählt werden konnten. Eine wichtige Voraussetzung waren die gute Etablierung aller RNA-Interferenz Arbeiten, die einen Großteil des Projekts ausmachten.

2.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

1. Phase (01.01.2008 - 31.12.2008)

In der ersten Phase des Projektes wurde analysiert, inwieweit das apoptotische Verhalten der primären Lymphozyten aus dem Vorläuferprojekt (StSch. 4439) nach Bestrahlung in den immortalisierten Zelllinien der LUCY- und KORA-Kohorte verifiziert werden kann. Dazu wurde die strahleninduzierte Apoptose (10 Gy, ¹³⁷Cs-Quelle) in insgesamt 23 Zelllinien mittels Immundetektion der PARP1-Spaltung, durchflusszytometrischer Untersuchung der hypoploiden Zellpopulation und colorimetrischer Analyse der Caspase3-Aktivität ermittelt. Dabei konnte in den Zelllinien ein unterschiedliches Apoptoseverhalten nachgewiesen werden, das sich nicht immer mit dem Verhalten der primären Lymphozyten nach Bestrahlung deckte. Anschließend wurden Apoptosemechanismen anhand der Proteinexpression von 35 apoptoserelevanten Proteinen mit Proteinarrays der Fa. *R&D Systems* untersucht.

Des Weiteren wurde in dieser Phase die RNAi-Technologie für die Herunterregulation der Expression apoptoserelevanter Faktoren etabliert. Dazu wurden Protokolle zum Knockdown von 15 ausgewählten Faktoren (Apaf1, ASK, PTEN, Caspase8, Fas, FasL, TNFR1, TNF, TRAILR1, TRAILR2, ATM, TP53, AKT1, EGFR, IGF1R) in drei Zelllinien etabliert. Dies gelang mit unterschiedlichem Erfolg. Außerdem wurde in dieser Phase bereits begonnen, geeignete Marker zur Detektion der strahleninduzierten Apoptose für die gewählten Zelllinien zu finden.

2. Phase (01.01.2009 – 31.12.2009)

Die Etablierung der geeignetsten Apoptosemarker zur Analyse und Quantifizierung der Apoptosemechanismen wurde zu Beginn der zweiten Phase abgeschlossen und für jede Zelllinie (HeLa, ScIII und Jurkat) wurden drei verschiedene Apoptosemarker etabliert. Neben der Spaltung von PARP1, detektiert im Westernblot, und der Detektion der hypoploiden Zellpopulation (subG1) wurde die Aktivität der Effektor-Caspase3 als Apoptosemarker gewählt. Anschließend fand die Analyse der verschiedenen Faktoren statt. Die Ergebnisse zeigen, dass besonders die Herunterregulierung von Komponenten der rezeptorvermittelten Apoptose (Caspase-8, EGFR, IGF1R) die strahleninduzierte Apoptose verändert.

Zur Unterscheidung der Apoptoseauslöser „direkter DNA-Schäden“ und „ROS“ wurden beide Wege getrennt untersucht. Dazu wurde der doppelstrangbruchinduzierende Topoisomerase II-Hemmer Etoposid verwendet, der höchstwahrscheinlich nur DNA schadensvermittelte Apoptose auslöst. Für den Vergleich mit strahleninduzierter Apoptose, die durch DNA-Schaden und ROS vermittelt wird, wurde die Äquivalenzdosis von Etoposid, die einer Dosis von 10 Gy entspricht mittels Analyse von γ H2AX-Foci ermittelt. Anschließend wurde das Apoptoseverhalten in den vorher etablierten Systemen mit den ausgewählten Apoptosemarkern untersucht. Hierbei kann ebenfalls gezeigt werden, dass Komponenten der rezeptorvermittelten Apoptose die Induktion beeinflussen, wenn auch in geringerem Maße, was möglicherweise durch den fehlenden ROS vermittelten Anteil an der Apoptose erklärt werden kann.

In Phase zwei sollte ebenfalls die Rolle der ROS vermittelten Lipidperoxidation nach Bestrahlung untersucht werden. Aus zeitlichen Gründen und einer daraus resultierenden Umstrukturierung wurde dies aber in Phase drei verschoben.

3. Phase (01.01.2010 – 30.06.2011)

Hier stand die Analyse der apoptoserelevanten, ROS aktivierten Mechanismen im Vordergrund. ROS abhängige Mechanismen wurden durch H_2O_2 , einem sehr starken ROS-Erzeuger, direkt aktiviert und die daraus resultierende Apoptose untersucht. Zu Beginn wurde hierfür die intrazelluläre ROS-Produktion mittels Messung von DCF (Dichlorofluorescein) nach Bestrahlung, Etoposidbehandlung oder H_2O_2 -Zugabe detektiert. Dabei konnten die erwarteten deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Zunächst erfolgten die Untersuchungen in den lymphoblastoiden Zelllinien, in denen auch eine Untersuchung nach Etoposidbehandlung stattfand. Nach der Behandlung mit Etoposid konnte, wie auch im Modellsystem HeLa, eine niedrigere Apoptose als nach der dem DNA-Schaden äquivalenten Strahlendosis, detektiert werden. Eine H_2O_2 -Behandlung führte zu

einer höheren Apoptoseinduktion als Etoposid. Jedoch war die Reproduzierbarkeit der Resultate hier sehr schwierig. Die Lipidperoxidation ist ein weiterer Punkt der nun in Phase drei untersucht werden sollte. Zur Analyse von Lipidperoxidation wurde der *TBARS* Assay, mit dem Malondialdehyd, ein natürliches Produkt der Lipidperoxidation, nachgewiesen werden kann, etabliert.

Eine zusammenfassende Aussage wurde in Phase drei ebenfalls versucht, um v.a. auch die Bedeutung der untersuchten Mechanismen für die Apoptoseinduktion in den Patientenzelllinien zu beschreiben.

2.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Wissenschaftliche Grundlagen

Ionisierende Strahlung löst die Schädigung und/oder Zerstörung von Biomolekülen in der Zelle und somit neben Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur oft auch Zelltod, wenn die strahleninduzierten Schäden nicht mehr repariert werden können, über direkte und indirekte Effekte aus (Schmidt-Ullrich RK, 2000). Durch erzeugte energiereiche Partikel werden DNA-Komponenten zerstört (direkte Strahlenwirkung). Als Folge von Stress oder durch sekundäre Strahleneffekte können auch freie Radikale, sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen und Nukleinsäuren, Proteine und Lipide verändern, so dass weitere Signalwege induziert werden (indirekte, ROS vermittelte Strahlenwirkung) (Circu ML, 2010). Diese direkten und indirekten Schädigungen beeinflussen die Aktivierung von anti- und proapoptotischen Faktoren, wodurch Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder auch Apoptose ausgelöst wird (Wilson GD, 2004; Matsuoka S, 2007).

Apoptose ist ein genetisch determinierter Prozess, der über verschiedene Wege eingeleitet werden kann und über eine Kaskade von Reaktionen zum Absterben der Zelle führt. Die Induktion der Apoptose kann über den extrinsischen, rezeptorvermittelten und den intrinsischen, mitochondrialen Weg erfolgen (Ashkenazi A, 1999; Sheikh MS, 2000; Burz C, 2009). Eines der Schlüsselproteine bei der Aktivierung des intrinsischen Weges durch ROS und DNA-Schäden ist p53 (Vousden KH, 2002). Dieses induziert die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Unter anderem wird z.B. Cytochrom c freigesetzt, das zusammen mit dem „apoptotic protease-activating factor 1“ (Apaf1) das sog. Apoptosom bildet. Dieser Signalkomplex aktiviert die Initiatorcaspase-9, welche wiederum die Effektorcaspasen, wie Caspase-3, und damit die Einleitung der Apoptose induziert (Inoue S, 2009). Durch p53 kann auch der extrinsische Weg vermittelt werden, da es als Transkriptionsfaktor die Expression von Todesrezeptoren anregen kann. Klassischerweise wird der extrinsische Weg durch die Aggregation von Rezeptoren an der Zellmembran nach der Bindung ihrer spezifischen Liganden angeschaltet. Dies führt u.a. zur Aktivierung von Caspase-8, die wiederum Effektorcaspasen stimuliert. Zu den bekanntesten

Rezeptoren neben dem klassischen Fas-Rezeptor gehört die Familie der „tumour necrosis factor“ (TNFR1, TRAILR1, TRAILR2), die jeweils durch ihre spezifischen Liganden aktiviert werden (Guicciardi ME, 2009).

Durch die meisten Stimuli, die Apoptose auslösen, werden auch antiapoptotische Signaltransduktionskaskaden ausgelöst. Die Entscheidung, ob Apoptose eingeleitet wird, hängt von der Summe der pro- und antiapoptotischen Signale ab. Ziel des Projektes sollte die Analyse der Mechanismen sein, die eine wichtige Rolle für die „Entscheidungsfindung“ zur Einleitung der Apoptose nach Bestrahlung spielen. Dabei lag der Schwerpunkt auf einer Unterscheidung von direkten und indirekten Strahleneffekten bei der strahleninduzierten Apoptose,

Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte

Die Arbeitsgruppe verfügt über ein gut ausgestattetes Säugerzell-Labor und besitzt eine langjährige Expertise im Umgang mit Säugerzellkulturen. Ebenfalls sind mehrere voll ausgestattete molekularbiologische Labore vorhanden. Die genannten zellbiologischen und biochemisch-/molekularbiologischen Standardmethoden wurden vom Antragsteller und den Mitarbeitern/innen der Arbeitsgruppe beherrscht oder neu etabliert (Mörtl S, 2007a, Mörtl S, 2007b, Sagan D, 2007). Neben den Standardtechniken der Zellbiologie, Biochemie und Molekularbiologie waren folgende für das Projekt essentielle Methoden nahezu vollständig etabliert: Nachweis und Quantifizierung von Apoptose mit verschiedensten Ansätzen, Quantifizierung von ROS, RNA-Interferenz und Quantifizierung der Transkriptmengen per „real-time PCR“ und Methoden zur Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität. Die benötigte Strahlenquelle (^{137}Cs) am Helmholtzzentrum München ermöglichte die *in vitro*-Bestrahlung von Zellen. Durch die Verankerung im Forschungszentrum standen ebenso Großgeräte für molekular- und zellbiologische Techniken zur Verfügung (Durchflusszytometrie, Institut für Toxikologie; Laser-Scanning-Mikroskopie, Institut für Pathologie). Die Kooperation mit dem BfS Neuherberg ermöglichte eine automatische Quantifizierung der γH2AX -Aggregate. Des Weiteren standen die Zelllinien der KORA- und LUCY-Studie durch Zusammenarbeit mit dem Institut für Epidemiologie zur Verfügung.

Angabe der verwendeten Fachliteratur

- Ashkenazi, A., and V.M. Dixit. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 11:255-260.
- Burz, C., I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu, and A. Irimie. 2009. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol.* 48:811-821.
- Circu, M.L., and T.Y. Aw. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 48:749-762.
- Girdhani, S., S.M. Bhosle, S.A. Thulsidas, A. Kumar, and K.P. Mishra. 2005. Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *J Cancer Res Ther.* 1:129-131.
- Guicciardi, M.E., and G.J. Gores. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23:1625-1637.
- Inoue, S., G. Browne, G. Melino, and G.M. Cohen. 2009. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ.* 16:1053-1061.
- Liu, Q., X. He, Y. Liu, B. Du, X. Wang, W. Zhang, P. Jia, J. Dong, J. Ma, S. Li, and H. Zhang. 2008. NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 377:775-779.
- Mayer C, Popanda O, Greve B, Fritz E, Illig T, Eckardt-Schupp F, Gomolka M, Benner A, Schmezer P. A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Lett.* 2011 Mar 1;302(1):20-8.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 2007 May 25;316(5828):1160-6
- Mörtl, S. 2007. Downregulation von Genen durch RNA-Interferenz (RNAi). *Elsevier Spektrum Akademischer Verlag*
- Mörtl, S., M. Angermeier, and F. Eckardt-Schupp. 2007. Highly efficient transfection of a human epithelial cell line with chemically synthesized siRNA using siLentFect lipid reagent. *BioRad Technical Notes.* 5439
- Sagan, D., S. Mörtl, I. Müller, F. Eckardt-Schupp, and H. Eichholtz-Wirth. 2007. Enhanced CD95-mediated apoptosis contributes to radiation hypersensitivity of NBS lymphoblasts. *Apoptosis.* 12:753-767.
- Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res.* 2000 Mar;153(3):245-57.
- Sheikh, M.S., and A.J. Fornace, Jr. 2000. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia.* 14:1509-1513.
- Vousden, K.H., and X. Lu. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2:594-604.
- Wilson GD., Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Aug-Dec;23(3-4):209-25.

Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Helmholtzzentrum München, Institut für Toxikologie (FACS)

Helmholtzzentrum München, Institut für Pathologie (LSM)

Helmholtzzentrum München, Institut für Epidemiologie (Immortalisierung primärer Zellen)

BfS Neuherberg (automatische Quantifizierung von γ H2AX-Proteinaggregaten)

3 Eingehende Darstellung

3.1 Erzielte Ergebnisse

Zur systematischen Untersuchung der strahleninduzierten Apoptose wurde der Beitrag von 15 verschiedenen Apoptose-relevanten Proteinen untersucht. Bei der Auswahl der Faktoren wurden die wesentlichen derzeit bekannten Apoptosemechanismen berücksichtigt (Abbildung 1). Diese Faktoren wurden in unterschiedlichen etablierten Zellsystemen untersucht. Im Vordergrund stand hierbei die Unterscheidung zwischen direkter DNA-schadensvermittelter Apoptose und indirekt durch strahleninduzierte ROS vermittelter Apoptose. Zur Untersuchung der 15 ausgewählten Gene wurde die Expression der Genprodukte mittels chemisch synthetisierten siRNAs herunterreguliert und der Einfluss auf die Apoptose ermittelt. Die zu untersuchenden Faktoren wurden nach deren publizierten Einfluss auf die Apoptose ausgewählt. Neben den Todesrezeptor-assoziierten Proteinen TRAILR1, TRAILR2, TNFR1, TNF, FAS, FASL und Caspase-8 sollten auch das mitochondriale Protein Apaf1 und die Faktoren Ask1 und Pten auf ihren proapoptotischen Einfluß hin untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss der Rezeptoren EGFR und IGF1R und des Akt1 analysiert werden. Zusätzlich sollte auch der Einfluss von ATM und p53, als Masterproteine in der Strahlenantwort, ermittelt werden.

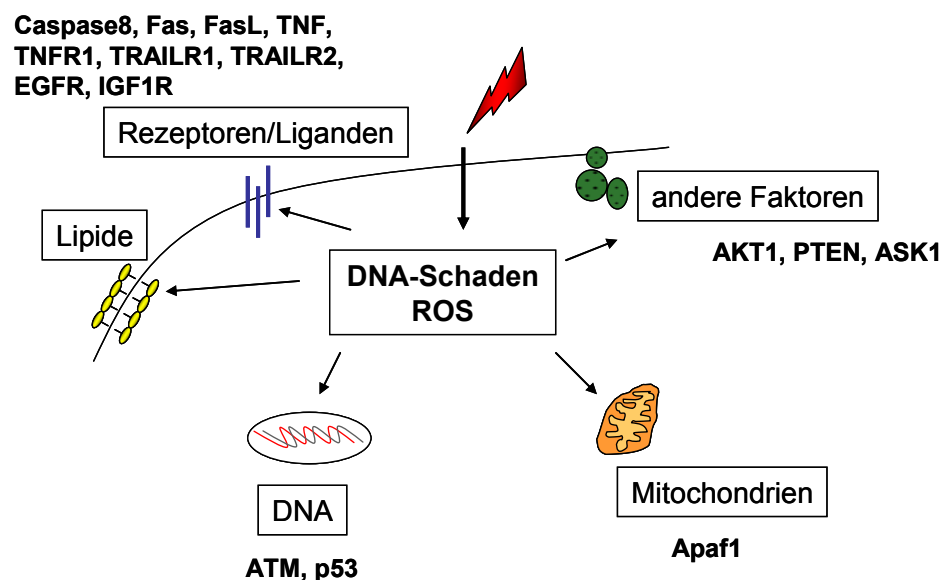


Abbildung 1: Darstellung der ausgewählten Faktoren zur Analyse der strahleninduzierten Apoptosemechanismen

3.1.1 Optimierungsphase

In der Optimierungsphase wurden die bestmögliche Methode zur Herunterregulierung der Zielgene und der zeitliche Verlauf der Herunterregulierung bestimmt. Hierin eingeschlossen war die Austestung verschiedener siRNA Oligonukleotide. „RNAiMax“ (Invitrogen) und „Dharmafect“ (Dharmacon) wurden als effiziente Reagenzien zur liposomen-basierten Transfektion für die adhärenenten Zelllinien HeLa und SclI gefunden. Eine Transfektion der Suspensionzelllinien Jurkat, TK6 und 721 wurde mittels Elektroporation mit dem *MikroPorator MP-100 (Peglabor)* versucht. Dabei zeigte nur die Linie Jurkat eine reproduzierbare Herunterregulierung und wurde im Weiteren verwendet. Eine maximale Herunterregulierung trat etwa 48h nach der Transfektion ein und hielt für weitere 72h an. Außerdem wurden für jede Zelllinie Assays zur Quantifizierung der Apoptose etabliert. Caspase-3 Aktivitäten wurden als früher Apoptosemarker 24h nach Bestrahlung gemessen. Als späte Marker wurden die hypodiploide Zellpopulation (subG1) und die PARP1-Spaltung 48h nach Bestrahlung herangezogen. In intakten Zellen liegen Caspasen inaktiv vor. Zur Initiierung von Apoptose erfolgt eine Kaskade zur Aktivierung von Caspasen. Daher wurde der Nachweis von aktiven Caspasen als Maß für die Apoptose herangezogen. Dies geschah durch Inkubation von Gesamtzellextrakten mit synthetischen Caspase-3 Substraten. Die Umsetzung des Substrates wurde durch Messung der Absorption verfolgt. Bei der Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion werden die Zellen mittel Propidiumiodid angefärbt und anschließend wurde eine Messung der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle im Durchflusszytometer durchgeführt. Auch die spezifische Proteolyse der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP1) in zwei stabile Fragmente durch Caspase-3 ist ein Charakteristikum für Apoptose. Der Nachweis der beiden Proteolyseprodukte erfolgte mittels Western Blot und immunhistochemischen Nachweis.

3.1.2 Apoptose im Modellsystem HeLa

Zunächst wurde das Modellsystem HeLa für die Analyse Apoptose-relevanter Faktoren eingesetzt. Diese Zellen verfügen trotz einer Mutation im p53 Gen über eine normale Strahlenantwort, was durch die Stabilisierung von p53 und durch die Induktion von p21 gezeigt wurde (Abb.2).

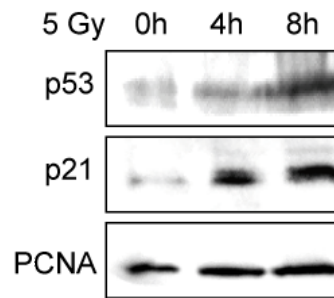


Abbildung 2: Induktion von p53 und p21 nach γ -Bestrahlung: HeLa-Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt und die Akkumulation von p53 und p21 nach 4h und 8h im Westernblot detektiert, PCNA diene als Beladungskontrolle.

Abb. 3 zeigt die Herunterregulierung der 15 ausgewählten Proteine im Westernblot in HeLa Zellen 72 h nach Transfektion mit siRNAs mit der dazugehörigen quantitativen Auswertung. Die quantitative Auswertung ergab, dass der Proteingehalt von Apaf1, ASK1, Caspase-8 und TRAILR2 nach der Herunterregulierung bei weniger als 20 % liegt. Nach Knockdown von PTEN, TNF, ATM, TP53, AKT1, EGFR und IGF1R sind weniger als 10% der Proteine in Vergleich zu den Zellen, die mit einer unspezifischen Kontroll -siRNA transfiziert wurden, nachweisbar. Für die Todesrezeptoren Fas, TNFR1 und TRAILR1 sowie für den Liganden FasL konnte, trotz der Austestung verschiedener siRNAs gegen die gleiche mRNA, kein ausreichender Knockdown erreicht werden. Diese Proteine wurden deshalb nicht weiter untersucht.

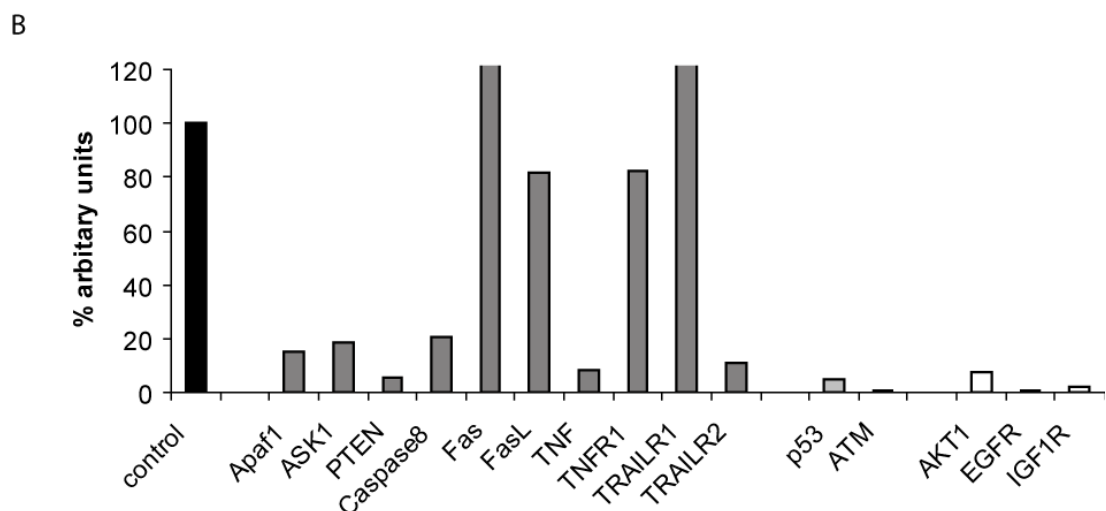
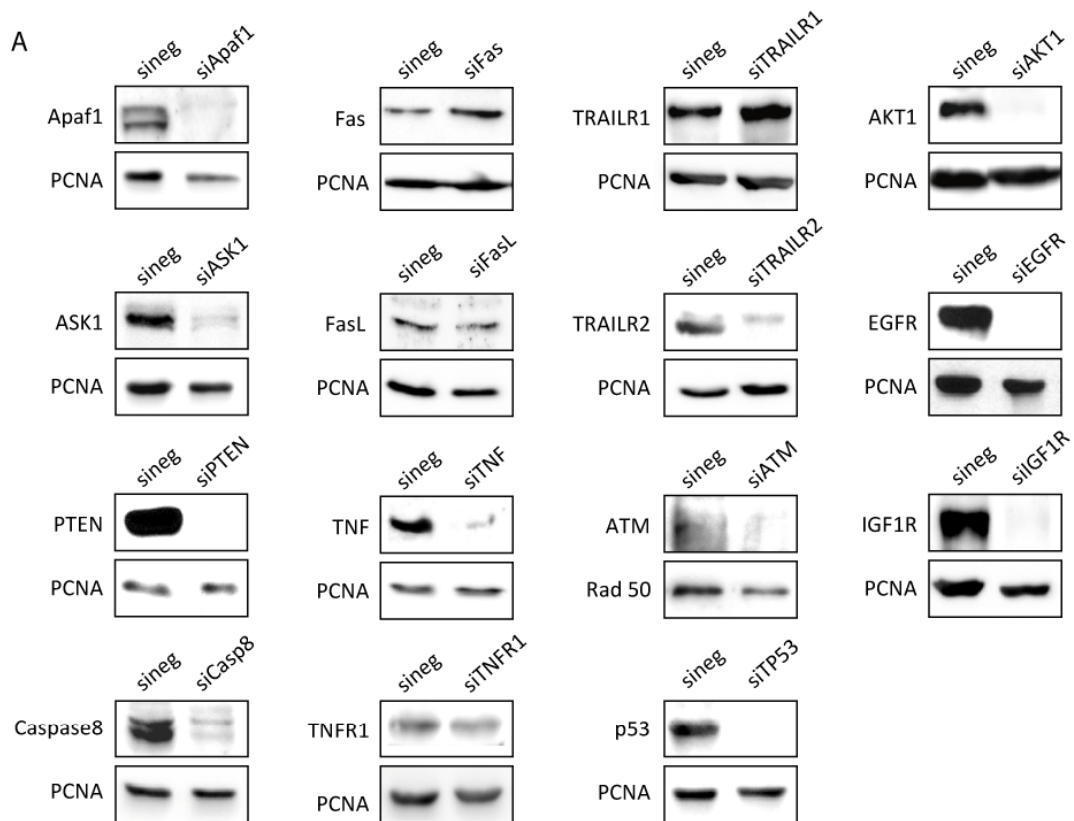


Abbildung.3: siRNA vermittelter Knockdown von Apoptose-relevanten Faktoren in Hela Zelle. (A) Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierungen wurde 72 h nach der Transfektion mittels Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle dienten mit *scrambled* (Mischung unspezifischer siRNAs) siRNA transfizierte Zellen. Als Beladungskontrolle diente PCNA oder RAD50. (B) Quantifizierung der Proteinmengen nach siRNA Transfektion.

Der Einfluss der herunterregulierten Faktoren auf die strahleninduzierte Apoptose wurde durch Messung der Caspase-3 Aktivität und durch Quantifizierung der SubG1 Population bestimmt. Außerdem wurde das klonogene Überleben der Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 2,5, 5 und 10 Gy bestrahlt und die entstandenen Kolonien wurden nach 10 Tagen

gezählt (Abb.4A). Viele der deregulierten Faktoren hatten keinen Einfluss auf das Überleben. Lediglich nach knockdown von EGFR1 zeigte sich eine reduzierte Überlebensfähigkeit. Eine geringe Auswirkung konnte auch nach der Herunterregulierung von TNF, Apaf1 und Caspase-8 festgestellt werden. TNF und Apaf1 depletierte Zellen zeigen ein geringeres Überleben, wogegen eine Reduzierung von Caspase-8 zu einem höheren Überleben nach Bestrahlung führt. Die Bestimmung der SubG1 Zellpopulation als Biomarker für Apoptose erfolgte durch Färbung mit Propidiumiodid und FACS Analyse (Abb.4B). Nach dem Knockdown von TP53, dem antiapoptotischen Faktor Akt1 und den Wachstumsfaktor Rezeptoren EGFR und IGFR1 war die SubG1 Fraktion nach Bestrahlung mit 10 Gy mindestens sechs-fach erhöht im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Auch die Depletierung von Ask1 führte zu einem signifikanten Anstieg der SubG1 Population, wogegen Apaf1 und Caspase-8 reduzierte Zellen eine Verminderung in der SubG1 Population zeigten. Eine verringerte Apoptose wurde auch nach Knockdown von ATM gemessen. Bei diesem Befund muss aber berücksichtigt werden, dass ATM depletierte Zellen bereits im unbehandelten Zustand eine sehr hohe Apoptose aufweisen. Dies wird auch durch die PARP1-Spaltung bestätigt. Als weiterer Apoptosemarker wurde 24 h nach Bestrahlung die Caspase-3 Aktivität bestimmt (ABB.4C). Dieser Assay bestätigte die Ergebnisse der SubG1 Messungen. Knockdown Zellen mit einem reduziertem SubG1 Gehalt zeigten auch wenig Caspase-3 Aktivität (e.g. Caspase-8). Dagegen zeigten Ask1, p53, Akt1, EGFR und IGFR1 Knockdown Zellen eine gesteigerte Caspase-3 Aktivität. Als dritter Apoptosemarker wurde die Spaltung von PARP1 mittels Western Blot untersucht (ABB.4D). Das Verhältnis von intaktem PARP1 zu geschnittenem PARP1 war in Ask1, DR5, p53, Akt1, EGFR und IGFR1 knockdown Zellen deutlich zu geschnittenen PARP1 hin verschoben, was erhöhte Apoptose anzeigt. Kaum eine Spaltung war in Caspase-8 knockdown Zellen zu detektieren. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse die große Bedeutung der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR1 und dem mechanistisch verbundenen Akt1 für die Unterdrückung der strahleninduzierten Apoptose. Andererseits zeigte auch die Modulation von Caspase-8 einen deutlichen Einfluss auf die Apoptose was die Bedeutung von Todesrezeptor-assoziierten Prozessen für die strahleninduzierte Apoptose unterstreicht.

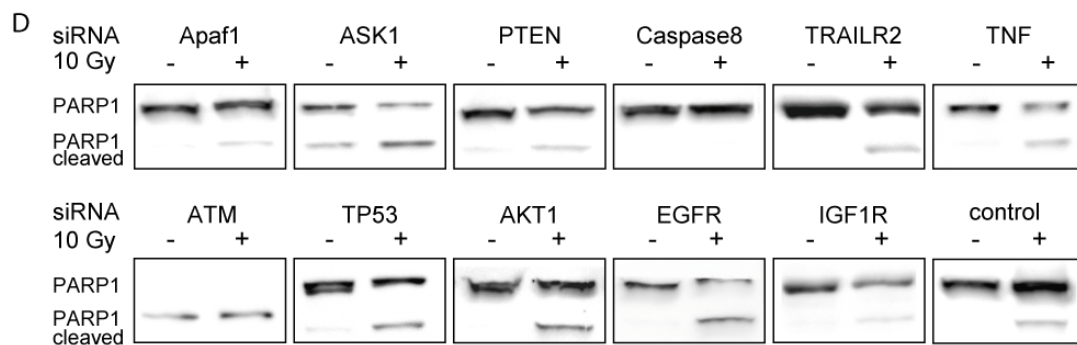
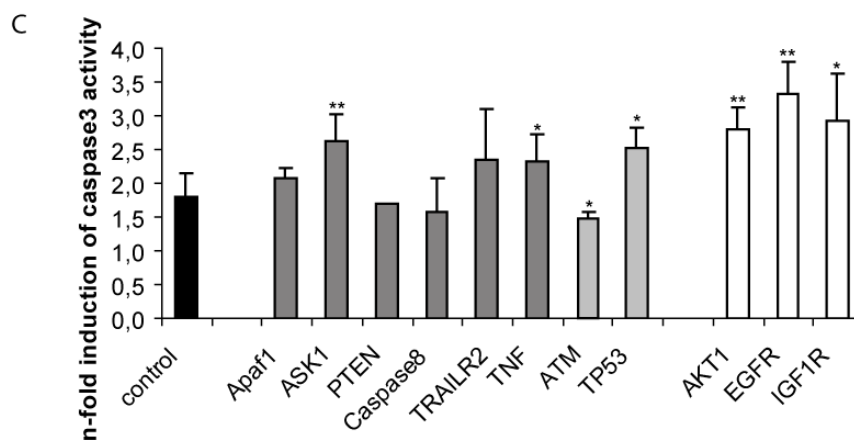
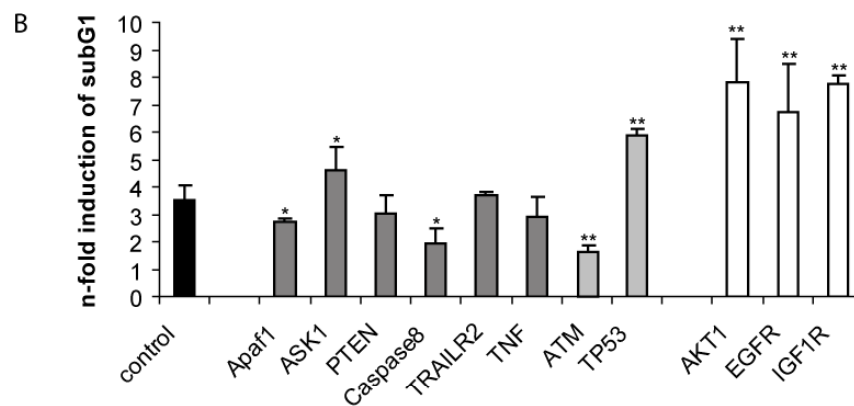
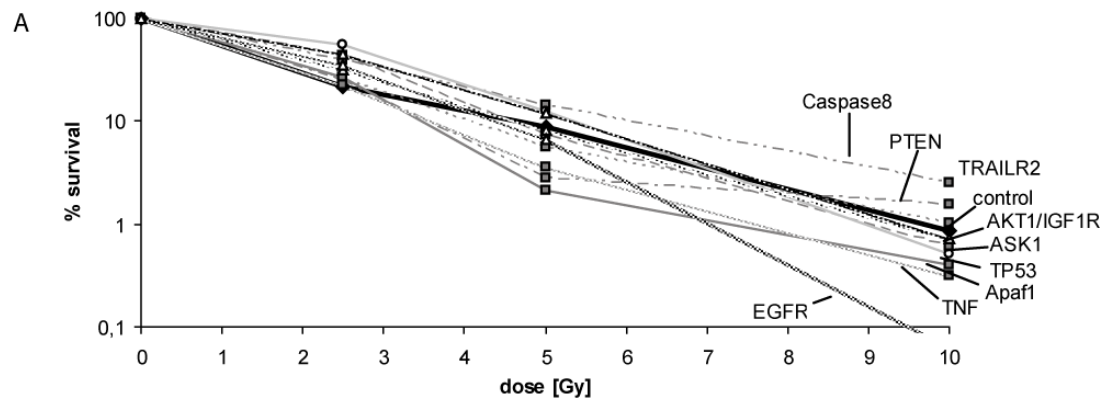
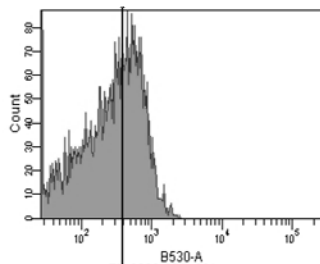


Abbildung 4: Überleben und strahleninduzierte Apoptose nach dem Knockdown Apoptose-relevanter Faktoren. (A) Klonogenes Überleben 10 d nach der Bestrahlung mit 2.5, 5 und 10 Gy. Es sind die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. (B) 48 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy wurde die Zellzyklusverteilung mit Propidiumiodidfärbung bestimmt und die Zellen in SubG1 wurden quantifiziert. Der n-fache Anstieg von Zellen in der SubG1 Phase nach Bestrahlung und spezifischen Knockdown relativ zu kontroll transfizierten Zellen ist dargestellt. Fehlerbalken zeigen die S.D. von drei unabhängigen Experimenten. (C) Vergleich der Caspase-3 Aktivität 24 h nach Bestrahlung in knockdown und kontroll-transfizierten Zellen. Die Mittelwerte aus der unabhängigen Experimenten $\pm$ S.D: sind dargestellt. (D) PARP1 Spaltung wurde mittels Western Blot 24 h nach Bestrahlung nachgewiesen.

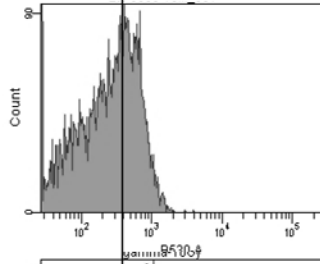
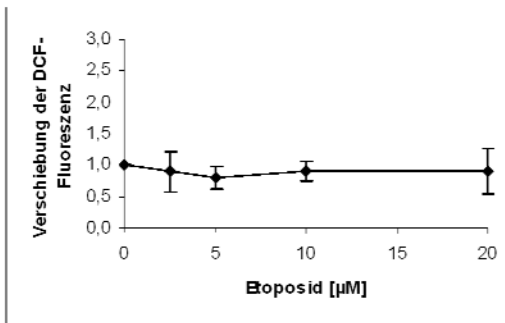
3.1.3 ROS und Lipidperoxidation als DNA schadensunabhängige Apoptoseauslöser

Gamma-Bestrahlung induziert Apoptose durch direkte und indirekte Effekte. Neben DNA-Schäden als direkte Effekte spielen die indirekten durch ROS induzierten Schäden an Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden eine weitere Rolle bei der Einleitung der Apoptose. Um die Funktion der verschiedenen pro- und antiapoptotischen Faktoren in der strahleninduzierten Apoptose näher zu ergründen, sollten die Auswirkungen von direkter und indirekter Strahlenwirkung getrennt untersucht werden. Dazu wurde der doppelstrangbruchinduzierende Topoisomerase II-Hemmer Etoposid verwendet. Etoposid ist ein Chemotherapeutikum, das den kovalenten Komplex zwischen Topoisomerase II und DNA stabilisiert und somit einen hohen Grad an DNA-Schäden verursacht. Die dadurch ausgelöste Apoptose sollte hauptsächlich über den DNA schadensvermittelten mitochondrialen Weg, ohne Veränderung des intrazellulären ROS-Gehaltes, auslöst werden. Dies wurde durch Quantifizierung von ROS nach Etoposidbehandlung überprüft. Dazu wurde den Zellen das farblose Substrat DCFH₂-DA (Dichlorodihydrofluorescein-diacetat) zugesetzt. Dieses wird in der Zelle durch die Oxidation von ROS zu fluoreszierendem DCF umgesetzt und mittels Durchflussszytometer bestimmt. Bei der Auswertung wurde die Verschiebung des Medians der DCF-Fluoreszenz herangezogen. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit H₂O₂ behandelt, welches den zellulären ROS Gehalt erheblich erhöhte. In Abbildung 5 wird gezeigt, dass Etoposid keine ROS erzeugte, da auch mit hohen Dosen (20 μ M) keine erhöhte DCF-Fluoreszenz gemessen werden konnte, während γ -Bestrahlung (0 - 10 Gy) einen linearen, dosisabhängigen Anstieg des DCF-Signals bewirkte, wodurch auch eine steigende Konzentration an ROS gezeigt werden konnte. Die Behandlung mit H₂O₂ (0 - 1 mM) bewirkte eine noch stärkere Erhöhung der DCF-Fluoreszenz bzw. ROS Produktion.

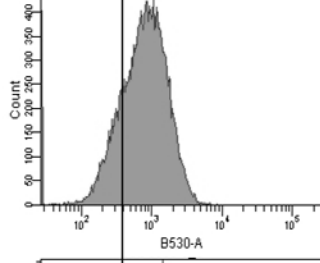
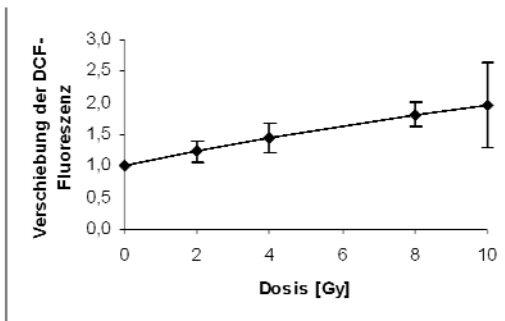
Median unbehandelt



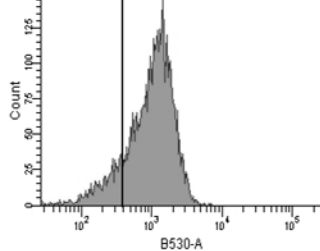
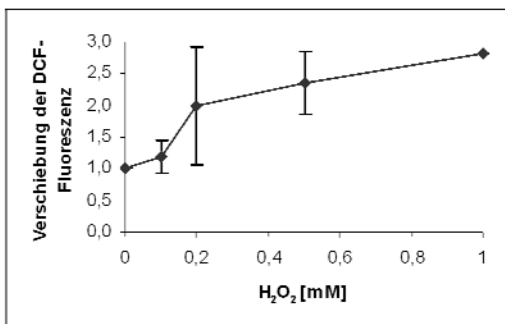
unbehandelt



10 µM Etoposid



10 Gy



0,2 mM H₂O₂

Abbildung 5: Detektion des intrazellulären ROS-Gehalts mittels DCF-Fluoreszenz; DNA-Schädigung nach Etoposid Behandlung. (A) Oxidation von DCFH₂-DA durch ROS führt zur Bildung von fluoreszierendem DCF, welches im FACS nachgewiesen wurde.

Zum Vergleich der strahlen- und etoposidinduzierten Apoptose wurde dann die Äquivalenzdosis von Etoposid ermittelt, die bezogen auf den schwerwiegendsten DNA-Schaden, den DNA-Doppelstrangbruch, einer Dosis von 10 Gy entspricht. Dies wurde mit Hilfe der Analyse von γH2AX- und 53BP1-Proteinaggregaten („Foci“) zur Detektion von Doppelstrangbrüchen ermittelt. Die Bestrahlung mit 10 Gy induzierte eine hohe Anzahl an Foci, deren Auszählung nicht möglich war (Abb. 6). Deshalb wurde das Reparaturverhalten als Vergleich herangezogen und die Anzahl von γH2AX bzw. 53BP1 Aggregaten wurde nach 24 h detektiert. Die Auswertung zeigte, dass eine Dosis von 10 µM Etoposid etwa einer Dosis von 10 Gy entspricht, da durch beide Behandlungen nach 24 h noch etwa gleich viele Foci in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnten, während Zellen 24 h nach einer Behandlung mit 7,5 µM Etoposid wesentlich weniger Foci aufwiesen (Abb. 6). Dass die Anzahl der Restschäden nach 24 h sowohl nach Bestrahlung als auch nach

Etoposidbehandlung proportional zum Initialschaden ist wurde in Vorversuchen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

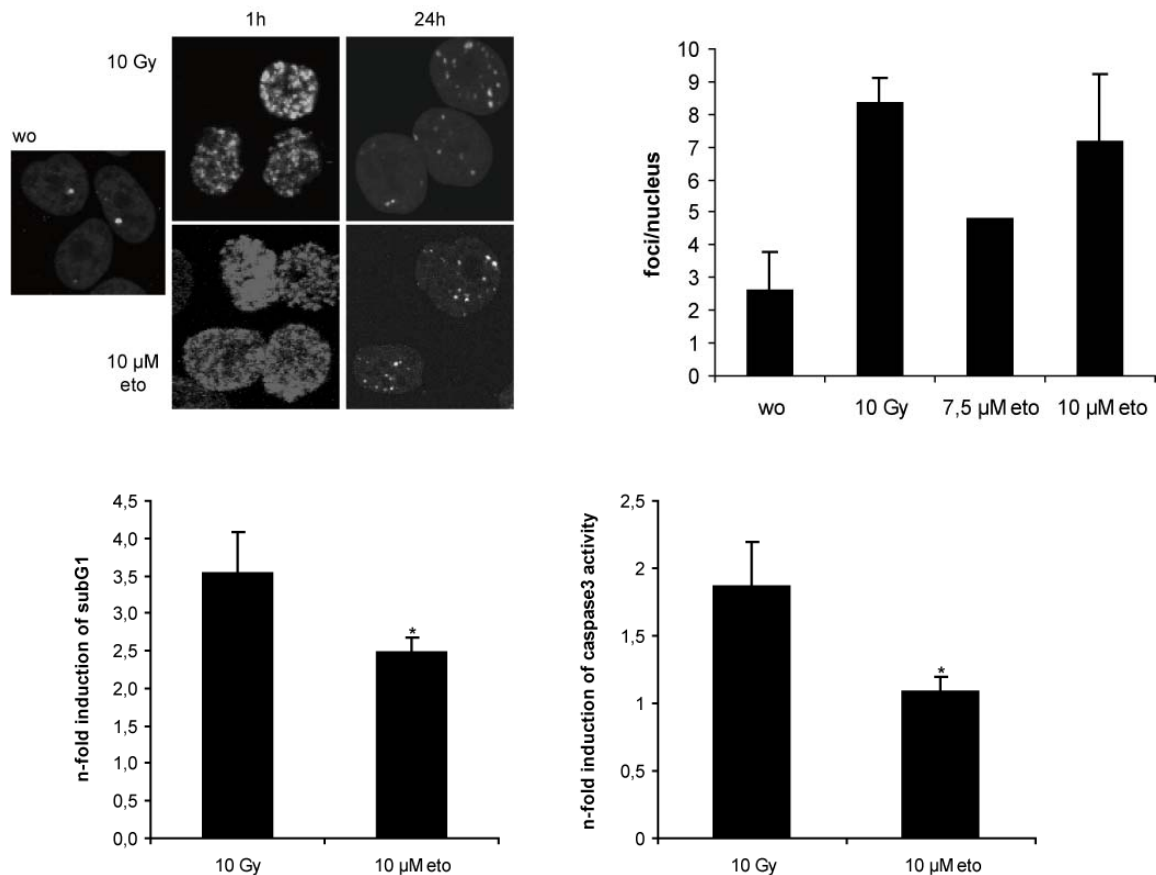


Abbildung 6: (A) γ H2AX Foci als Indikatoren für DNA Doppelstrangbrüche 1 und 24 h nach der Behandlung mit Etoposide bzw. nach Bestrahlung mit 10 Gy im Vergleich zu unbehandelten Zellen (wo). (B) Anzahl der γ H2AX Foci 24 h nach Behandlung. (C) Apoptose nach Etoposid Behandlung wurde durch Quantifizierung der SubG1 Phase Zellen bzw. durch Messung der Caspase-3 Aktivität bestimmt.

Weiterhin wurde die Apoptose nach Behandlung mit 10 µM Etoposid mit der durch 10 Gy Strahlung induzierten Apoptose verglichen. Abbildung 6C zeigt, dass die zu 10 Gy äquivalente Dosis von 10 µM Etoposide sowohl im Caspase-3 als auch im SubG1 Assay weniger Apoptose induziert.

3.1.4 Bedeutung von apoptose-relevanten Faktoren bei Etoposid-Behandlung

Wie für die strahleninduzierte Apoptose wurden auch der Einfluss verschiedener apoptose-relevanter Faktoren für die Etoposid-induzierte Apoptose untersucht. Außerdem wurde das klonogene Überleben nach Behandlung mit 2,5, 5 und 10 µM Etoposid bestimmt (Fig 7A). Zusätzlich zu seiner Funktion in der strahleninduzierten Apoptose führt ein Knockdown von EGFR1 auch zu einem verringerten Überleben nach Etoposid Behandlung. Ein geringer

Effekt auf das Überleben könnte auch nach Herunterregulierung von Apaf1, Caspase-8 und DR5 festgestellt werden.

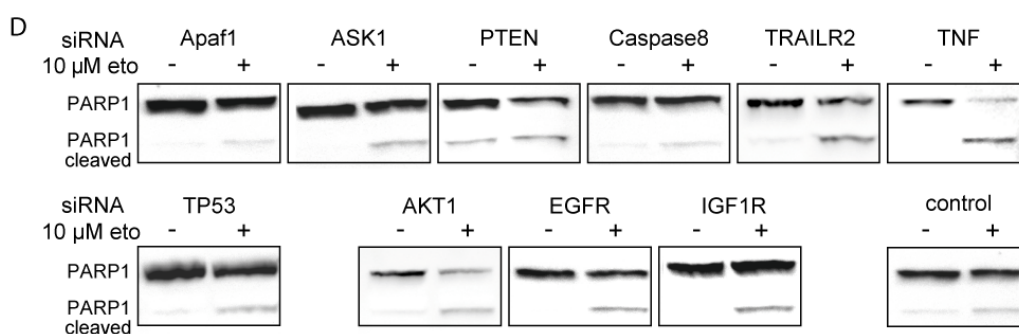
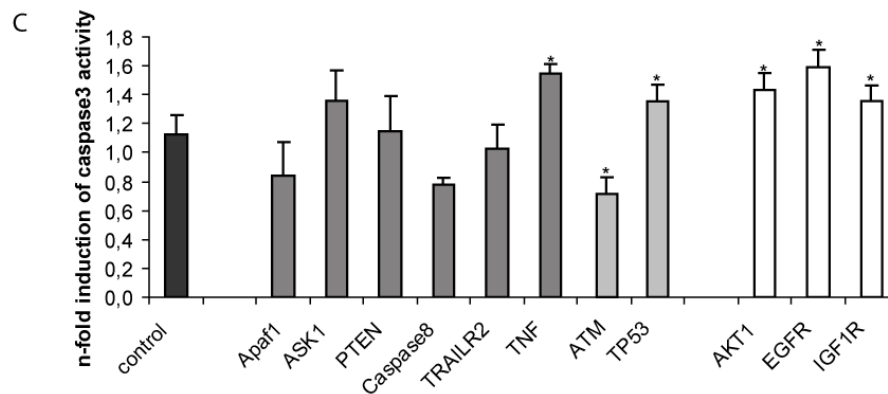
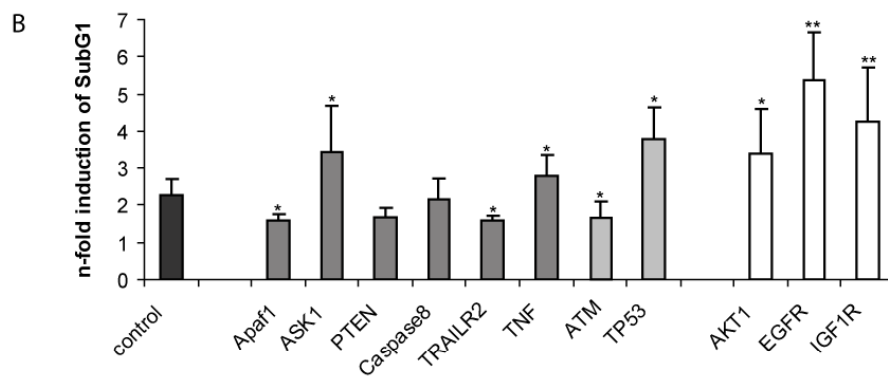
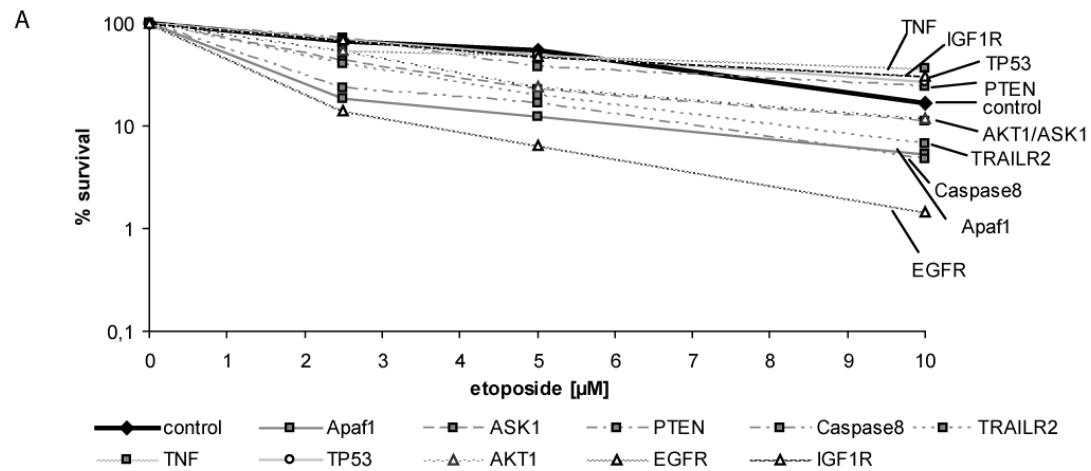


Abbildung 7: Bedeutung von apoptose-relevanten Faktoren in der Etoposid-induzierten Apoptose. (A) Klonogenes Überleben 10 d nach spezifischem Knockdown und Etoposidbehandlung. Mindestens zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. (B) Anteil der Zellen in der SubG1 Fraktion 48 h nach der Behandlung mit 10 μ M Etoposid. Fehlerbalken zeigen die S.D: von drei Experimenten an * $p < 0.05$, Students t-test. (C) n-fache Induktion der Caspase-3 Aktivität 24 h nach einer Etoposid Behandlung und spezifischem Knockdown. Fehlerbalken zeigen die S.D: von drei Experimenten an * $p < 0.05$, Students t-test. (D) PARP1 Spaltung wurde 24 h nach der Etoposidbehandlung in Gesamtzellextrakten nachgewiesen.

Fig. 7B und 7C zeigen die Ergebnisse der Etoposid-induzierten Apoptose. SubG1 Population und Caspase-3 Aktivität zeigten einen signifikanten Anstieg in der Apoptose nach Knockdown von ASK1, p53, Akt1, EGFR und IGFR1. Dagegen zeigten Zellen mit verringertem Gehalt an Apaf1 und TRAIL2 eine geringere Apoptose. Wie auch nach Bestrahlung wurde eine verringerte Apoptose nach Knockdown von ATM detektiert, was wiederum wohl an der hohen Ausgangsapoptose in den unbehandelten Zellen liegt. Obwohl die Daten der Caspase-3 Aktivität und der PARP1 Spaltung keine großen Unterschiede zwischen Knockdown und Kontrollzellen zeigen, können die Ergebnisse aus der SubG1 Bestimmung weitestgehend bestätigt werden. Ein überraschendes Ergebnis zeigt der Vergleich von strahlen- und etoposidinduzierter Apoptose in spezifisch deregulierten Zellen. Die herunterregulierten Faktoren zeigen eine weitgehend gleiche Bedeutung für die beiden Apoptoseinduktoren und nicht wie erwartet unterschiedliche Einflüsse auf die beiden Agentien. Dies deutet an, dass auch durch Etoposid rezeptor-vermittelte und mitochondriale Prozesse zur Apoptoseinduktion beitragen und dass, die verminderte Apoptose nach Etoposidbehandlung eher durch eine globale Reduktion in den untersuchten Apoptosewegen als durch den Wegfall einzelner Subpathways ausgelöst wird.

3.1.5 Das Modellsystem Scl II

Bei dieser Zellart handelt es sich um eine adhärent wachsende permanente humane Keratinozyten-Zelllinie, welche aus einem differenzierten Plattenepithelkarzinom (SCC = squamous cell carcinoma) eines 91-jährigen Mannes stammt.

Abb. 8 zeigt die Ergebnisse für die erfolgreich herunterregulierten Proteine 3 oder 5 Tage nach der Transfektion. Aufgrund dieser Western Blot Ergebnisse wurde das Apoptoseverhalten von Akt1, Apaf1, Ask, ATM, Casp-8, DR4, DR5, EGFR, IGFR1, Fas, FasL, p53, PTEN, TNF und TNFR1 auch in Scl I Zellen untersucht.

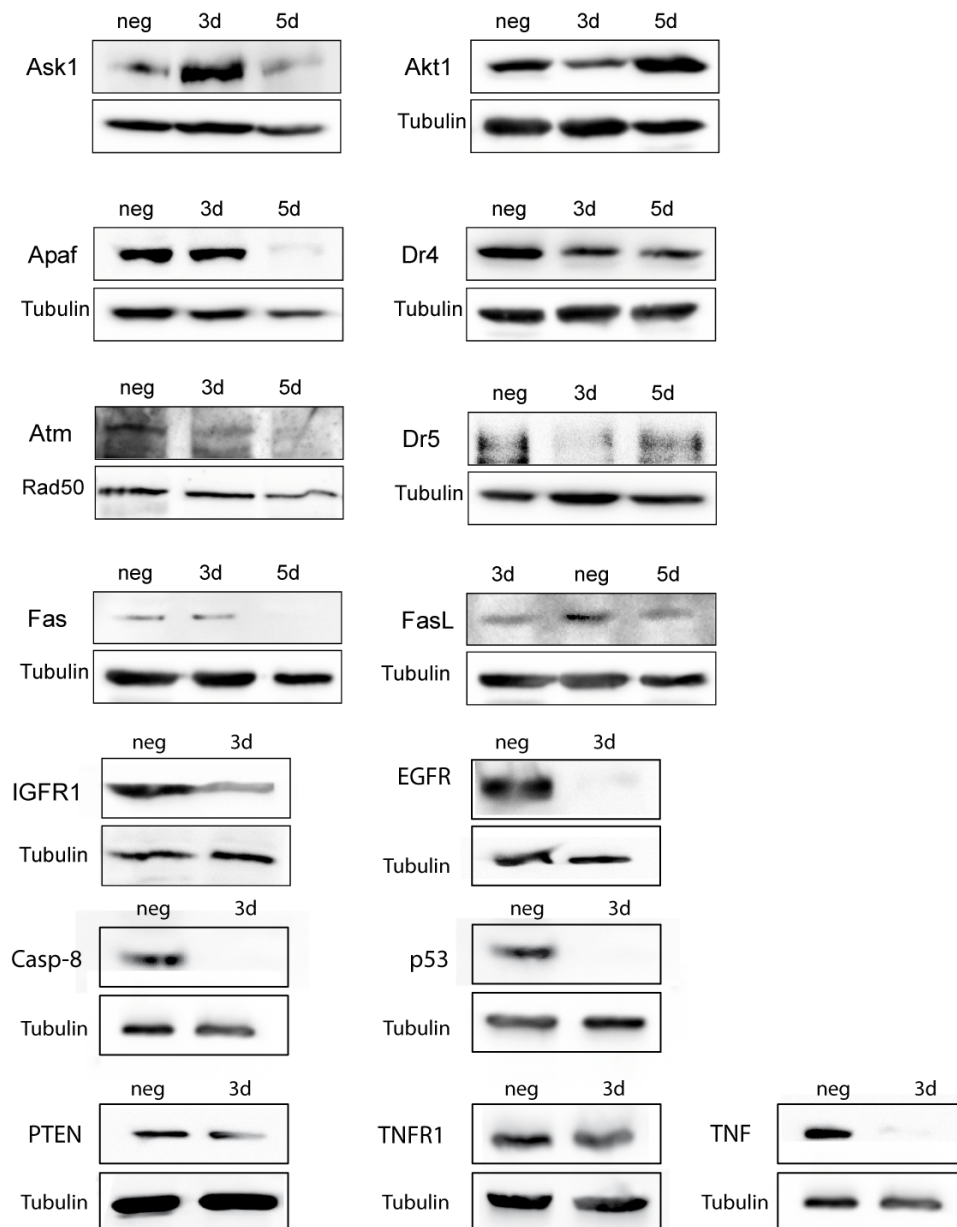


Abbildung 8: siRNA vermittelter Knockdown von Apoptose-relevanten Faktoren der Zelllinie Scl II. (A) Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierungen wurde 3 bzw. 5 Tage nach der Transfektion mittels Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle dienten mit *scrambled* (Mischung unspezifischer siRNAs) siRNA transfizierte Zellen. Als Beladungskontrolle diente Tubulin.

Die Daten für die Induktion von Apoptose nach Bestrahlung mit 10 Gy sind in Abb.9 gezeigt. Im SubG1 Assay zeigten Zellen mit einem Knockdown in Ask1, DR5, Fas, FasL, und IGFR1 einen signifikanten Anstieg in der Apoptose. Dagegen war nach Herunterregulation von Apaf1, ATM, Caspase-8, PTEN und TNF die Apoptose erniedrigt. Die Suppression der anderen Faktoren führte zu keiner Veränderung der strahleninduzierten Apoptose. Diese Ergebnisse konnten im Wesentlichen durch die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität bestätigt werden.

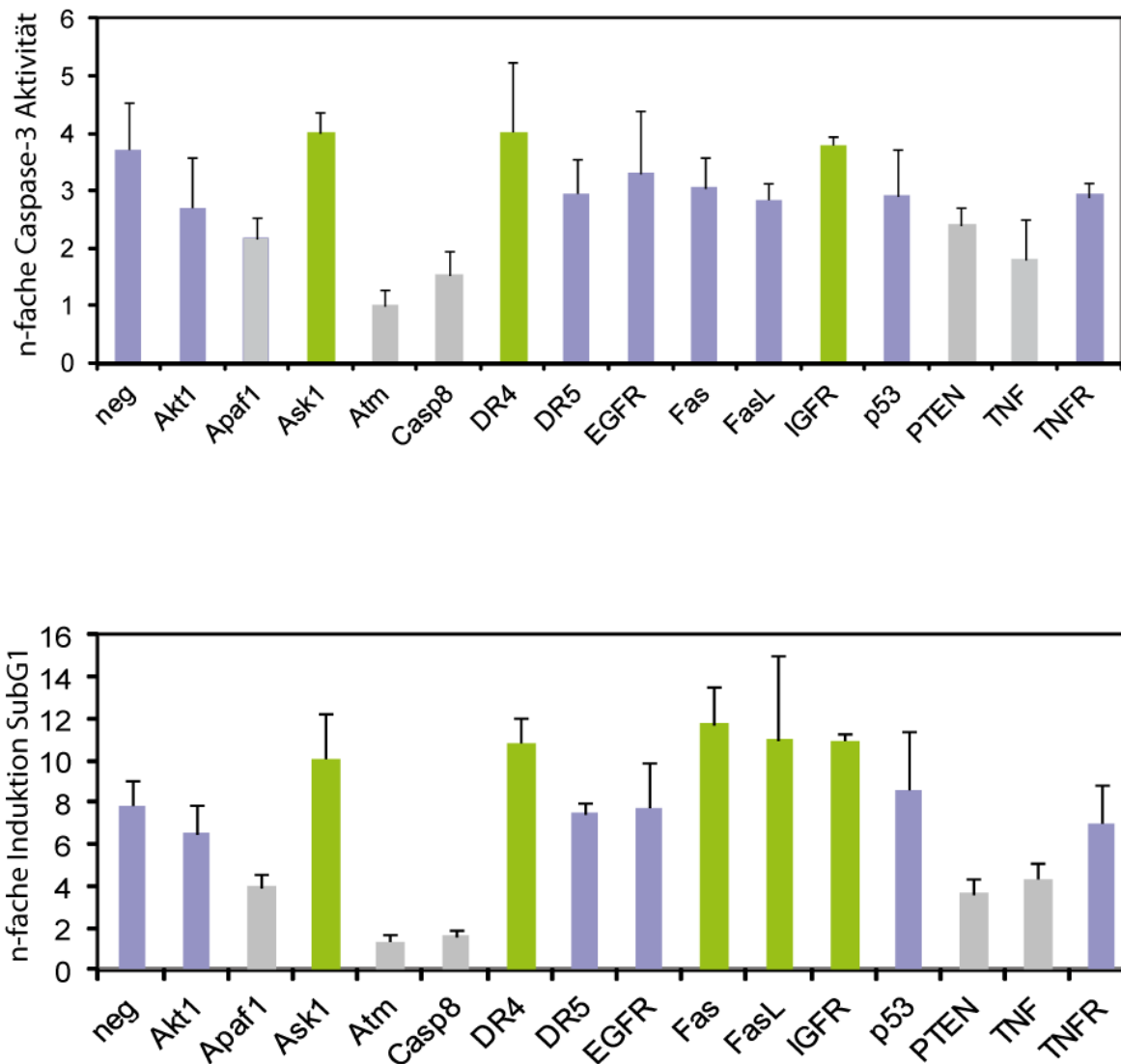


Abbildung 9: Strahleninduzierte Apoptose nach dem Knockdown Apoptose-relevanter Faktoren. (oben) Vergleich der Caspase-3 Aktivitäten 24 h nach Bestrahlung in knockdown und kontroll-transfizierten Zellen. (unten) 48 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy wurde die Zellzyklusverteilung mit Propidiumiodidfärbung bestimmt und die Zellen in SubG1 wurden quantifiziert. Der n-fache Anstieg von Zellen in der SubG1 Phase nach Bestrahlung und spezifischen Knockdown relativ zu kontroll-transfizierten Zellen ist dargestellt. Fehlerbalken zeigen die S.D. von drei unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte aus der unabhängigen Experimenten $\pm$ S.D. sind dargestellt.

Auch in Scl II Zellen führt eine Etoposidbehandlung zur Induktion von Apoptose. Ein Vergleich zwischen Bestrahlung und Etoposidbehandlung ergibt in diesem Zellsystem etwa einen ähnlichen Grad der Apoptoseinduktion durch beide Behandlungen. Desweiteren beeinflusst auch die Modulation von Faktoren die bereits in der strahleninduzierten Apoptose zu Veränderungen geführt haben die Apoptose nach Etoposidzugabe. So konnte wiederum durch Knockdown von Ask und IGFR1 die Apoptose erhöht werden. Dagegen resultiert die Herunterregulierung von Apaf, Caspase-8 und PTEN in einer verminderten Apoptose.

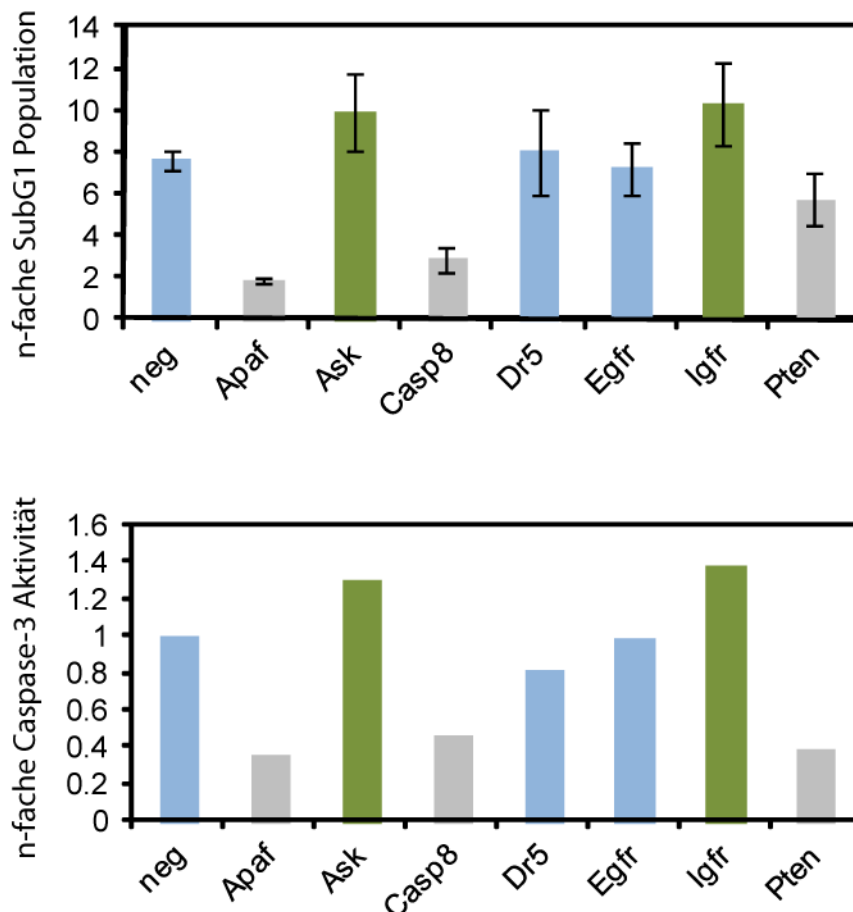


Abbildung 10: Bedeutung von Apoptose-relevanten Faktoren in der Etoposid-induzierten Apoptose in der Zelllinie Scl II. (oben) Anteil der Zellen in der SubG1 Fraktion 48 h nach der Behandlung mit 10 µM Etoposid. Fehlerbalken zeigen die S.D: von drei Experimenten an * p<0.05, Students t-test. (unten) n-fache Induktion der Caspase-3 Aktivität 24 h nach einer Etoposid Behandlung und spezifischem Knockdown. Fehlerbalken zeigen die S.D: von drei Experimenten an.

3.1.6 Das Modellsystem Jurkat

Als weiteres experimentelles System zur Untersuchung strahleninduzierter Apoptose sollte eine Suspensionzelllinie etabliert werden (Diplomarbeit, Thomas Blunder). Dazu wurden zunächst Nachweismethoden und siRNA Transfektionsprotokolle für die T-Zelllinien Jurkat und TK6 sowie die B-Zelllinie 721 getestet. Dabei stellte sich die Zelllinie Jurkat als geeignetstes Zellsystem heraus. Mittels Analyse adäquater Apoptosemarker konnte in Jurkat-Zellen strahleninduzierte Apoptose reproduzierbar nachgewiesen werden. Außerdem könnte mittels Mikroporationstechnik zur Transfektion eine effektive Transfektion von siRNAs etabliert werden. In der Zelllinie 721 konnte durch Bestrahlung keine Apoptose induziert werden. In TK6-Zellen konnte keine effektive Transfektion von siRNA etabliert werden. Aus diesen Gründen wurden die beiden Linien nicht weiter untersucht.

In der Zelllinie Jurkat lieferte die PARP-Spaltung, der SubG1-Test und die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität reproduzierbare Ergebnisse zur strahleninduzierten Apoptose. Zusätzlich konnte durch die Auswahl dieser Apoptosemarker das gesamte Zeitfenster der Apoptosekaskade von der Initiationsphase bis zur späten Exekutionsphase abgedeckt werden.

Wie in den anderen Systemen wurde zum besseren Verständnis der Mechanismen der strahleninduzierten Apoptose, wiederum der individuelle Beitrag apoptoserelevanter Gene quantitativ ermittelt. Dies wurde durch Herunterregulierung der einzelnen Faktoren mittels RNAi-Technik und anschließender Quantifizierung der Apoptose nach Strahleninduktion untersucht. Dabei gestaltete sich die Analyse aus unbekannten Gründen sehr schwierig, da in den Ergebnissen große Variabilität auftrat. Daher ist in Tabelle 1 lediglich eine qualitative Abschätzung für den Apoptoseeinfluss der einzelnen Faktoren gezeigt. Nur die Herunterregulierung der Faktoren EGFR und Caspase8 zeigte relativ einheitliche Ergebnisse für die untersuchten Apoptosemarker. Dabei führte der Knockdown von EGFR zu einer Erhöhung der Apoptose, während die Herunterregulierung von Caspase8 die Apoptose erniedrigt. Diese Befunde stimmen auch mit den Ergebnissen aus den anderen Zellkultursystemen überein. Beide Faktoren regulieren die Apoptose über rezeptor-vermittelte Prozesse, was wiederum die Bedeutung dieser Wege für die strahleninduzierte Apoptose unterstreicht.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Induktion strahleninduzierter Apoptose nach *knockdown* apoptoserelevanter Gene.

Gezeigt ist ein zusammenfassender Vergleich der Apoptose Assays PARP-Spaltung, SubG1 Assay und *CaspACE* Assay. Nach Herunterregulierung und Bestrahlung mit 10 Gy wurden apoptotische Zellen mittels der drei Assays quantifiziert und die Induktion der Apoptose mit der Induktion der kontrolltransfizierten Probe verglichen

Gen	erwarteter Effekt des <i>knockdown</i> bezüglich der Apoptose	Effekt des <i>knockdown</i> - PARP-Spaltung	Effekt des <i>knockdown</i> - SubG1 Assay	Effekt des <i>knockdown</i> - <i>CaspACE</i> Assay
AKT1	Anstieg der Apoptose 	keine Veränderung 	geringer Rückgang der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 
MAP3K5 (ASK1)	Rückgang der Apoptose 	keine Veränderung 	Anstieg der Apoptose 	geringer Rückgang der Apoptose 
Caspase-8	Rückgang der Apoptose 	Rückgang der Apoptose 	Rückgang der Apoptose 	sehr geringer Rückgang der Apoptose 
EGFR	Anstieg der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 	geringer Rückgang der Apoptose 
FAS	Rückgang der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 	Rückgang der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 
IGFR1a	Anstieg der Apoptose 	keine Veränderung 	Anstieg der Apoptose 	Rückgang der Apoptose 
p53	Rückgang der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 	sehr geringer Anstieg der Apoptose 	Anstieg der Apoptose 
TNFR1	Rückgang der Apoptose 	keine Veränderung 	Rückgang der Apoptose 	geringer Rückgang der Apoptose 
TRAILR2	Rückgang der Apoptose 	keine Veränderung 	Anstieg der Apoptose 	sehr geringer Anstieg der Apoptose 

3.1.7 Lipidperoxide als DNA Schadensunabhängige Apoptoseauslöser

Lipide werden durch ROS oxidiert. Die entstehenden Lipidperoxide sind Indikatoren für oxidativen Stress und können in Gegenwart von Übergangsmetallen zu Alkoxyradikalen reagieren. Diese beeinflussen die Membranfluidität und sind potente Apoptoseauslöser, die durch Strahlung DNA-schadensunabhängig generiert werden. Zudem könnten Lipidperoxide direkten Einfluss auf Rezeptoren nehmen, die in die Membran eingebettet sind.

Zur weiteren Unterscheidung von direkten durch DNA-Schädigung induzierten- und ROS-induzierten Apoptoseprozessen wurde deshalb die strahleninduzierte Lipidperoxidation mit dem Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)-Assay (Cayman's) analysiert. Malondialdehyd (MDA) ist ein natürliches Produkt der Lipidperoxidation, das in Zelllysaten und Zellkulturüberständen detektiert werden kann. Der Nachweis von MDA erfolgt durch Umsetzung mit *Thiobarbituric Acid* (TBA) bei 90 °C. Die Quantifikation des Reaktionsprodukts erfolgt dann durch Messung der Absorption bei 530 nm.

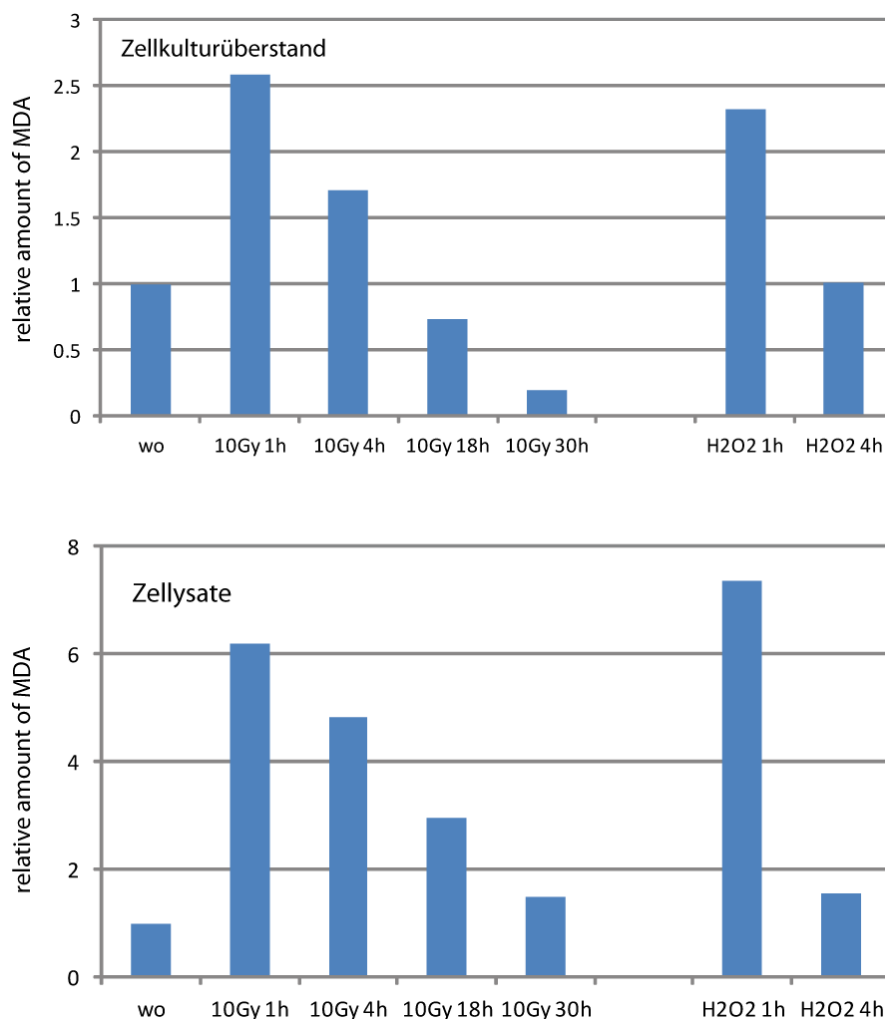


Abbildung 11: Etablierung des TBARS-Assay zur Quantifikation von Lipidperoxiden. Lipidperoxide wurden nach Bestrahlung oder H₂O₂ Behandlung in Zellkulturüberständen und in Zellysaten nach 1, 4, 18 bzw. 30h mit dem TBARS Assay quantifiziert. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Abb. 11 zeigte, dass Bestrahlung zu einem transienten Anstieg an Lipidperoxiden führt. 1 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy kann in den Zellysaten von Hela Zellen ein sechsfacher Anstieg an MDA, was als Marker für Lipidperoxide dient, nachgewiesen werden. Danach nimmt die Konzentration an Lipidperoxiden rasch wieder ab. Auch im Zellkulturüberstand kann nach Bestrahlung ein Anstieg von MDA gemessen werden. Als Kontrolle bei der Etablierung dieser Versuche diente die Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Lipidperoxidation und Apoptose zu untersuchen, wurde die Lipidperoxidation in Hela Zellen mit verschieden starker strahleninduzierter Apoptose quantifiziert. Dazu wurden HeLa Zellen mit Knockdown von Apoptose-relevanten Faktoren verwendet. Als Vertreter mit erhöhter Apoptose wurden Akt1, EGFR und p53 Knockdown Zellen verwendet. Zellen mit erniedrigter Apoptose waren Caspase-8 und Apaf1 herunterregulierte Zellen.

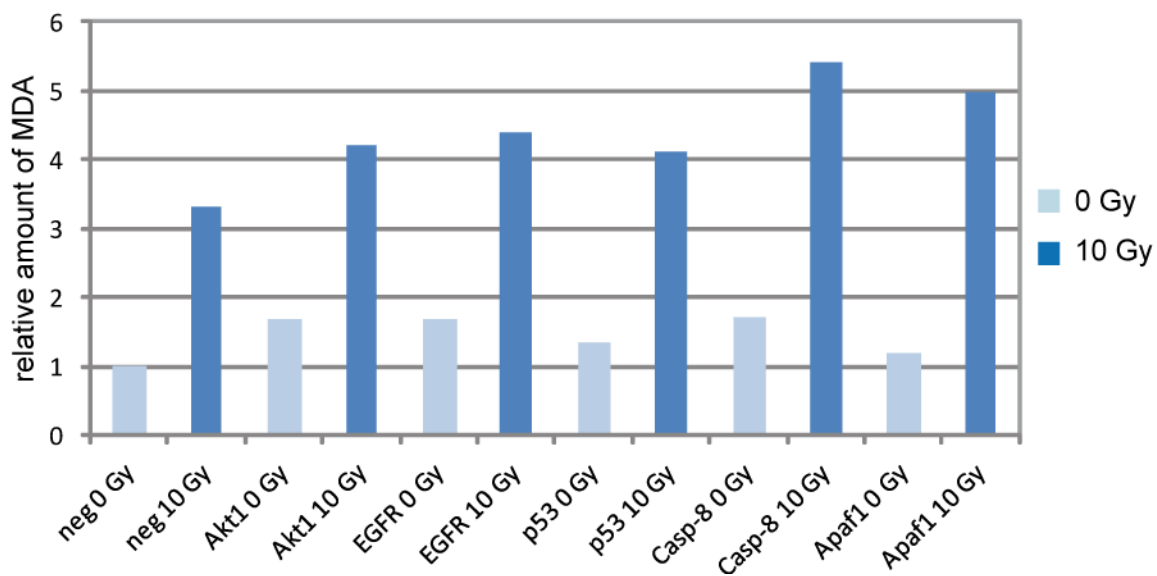


Abbildung 12: relative MDA Konzentration als Marker für die Lipidperoxidation in Hela Zellen mit unterschiedlichem Apoptoseverhalten. Die MDA Konzentration wurde 1 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy gemessen.

Abbildung 12 zeigt den relativen Gehalt an MDA in Hela Zellen mit unterschiedlichem Apoptoseverhalten. Bereits die unbestrahlten Zellen zeigten nach dem Knockdown von spezifischen apoptose-relevanten Faktoren eine leichte Erhöhung an MDA, was auf gesteigerten zellulären Stress in diesen Systemen hindeutet. Durch die Bestrahlung kommt es in allen Linien zu einem Anstieg an MDA. Jedoch ist kaum ein Unterschied zwischen hoch- und niedrig apoptotischen Zellen zu erkennen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine erhöhte bzw. erniedrigte Apoptose nicht mit einem unterschiedlichen Gehalt an

Lipidperoxiden verbunden sein muss. Die in diesem Versuch deregulierten Faktoren scheinen die strahleninduzierte Lipidperoxidation nicht zu beeinflussen.

3.2 Charakterisierung von Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien aus einem Patienten- und einem Kontroll-Kollektiv

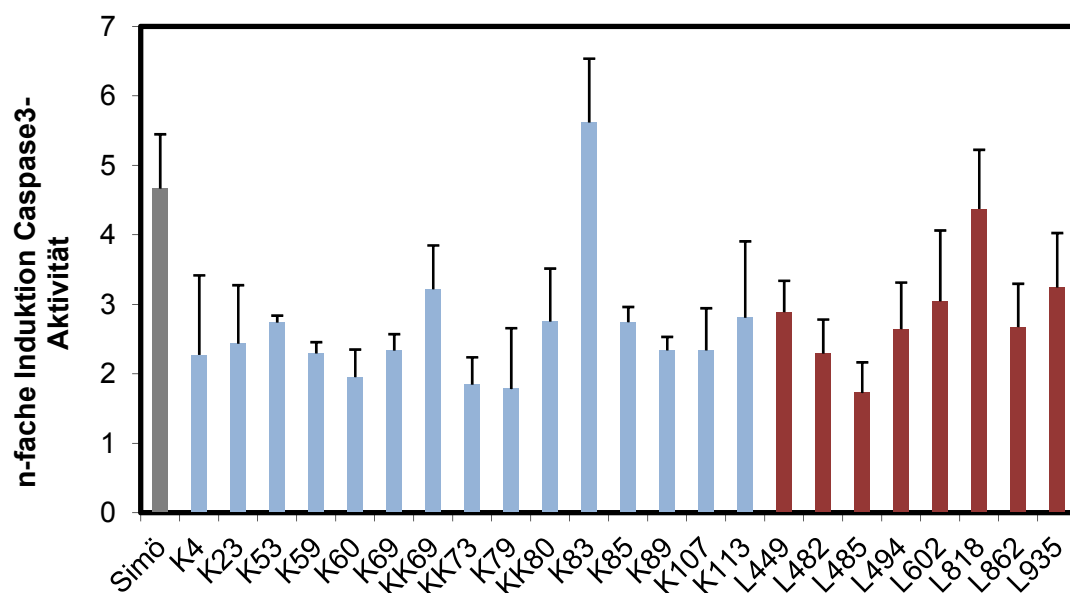
In diesem Abschnitt sollte die strahleninduzierte Apoptose und deren zugrundeliegenden Mechanismen in EBV-immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien aus verschiedenen Spendern untersucht werden. Die Zelllinien wurden im Rahmen einer Kooperation vom Institut für Epidemiologie (HMGU) zur Verfügung gestellt (siehe StSch4360, StSch4439). Sie stammen aus der LUCY (Lung Cancer in the Young)-Studie sowie aus dem Proben-Kollektiv der Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA). Die LUCY Studie ist eine Lungenkrebsstudie von Patienten mit einem frühen Erkrankungsalter (< 50 Jahre). Da Lungenkrebs gewöhnlich erst in hohem Alter auftritt wird bei Patienten mit geringem Erkrankungsalter eine genetische Prädisposition vermutet. Die KORA Studie ist eine populationsbasierte Studie, in der Bioproben von klinisch unauffälligen gesunden Individuen gesammelt wurde. Zusätzlich werden in jedem Versuch abgeleitete lymphoblastoide Zelllinie einer internen Kontrollperson (SiMö) eingesetzt, um versuchsbedingte Schwankungen zu erfassen.

Zuerst wurde die Apoptose in 23 immortalisierten Zelllinien und der laborinternen Kontrollzelllinie (SiMö) nach Bestrahlung quantifiziert und anschließend das Apoptoseverhalten funktionell untersucht.

3.2.1 Apoptose nach Bestrahlung

Eine Bestrahlung mit 10 Gy führt in allen Linien sowohl im Caspase-3- als auch im subG1-Assay zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptose, wobei LUCY und KORA Linien eine Normalverteilung in der Apoptoseinduktion zeigen (Faktor 2-6). Die Ergebnisse wurden durch die Analyse der PARP-1 Spaltung weitgehend bestätigt. Aufgrund dieser Daten wurden die Zelllinien in hoch-, mittel- und niedrig apoptotisch eingeteilt (Tabelle 3). Dabei zeigten 4 Linien eine hohe Apoptoseinduktion, bei 16 Linien wurde eine mittlere Induktion und in weiteren 4 Linien kaum eine Apoptoseinduktion festgestellt. Obwohl alle Apoptosemessungen an drei biologischen Replikaten durchgeführt wurden, zeigten die Analysemethoden nicht für alle Linien übereinstimmende Ergebnisse. Möglicherweise resultieren diese Unterschiede aus Verschiebungen in den Apoptosekinetiken zwischen den Linien, wodurch die festgelegten Messzeitpunkte eventuell nicht immer optimal gewählt

waren. Für weitere Projekte ist es wünschenswert jeden Apoptosemarker zumindest an drei Zeitpunkten zu bestimmen. Ein Vergleich der mittleren Apoptoseinduktion zwischen LUCY und KORA Linien zeigte im Caspase-3 Assay keinen Unterschied, im SubG1 Assay zeigen die LUCY Linien jedoch eine signifikant höhere Apoptose. Um die Übertragbarkeit von erhobenen Daten aus primären Zellen mit den Ergebnissen aus den korrespondierenden Zelllinien zu überprüfen, wurde die Apoptoseinduktion in LCLs mit den Daten der primären Vorläuferzellen (Projekt StSch 4439) korreliert. Diese Korrelation lieferte eine eingeschränkte Übereinstimmung (Tabelle 2). Nur 7 der 24 untersuchten Zelllinien verhielten sich in der strahleninduzierten Apoptose wie ihre primären Vorläufer. Diese begrenzte Übereinstimmung im Apoptoseverhalten von primärem Ausgangsmaterial und abgeleiteten Zelllinien zeigt, dass die Immortalisierung von Zellen durch EBV Transfektion einen erheblichen Eingriff in die Zelle darstellt und dass sich die abgeleiteten Zelllinien deutlich vom Ausgangsmaterial unterscheiden. Ein wenig übertragbares Verhalten von primären Lymphozyten und EBV-immortalisierten Linien wurde auch von anderen Gruppen gefunden (Popanda et al. 2010) gefunden. Damit sind EBV-immortalisierte Zelllinien ein kaum geeignetes Werkzeug für die Untersuchung der strahleninduzierten Apoptose Strahlenforschung, um Rückschlüsse auf das zugrunde liegende Ausgangsmaterial zu ziehen. Als einheitliches Studienmaterial zur Untersuchung von Mechanismen sind die vorliegenden Linien aber sehr wohl geeignet.



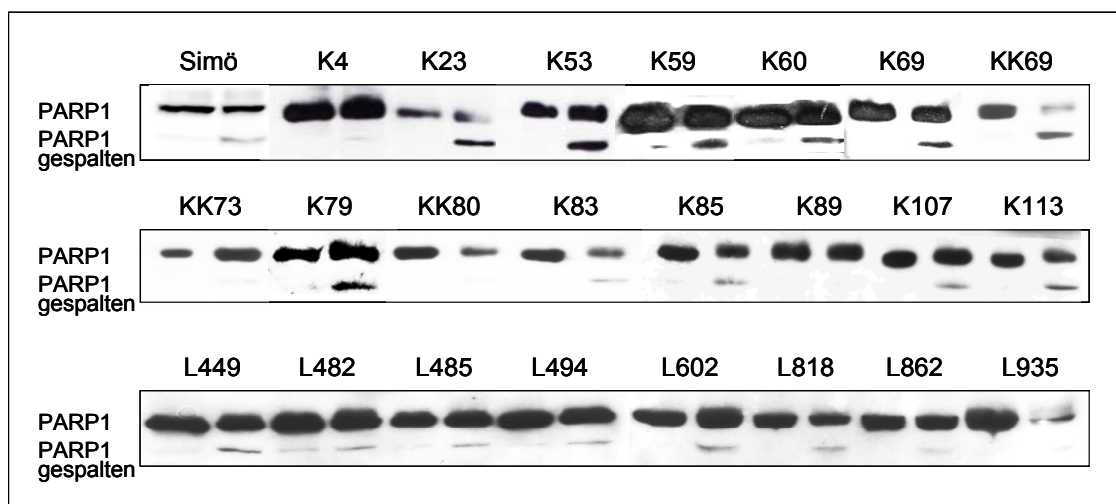
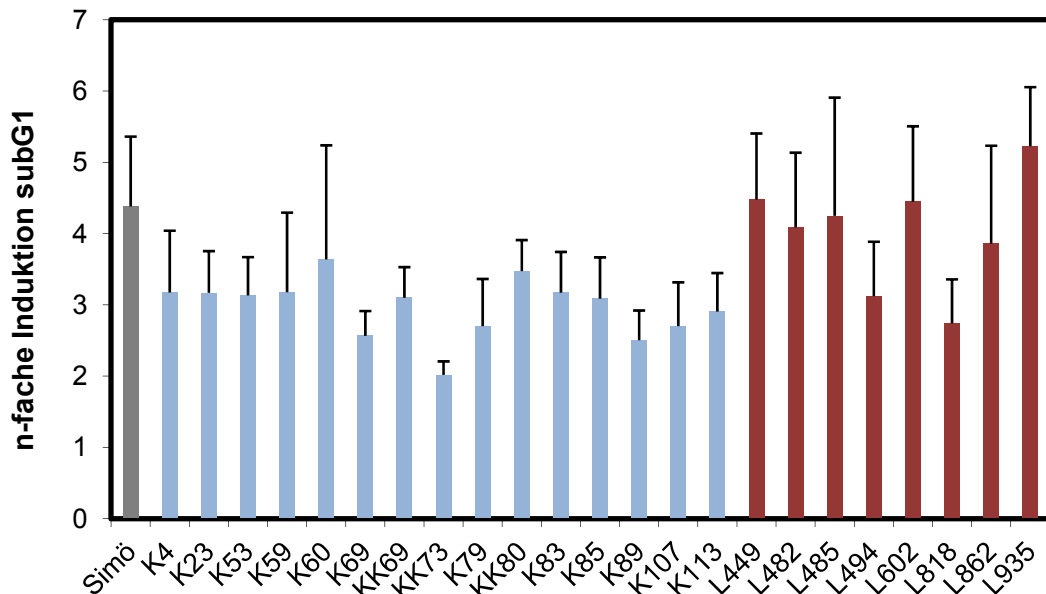


Abbildung 13: strahleninduzierte Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien; Strahleninduzierte Apoptose wurde mittels Detektion der subG1-Zellfraktion, der Caspase3-Aktivität und der Spaltung von PARP1 untersucht. Neben der laborinternen Kontrolle Simö (grau) wurden lymphoblastoide Zelllinien der KORA- (K, blau) und LUCY- (L, rot) Kohorte analysiert.

3.2.2 Apoptose nach Etoposid- bzw. Wasserstoffperoxid-Behandlung

Um den Einfluss direkter und indirekter Strahleneffekten auf die Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien zu unterscheiden wurde die strahleninduzierte Apoptose mit der Etoposid-induzierten verglichen. Wiederum ergaben die Messungen eine deutliche zwischen den Proben normalverteilte Induktion der Apoptose (Abb. 14). Die mittlere Apoptoseinduktion nach Etoposidbehandlung ist aber deutlich geringer als nach Bestrahlung, obwohl die

eingesetzte Konzentration eine, zu 10 Gy Strahlung äquivalente Menge an DNA Doppelstrangbrüchen induzierte. Wiederum wurden die 23 untersuchten Linien in hoch, mittel und niedrig klassifiziert (Tabelle 3). Diese Einteilung stimmte für 19/23 mit der Klassifizierung nach Bestrahlung überein, was auf mechanistische Übereinstimmungen in der Induktion von strahlen- und Etoposid-induzierter Apoptose hindeutet. Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied in der mittleren Apoptoseinduktion von LUCY- und KORA-Linien mittels Caspase-3 Aktivität und SubG1 Assay gemessen.

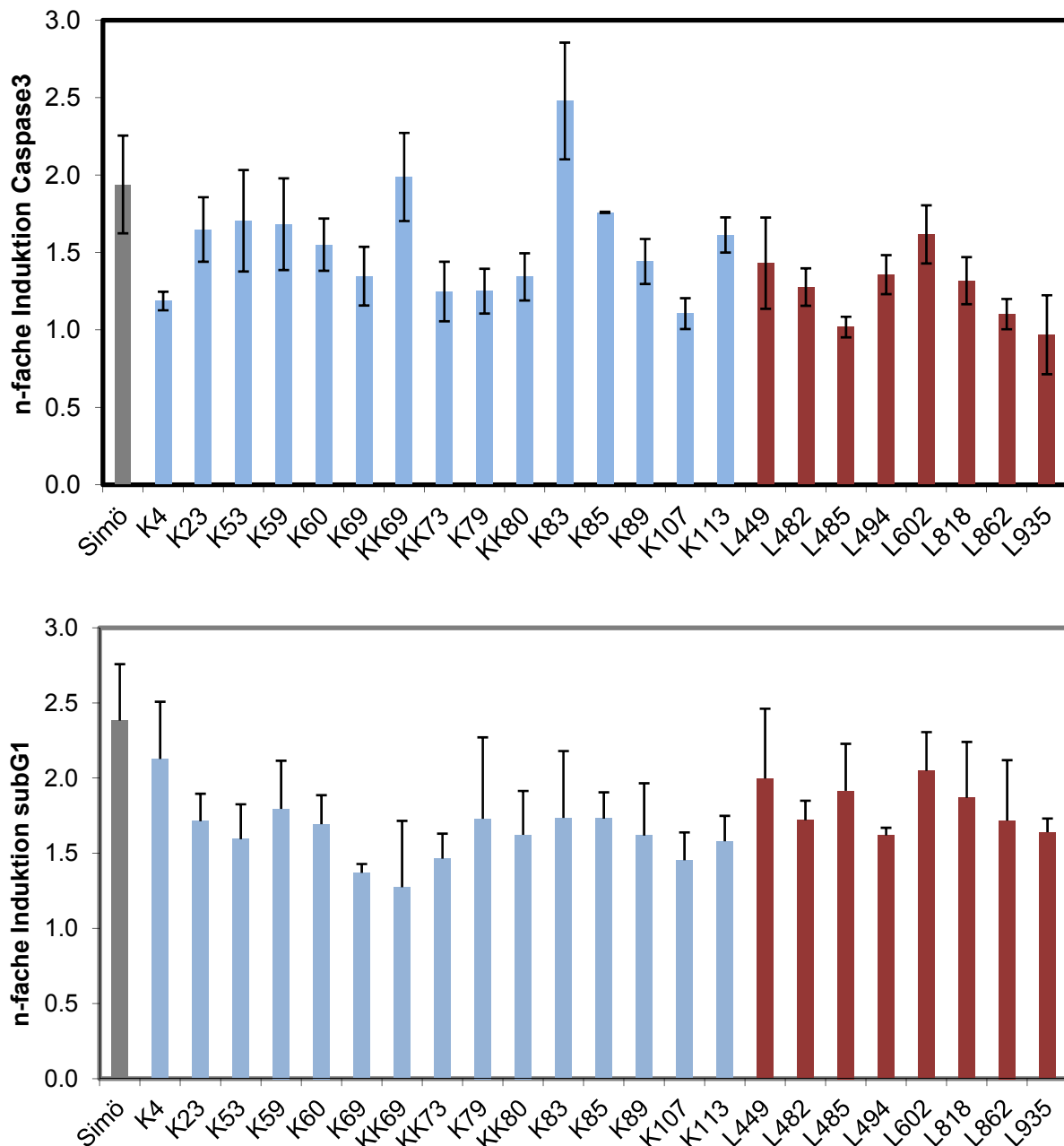


Abbildung 14: Etoposid-induzierte Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien; Etoposid-induzierte Apoptose wurde mittels Detektion der subG1-Zellfraktion und Caspase-3 Aktivität untersucht. Neben der laborinternen Kontrolle Simö (grau) wurden lymphoblastoide Zelllinie der KORA- (K, blau) und LUCY- (L, rot) Kohorte analysiert.

Um die reine ROS-vermittelte Apoptose zu untersuchen wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt. Die Dosis wurde so gewählt, dass die induzierte Apoptose in der Kontrollzelllinie SiMö ungefähr der Apoptoseinduktion durch 10 Gy entspricht.

Eine H_2O_2 -Behandlung führt zu einer höheren Apoptoseinduktion als Etoposid (Abb.15). Jedoch konnten nur mittels SubG1 Assay reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

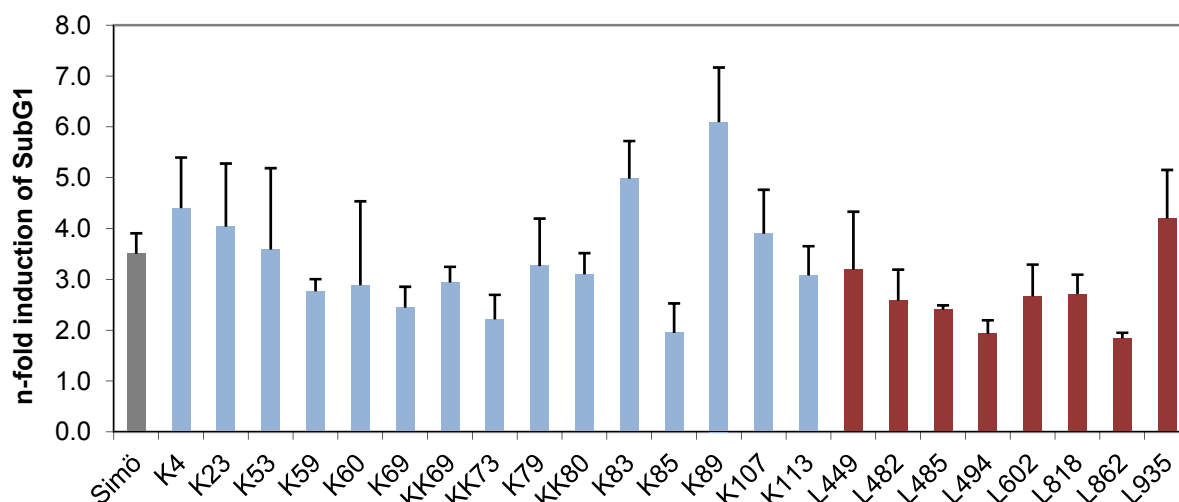


Abbildung 15: Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-induzierte Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien; H_2O_2 -induzierte Apoptose wurde mittels Detektion der subG1-Zellfraktion untersucht. Neben der laborinternen Kontrolle Simö (grau) wurden lymphoblastoide Zelllinien der KORA- (K, blau) und LUCY- (L, rot) Kohorte analysiert.

Tabelle 2: Vergleich der Apoptoseinduktion in LUCY- und KORA-Linien

Behandlung / Assay	Mittelwert KORA	- Mittelwert - LUCY	p-value (Students-t-test)
Strahlung- Caspase-3	2.6	2.9	0.5527
Strahlung- subG1	3.0	4.0	0.0034
Etoposid – Caspase-3	1.6	1.8	0.0403
Etoposid – subG1	1.6	1.3	0.0447
H_2O_2 – subG1	3.4	2.7	0.1004

Ein quantitativer Vergleich der mittleren Apoptoseinduktion durch Strahlung und Etoposid zeigt, dass die Etoposid-induzierte Apoptose um ca. 50 % geringer ist als die strahleninduzierte Apoptose (bei gleicher DNA-Schädigung) (Tabelle 2). Dieses Ergebnis deutet den beträchtlichen Anteil von nicht direkt schadensvermittelten Prozessen in der strahleninduzierten Apoptose an.

Tabelle 3: Zusammenfassung Apoptoseverhalten von lymphoblastoiden Zelllinien nach verschiedenen Behandlungen

Bezeichnung	ID	Apoptose Strahlung primär	Apoptose Strahlung Linien	Apoptose Etoposide Linien	Apoptose H ₂ O ₂ Linien	subG1 PARP	Bestrahlung		Etoposide	
							Casp-3		subG1	Casp-3
K4	1420961	hoch	+	+	++	mittel	mittel	mittel	hoch	niedrig
K23	1848770	mittel	+	+	++	mittel	mittel	hoch	mittel	mittel
K53	1434457	hoch	+	++	++	mittel	mittel	hoch	mittel	hoch
K59	1452843	hoch	+	+	+	mittel	mittel	hoch	mittel	hoch
K60	1442168	hoch	+	+	+	mittel	niedrig	hoch	mittel	mittel
K69	1819645	niedrig	+	o	o	niedrig	mittel	hoch	niedrig	mittel
K79	1829455	mittel	+	+	+	niedrig	niedrig	hoch	mittel	niedrig
KK69	1416785	mittel	+	+	+	mittel	mittel	hoch	niedrig	hoch
KK73	1467846	hoch	o	o	o	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig
KK80	1467904	hoch	+	+	+	mittel	mittel	niedrig	mittel	niedrig
K83	1813714	niedrig	+	++	++	mittel	hoch	mittel	mittel	hoch
K85	1842418	niedrig	+	+	o	niedrig	mittel	mittel	mittel	hoch
K89	1830005	niedrig	o	+	++	niedrig	niedrig	niedrig	mittel	mittel
K107	1810461	niedrig	o	o	++	niedrig	niedrig	mittel	niedrig	niedrig
K113	1852505	niedrig	+	+	+	niedrig	mittel	mittel	mittel	mittel
L449	8027-200	hoch	++	++	++	hoch	mittel	hoch	hoch	mittel
L482	29011-200	niedrig	+	+	+	hoch	niedrig	mittel	mittel	niedrig
L485	29012-200	mittel	+	+	+	hoch	niedrig	mittel	hoch	niedrig
L494	12018-200	niedrig	+	+	o	niedrig	mittel	mittel	mittel	mittel
L602	29019-200	niedrig	++	++	+	hoch	hoch	mittel	hoch	hoch
L818	4047-200	hoch	+	+	+	niedrig	hoch	mittel	hoch	mittel
L862	8042-200	hoch	+	+	o	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel
L935	29031-200	hoch	++	+	++	hoch	hoch	hoch	mittel	niedrig
SIMö		hoch	++	++	++	hoch	hoch	mittel	hoch	hoch
++ hoch	+ mittel	O niedrig								

3.2.3 Mechanistische Charakterisierung von strahleninduzierter Apoptose

Um ein besseres Verständnis der Vorgänge während der strahleninduzierten Apoptose zu erzielen ist es nötig, das Wechselspiel zwischen pro- und antiapoptotischen bzw. zwischen intrinsischen und extrinsischen Apoptosewegen zu analysieren. Deshalb wurde zur mechanistischen Charakterisierung des Apoptoseverhaltens und zur Bestimmung der relativen Bedeutung von unterschiedlichen pro- und antiapoptotischen Prozesse in der strahleninduzierte Apoptose wurde die Proteinexpression in 20 lymphoblastoide Zelllinien aus der LUCY und KORA-Kohorte analysiert. Mit dem Proteome Profiler Array (R&D Systems) wurde parallel die Expression von 35 Apoptose-relevanten Proteinen bestimmt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Human Proteome Profiler Array Proteine und deren Funktion in der Strahlenantwort

Protein	Funktion	Protein	Funktion
Bad	pro, mito	HO-2/HMOX2	anti, rezep
Bax	pro, mito	HSP27	anti, mito
Bcl-2	anti, mito	HSP60	anti, mito
Bcl-x	anti, mito	HSP70	anti, mito
Pro-Caspase-3	anti	HTRA2/Omi	pro, mito
cleaved Caspase-3	pro	Livin	anti, rezep
Catalase	anti	PON2	anti, mito
clAP-1	anti, rezep	p21/CIP1/CDNK1A	anti, mito
clAP-2	anti, rezep	p27/Kip1	anti, rezep
Claspin	anti, cycle	p-p53 (Ser15)	pro, mito
Clusterin	pro, rezep	p-p53 (S46)	pro, mito
Cytochrome c	pro, mito	p-p53 (S392)	pro, mito
TRAIL R1/DR4	pro, rezep	p-Rad17 (S635)	pro
TRAIL R2/DR5	pro, rezep	SMAC/Diablo	pro
FADD	pro, rezep	Survivin	anti, rezep
Fas/TNFSF6	pro, rezep	TNF RI/TNFRSF1A	pro, rezep
HIF-1alpha	anti	XIAP	anti
HO-1/HMOX1/HSP32	anti, rezep		

pro=proapoptotisch, anti=antiapoptotisch, mito= mitochondrialer Pathway, rezep= rezeptor vermittelt

Versuchsaufbau

Target- und Kontroll-Antikörper sind in Duplikaten auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Diese Membran wird mit Zellextrakten in geeigneter Verdünnung für 12 h inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit einer Mischung aus biotinylierten Nachweisantikörpern. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates und Chemolumineszenz-Nachweisreagenzien. Geeignete

Proteinkonzentrationen und Detektionszeitpunkte wurden zunächst an der Kontrollzelllinie SiMö etabliert (Abb.12). Dabei konnten die größten Effekte 2 und 24 h nach Bestrahlung festgestellt werden. Unterschiedliche Zeitpunkte sind erforderlich, da die Apoptose ein relativ langwieriger zellulärer Prozess (24 – 72 h) ist und die auf dem Array befindlichen Proteine in unterschiedlichen Phasen der Apoptose aktiv sind. So kommt es z.B. sehr schnell zur Phosphorylierung von p53 (1 - 6 h nach Behandlung) und anschließend zu einem schnellen Abbau von phospho-p53. Die Auswertung der Spotintensitäten erfolgte mit der Software ImageMaster, TotalLab (Amersham).

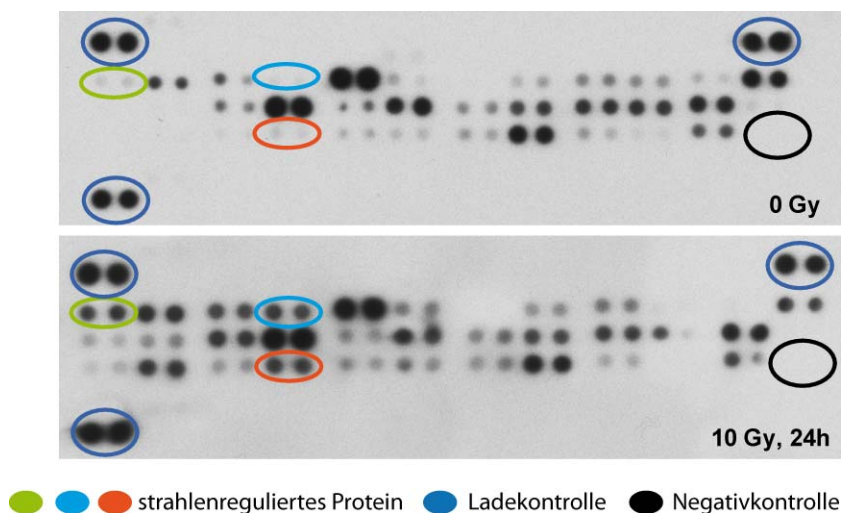


Abbildung 16: Beispiel eines *Human Apoptosis Array* zum Nachweis apoptose-relevanter Proteine. Die Arrays wurden mit 400 µg Gesamtzellextrakt inkubiert und die Zielproteine wurden nach den Angaben des Herstellers detektiert.

Die Analysen erfolgten in 20 Zelllinien, die drei fehlenden Linien waren nicht mehr kultivierbar. Von den 35 auf dem Array vorhandenen Proteinen konnten in den LCLs 16 Proteine reproduzierbar detektiert werden. Tabelle 5 zeigt die mittleren Veränderungen der analysierten Proteine in LUCY und KORA Linien. Die Analyse der Expression dieser 16 Proteine deutet neben der erwarteten Beteiligung von mitochondrialen Apoptosewegen auch auf die Beteiligung von Rezeptor-vermittelten Prozessen in der strahleninduzierten Apoptose hin (siehe Anhang). Als Indikatoren für die Aktivierung mitochondrialer Apoptoseprozesse konnte die Phosphorylierung von p53 an Ser-15, Ser-46 und Ser-392 in KORA- und LUCY-Linien nachgewiesen werden. Als Indikatoren für Rezeptor-vermittelte Prozesse zeigten die Rezeptoren TRAIL1, TRAIL2 und TNFR1 klare Expressionsveränderungen nach Bestrahlung. Ein Unterschied zwischen KORA- und LUCY-Linien wurde in der Expression des antiapoptotischen Proteins XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) und des TNFR1 Rezeptors detektiert. XIAP wird stärker in KORA Linien exprimiert (4 und 24 h). TNFR1

(*tumor necrosis factor receptor 1*) wird in LUCY Linien in seiner Expression durch Strahlung erhöht, in KORA Linien eher erniedrigt. TNFR1 kann sowohl proapoptotische als auch pro *survival* Signalwege induzieren, wann welcher Weg aktiviert wird, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Daher kann nach derzeitigem Kenntnisstand aus der Expression von TNFR1 kein Rückschluss auf das Apoptoseverhalten gezogen werden.

Tabelle 5: Mittlere Induktion von Apoptose-relevanten Proteinen nach Bestrahlung in LUCY- und KORA-Linien relativ zur unbestrahlten Kontrolle. Signifikant veränderte Proteine sind farbig markiert (Student's t-test $p < 0.05$)

	LUCY		KORA	
	2 h	24 h	2 h	24 h
BAD	0.81283995	1.47289259	1.19550701	1.22934161
BAX	0.6409562	1.28133344	1.15850423	1.65195494
Bcl-2	0.96238756	0.68436148	1.27465922	1.03134262
Bcl-x	1.12440546	1.59728825	1.20243917	1.95826803
cl-Casp-3	3.92832741	4.17678851	2.67749458	5.49406345
CytoC	1.0180197	1.1537818	0.96583255	1.02110038
TRAIL-R1	0.83949921	2.04297254	2.69262198	1.29288541
TRAIL-R2	0.97776778	1.33393251	1.82150218	3.1304471
FADD	0.98537674	0.77415968	1.87763502	1.53796469
FAS	1.01393767	0.93217447	0.91802707	0.99563906
p53(S15)	1.67977576	1.30900165	1.97741712	1.82323681
p53(Ser46)	9.11956796	5.25677142	5.14437239	5.48314594
p53(S392)	10.6292532	3.54925687	3.89452128	2.16046807
SMAC	1.21150692	1.13161887	0.94458808	0.96393877
TNFR1	1.65436396	1.59187725	0.57029852	0.73189055
XIAP	0.95603049	1.14685772	1.44843344	1.55533325

erhöhte relative Expression
 erniedrigte relative Expression

Um das Apoptoseverhalten mit eventuellen Unterschieden in der Proteinexpression zu korrelieren, wurde die Proteinexpression von vier hochapoptotischen mit der Expression in vier niedrig apoptotischen Linien verglichen. Das Ergebnis ist in Abb.17 gezeigt. 2 h nach Bestrahlung konnte für die Proteine Bcl-2, FADD und XIAP eine höhere Expression in den Linien mit geringerer Apoptoseinduktion festgestellt werden. Bcl-2 ist ein antiapoptotisches Protein, welches die Cytochrome C-Freisetzung aus den Mitochondrien reguliert. Eine höhere Expression von Bcl-2 verhindert die Cytochrome C-Freisetzung und wirkt so der Apoptose entgegen. Auch eine erhöhte Expression von XIAP steht im Einklang zu einer geringeren Apoptoseinduktion. Zur Suppression der Apoptose bindet XIAP an die Tumor-Nekrose-Faktor assoziierten Faktoren TRAF1 und TRAF2. Außerdem inhibiert dieses Protein mit Caspase-3 und Caspase-7 mindestens zwei Mitglieder der Caspasen Familie. Die Funktion von FADD (Fas associated via death domain) ist weniger offensichtlich. Als Bestandteil des *death induced signaling complex* (DISC) ist FADD an der Induktion von Apoptose durch Todesrezeptoren beteiligt und sollte damit die Apoptose unterstützen. Da

aber der Todesrezeptor TNFR1 keine erhöhte Expression zeigt, bleibt möglicherweise auch eine erhöhte Expression von FADD ohne Folgen. Außerdem sind an den DISC vermittelten Prozessen auch die XIAP regulierten Proteine TRAF1 und TRAF2 beteiligt. Möglicherweise findet durch diese Proteine wiederum eine Regulation FADD/DISC vermittelter proapoptotischen Vorgänge statt.

Im Einklang zu den Expressionsdaten 2 h nach Bestrahlung ist die Expression von Bcl-2, FADD und XIAP in Linien mit geringerer Apoptose nach 24 h immer noch erhöht (Abb. 18). Weiterhin ist nach 24 h in den Linien mit niedriger Apoptose der TRAIL2 Rezeptor in seiner Expression erhöht.

3.2.4 Zusammenfassung

Diese Versuche haben gezeigt, dass ionisierende Strahlung, Etoposid und H₂O₂ in LCLs Apoptose auslöst. Bei allen drei Agentien findet man in beiden Kollektiven eine Normalverteilung in der Apoptoseinduktion. Zwischen KORA und LUCY Linien konnten nur wenige signifikante Unterschiede in der Apoptoseinduktion bestimmt werden. Interessanterweise löst die gleiche Menge an DNA Doppelstrangbrüchen, die durch Etoposid induziert wird, weniger Apoptose aus als eine äquivalente durch Strahlung induzierte Schadensmenge. Dies weist daraufhin, dass ein großer Anteil an der strahleninduzierten Apoptose nicht durch direkte schadensvermittelte Prozesse induziert wird. In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, ob unterschiedliche Strukturen der DNA Doppelstrangbrüche, wie der Zustand der Bruchenden diese Unterschiede begründen. Die Analyse der Proteinexpression Apoptose-relevanter Proteine zeigte, dass mitochondriale und rezeptor-vermittelte Prozesse in der strahleninduzierten Apoptose aktiv sind. Ein Vergleich der Proteinexpression in LUCY und KORA Linien ergab eine unterschiedliche Regulation von TNFR1 und XIAP. Ein Vergleich der Proteinexpression zwischen Linien mit hoher und Linien mit niedriger Apoptoseinduktion zeigte Unterschiede in der Expression von Bcl-2, FADD und XIAP. Diese Proteine sollten auf ihr Potential als Biomarker für Apoptoseinduktion weiter analysiert werden.

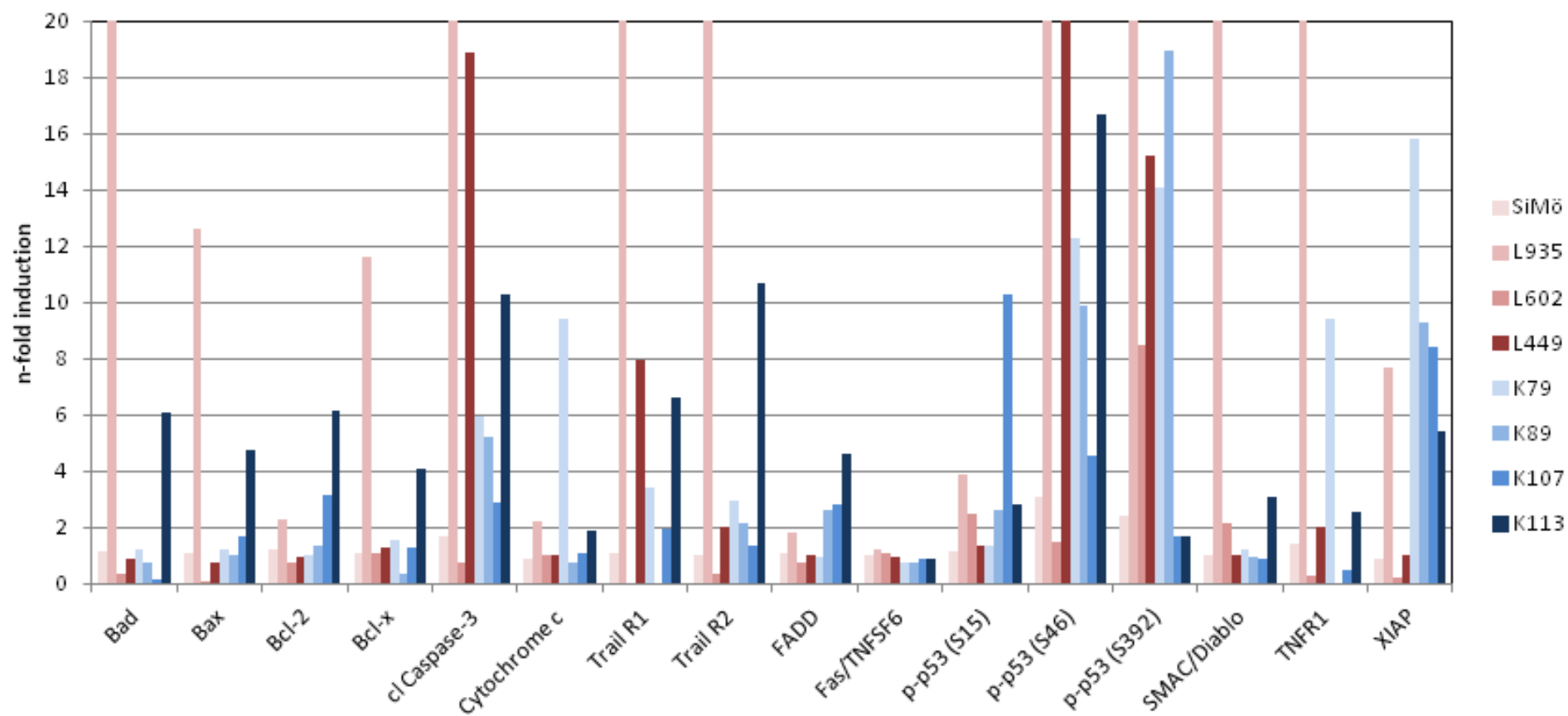


Abbildung 17: Vergleich der relativen Expression von apoptose-relevanten Faktoren in LUCY- und KORA Zelllinien mit unterschiedlichem Apoptoseverhalten 2 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy.

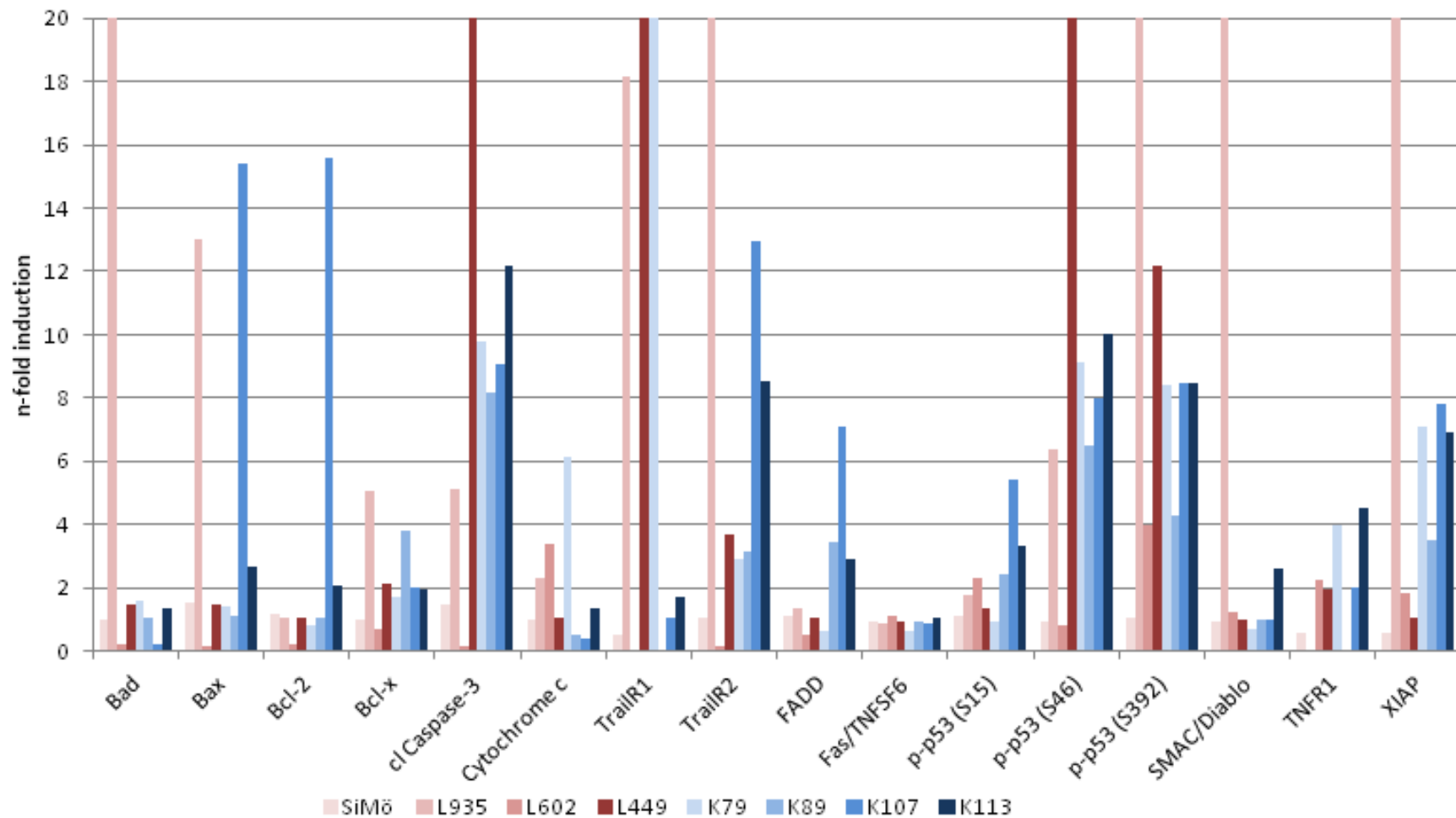


Abbildung 18: Vergleich der relativen Expression von apoptose-relevanten Faktoren in LUCY- und KORA Zelllinien mit unterschiedlichem Apoptoseverhalten 24 h nach der Bestrahlung mit 10 G

3.3 Netzwerk strahleninduzierter apoptotischer Prozesse

Ein Ziel dieses Vorhabens war es, aus den Einzelbefunden ein übergreifendes Modell für das Netzwerk strahleninduzierter Apoptose zu erstellen. Aus den Daten der Modellsysteme konnte klar die große Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR für die Einleitung von Apoptose abgeleitet werden. Dies bestätigt bekannte Befunde, die zeigten, dass EGFR in der Lage ist das Zellüberleben, den Zelltod und die Zellteilung zu regulieren und dass EGFR Inhibitoren vielversprechende Therapeutika darstellen, um die anti-Tumor Aktivität gegenüber ionisierender Strahlung zu erhöhen (Toulany M., 2010, Baumann M. 2007). Als weitere wichtige Faktoren, deren Inhibierung zu einer erhöhten Apoptose führen, konnten in dieser Studie mit dem Insulin-Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGFR1) ein weiterer Wachstumsfaktorrezeptor und mit der *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) ein Bestandteil des MAP Kinase Pathways identifiziert werden. Weiterhin erhöht auch eine Inhibierung von p53 die Apoptose. Als Faktoren deren Blockierung zu verringerter Apoptose führt, wurde der *Apoptotic protease activating factor 1* (Apaf1) und Caspase-8 gefunden. Apaf1 ist zusammen mit Cytochrom C an der Aktivierung von Caspase-9 beteiligt und damit ein Faktor, der wichtig ist für die mitochondrial-vermittelte Apoptose (Bratton SB., 2010). Caspase-8 wird durch Rezeptor-vermittelte Prozesse aktiviert (Ashkenazi, A., 1999). Da für diese Faktoren auch ein einheitlicher effizienter Knockdown nachgewiesen wurde, ist eine Abschätzung des quantitativen Einflusses auf die Apoptose hier möglich. Unsere Daten zeigen eine um 2-mal höhere Apoptose nach der Blockierung von EGFR und IGFR1, der quantitative Einfluss von ASK1 mit einer Erhöhung von 1.5 ist geringer. Möglicherweise ist dies in der Vielzahl von MAP Kinasen begründet, die zumindest teilweise die Funktion von ASK1 ersetzen können. Ein zu ASK1 ähnlicher Einfluss wurde für p53 gemessen. Mit einer Reduktion um den Faktor 0.5 wurde für Caspase-8 der deutlichste Einfluss bestimmt, die Inhibierung von Apaf1 führte lediglich zu einer Reduktion um 0,8. Diese Daten zeigen den deutlichen Beitrag von rezeptor-vermittelten Prozessen in der strahleninduzierten Apoptose, Der erhebliche Beitrag rezeptor-vermittelter Prozesse wird auch durch die Ergebnisse der Proteinexpressionanalysen von LUCY- und KORA-Linien bestätigt. Der Vergleich zwischen DNA-schadensvermittelter und DNA-schadensvermittelter /ROS-vermittelter Apoptose findet durch Vergleich von Etoposid-induzierter und strahlen-induzierter Apoptose statt. Hierbei wurde eine zu 10 Gy äquivalente Dosis an Etoposid eingesetzt, die eine identische Anzahl von DNA Schäden induziert. Dabei konnten wir in drei von vier untersuchten Systemen eine 2-mal höhere Apoptose nach Strahleninduktion verzeichnen. Da Etoposid keine ROS induziert und in HeLa Zellen eine äquivalente Induktion von DNA Schäden durch die verwendeten Dosen nachgewiesen wurde, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Hälfte der strahleninduzierten Apoptose durch ROS vermittelt wird. In weiteren

Untersuchungen, wie z. B. Bestimmung der strahleninduzierten Apoptose bei gleichzeitigem Einsatz von ROS Scavenger sollte nun der Beitrag der ROS-vermittelten Apoptose weiter abgeklärt werden. Außerdem sollte jetzt die Expression der in den Modellsystemen identifizierten Faktoren in Patientenzelllinien analysiert werden.

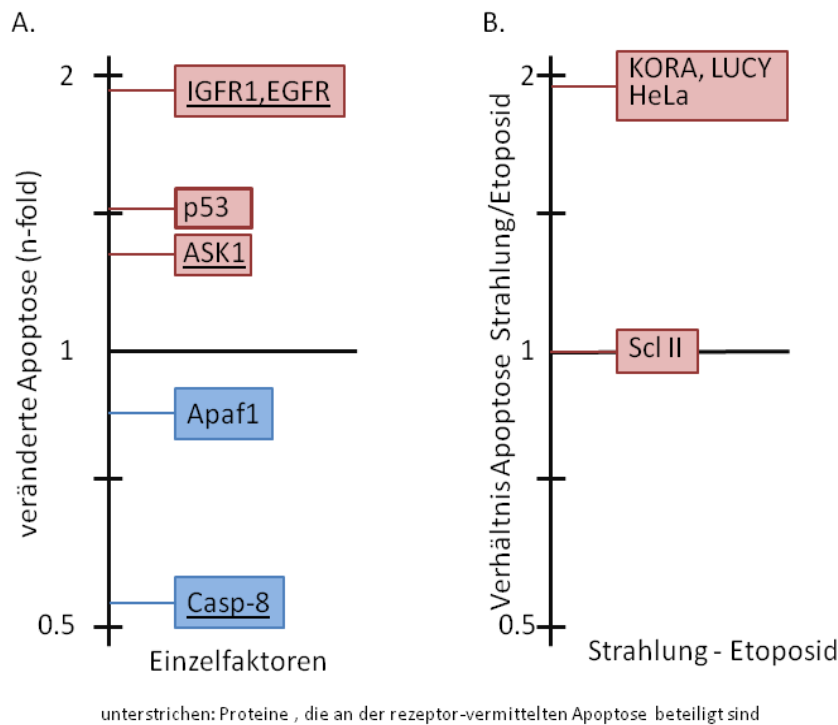


Abbildung 19: Zusammenfassende Darstellung von Ergebnissen dieser Studie zur Induktion von strahleninduzierter Apoptose. (A.) Veränderung der Apoptose durch Knockdown von Einzelfaktoren in den Modellsystemen (B.) Unterschied zwischen Strahlen- und Etoposid-induzierter Apoptose in den verwendeten Zellsystemen nach Induktion einer äquivalenten Menge an DNA-Schäden.

Toulany M, Rodemann HP. Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation. *Nuklearmedizin*. 2010;49 Suppl 1:S26-30. Review

Baumann M, Krause M, Dikomey E, Dittmann K, Dörr W, Kasten-Pisula U, Rodemann HP. EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol*. 2007 Jun;83(3):238-48. Review

Ashkenazi, A., and V.M. Dixit. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 11:255-260.

Bratton SB, Salvesen GS., Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*. 2010 Oct 1;123(Pt 19):3209-14. Review.

4 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Thomas Blunder, Diplomarbeit, Ludwig-Maximiliansuniversität München, (2009) Etablierung eines experimentellen Systems zur Analyse strahleninduzierter Apoptose in Suspensionszelllinien

Marita Angermeier, Vortrag, Association for Radiation Research Annual Meeting, Glasgow UK, (2009) Analysis of molecular mechanisms of radiation-induced apoptosis

Marita Angermeier, Hedda Eichholtz-Wirth, Sabine Hornhardt, Friederike Eckardt-Schupp, Simone Moertl, Posterbeitrag, GBS Jahrestagung Essen (2009), Analysis of molecular mechanisms of radiation-induced apoptosis in LCL

M. Angermeier, H. Eichholtz-Wirth, T. Blunder, S. Hornhardt, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl, Posterbeitrag, workshop women in radiation sciences, München (2009) Analysis of molecular mechanisms of radiation-induced apoptosis.

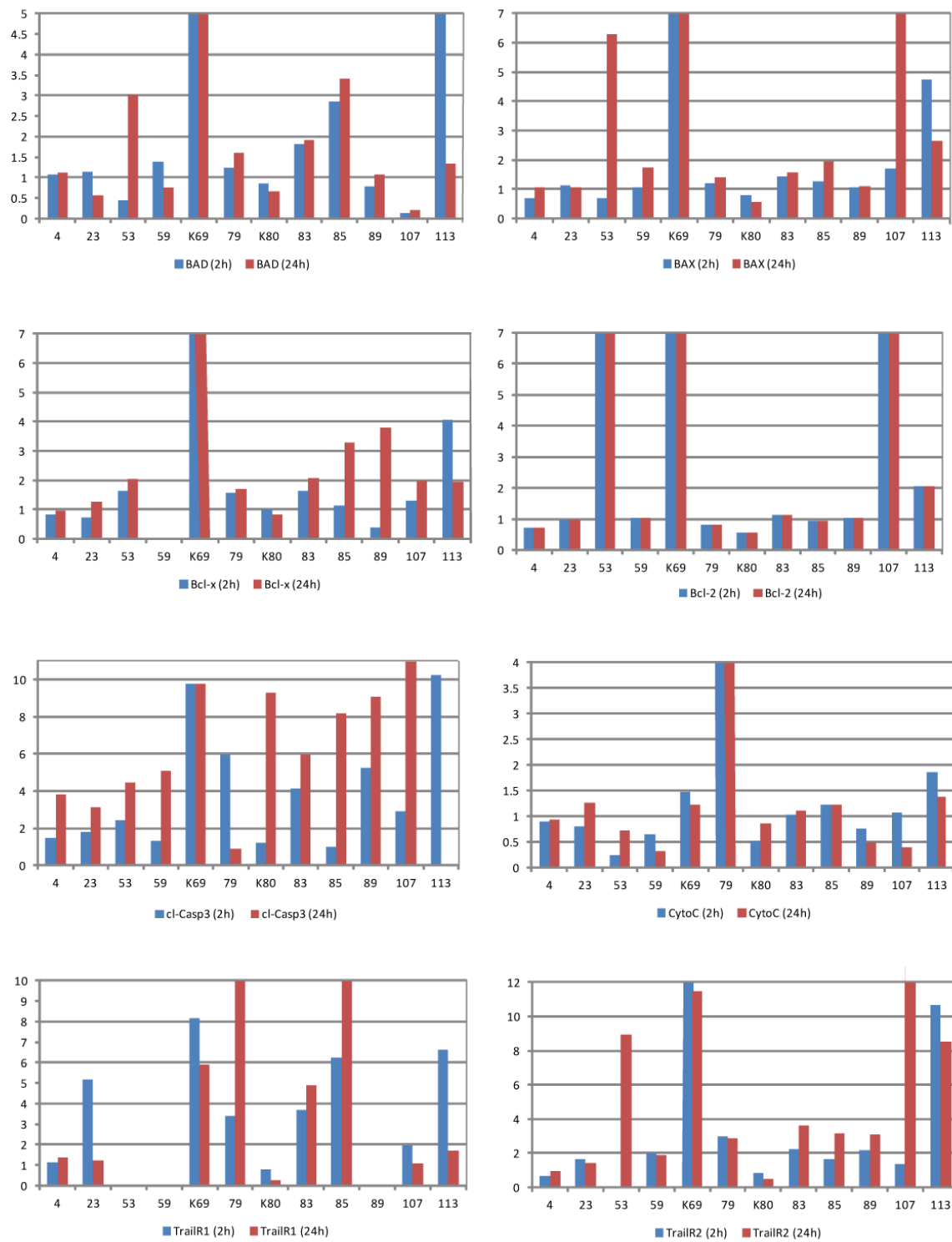
Marita Angermeier, Michael Atkinson, Simone Moertl
Quantitative contributions of apoptosis-related factors on radiation-induced apoptosis
Manuskript in Vorbereitung

Marita Angermeier, Michael Atkinson, Simone Moertl
Expression of apoptosis-related factors in a lung cancer patient collective differing in radiation-induced apoptosis
Manuskript in Vorbereitung

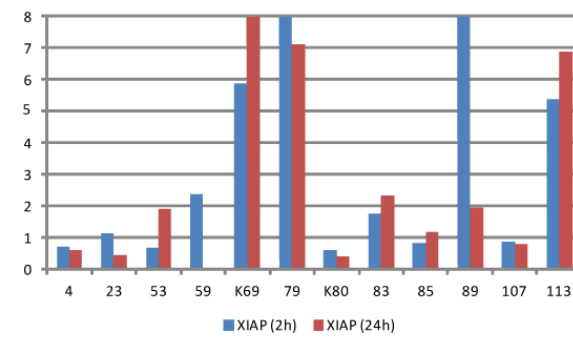
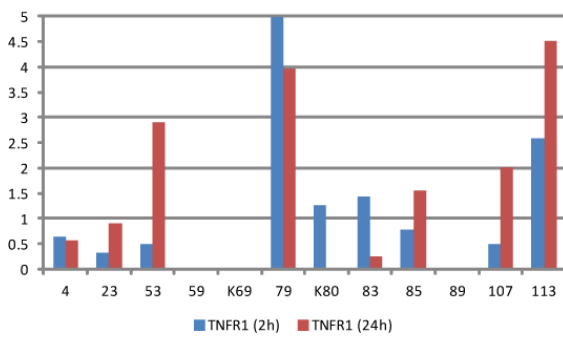
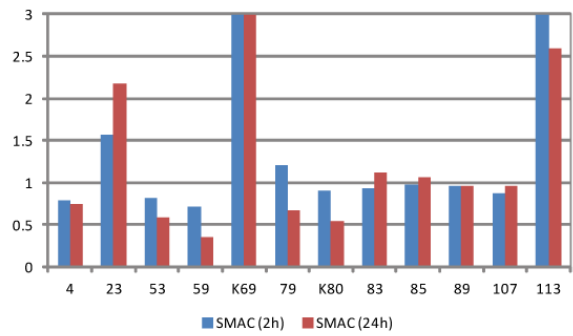
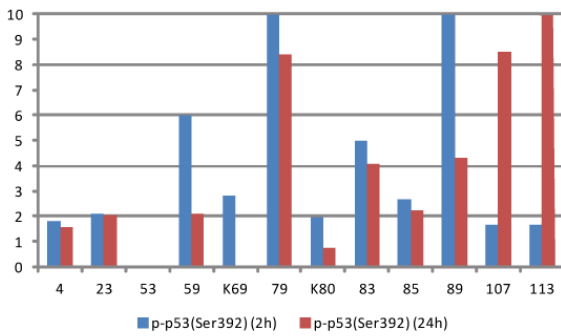
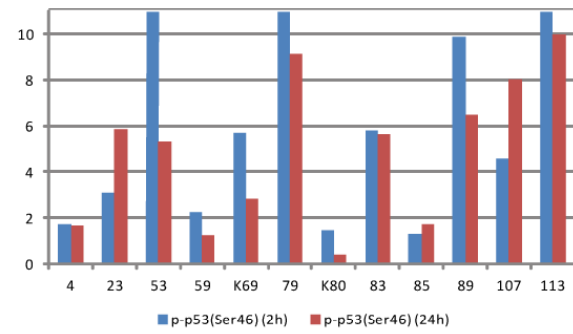
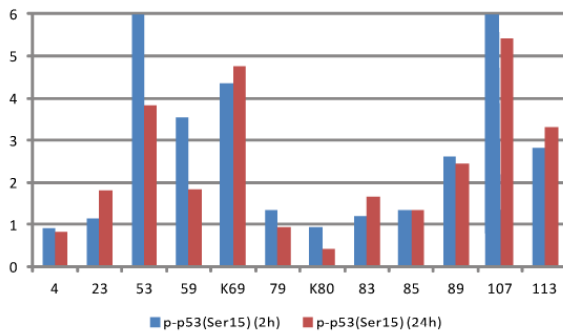
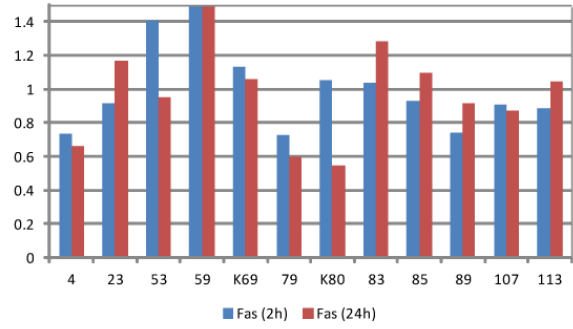
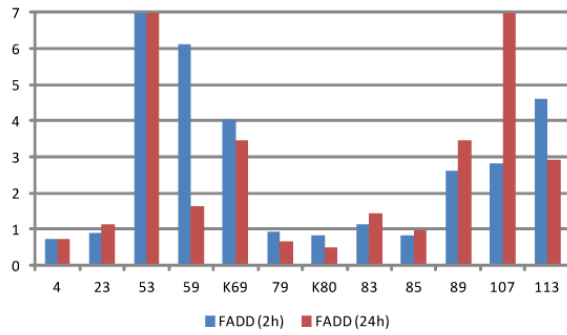
5 Anlagen

5.1 Abbildungen: Strahlenabhängige Regulation apoptose-relevanter Proteine

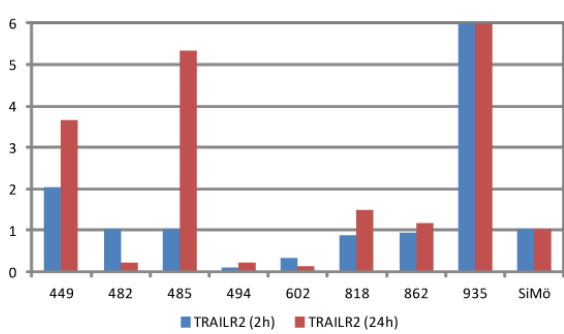
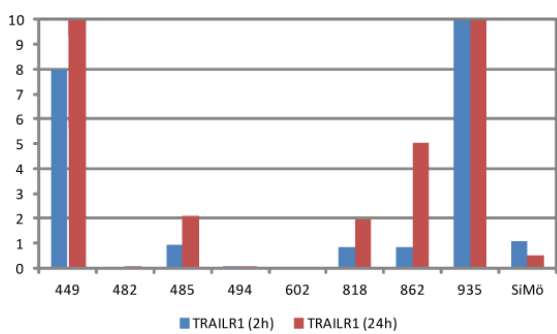
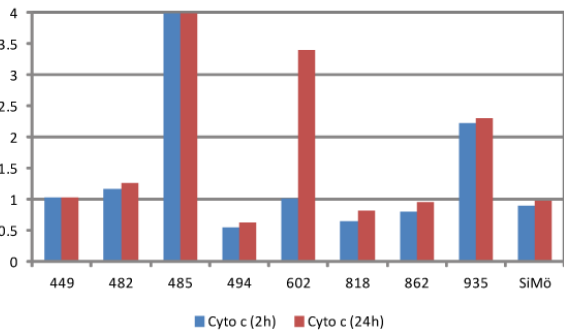
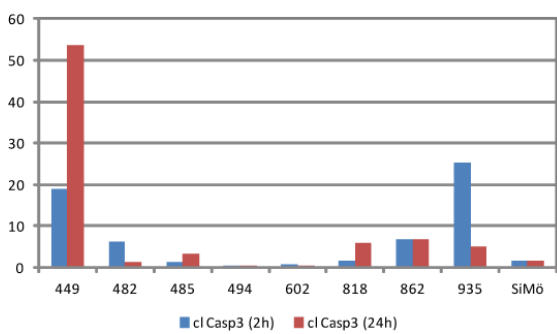
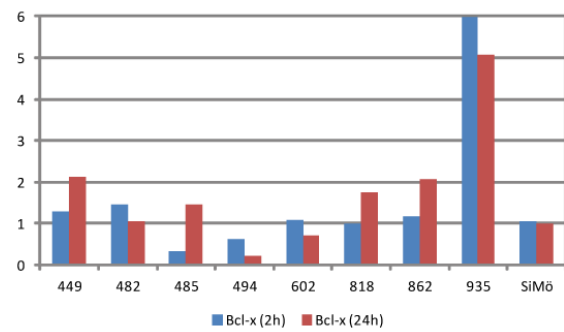
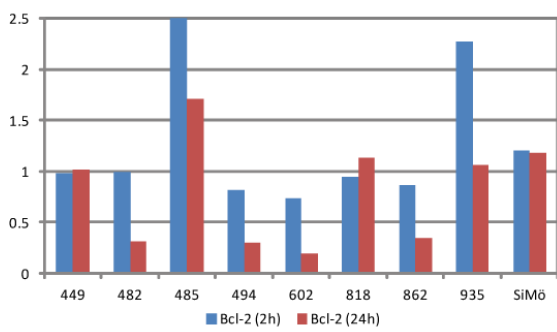
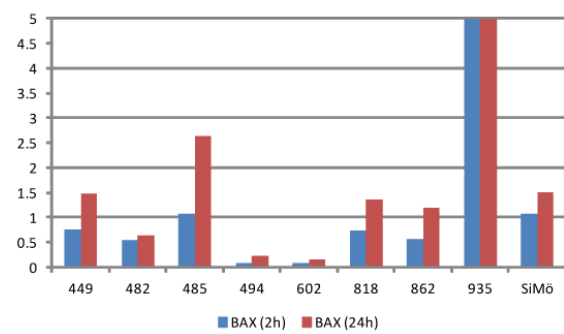
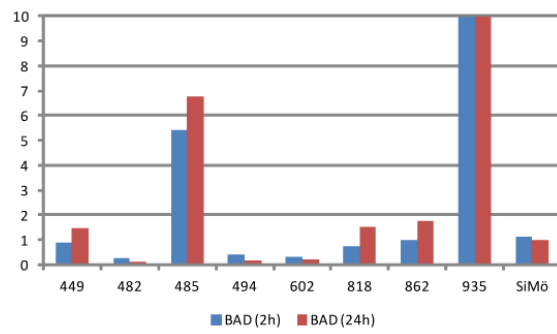
5.2 Erfolgskontrollbericht



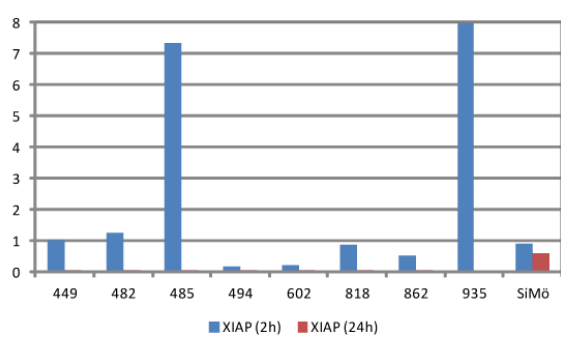
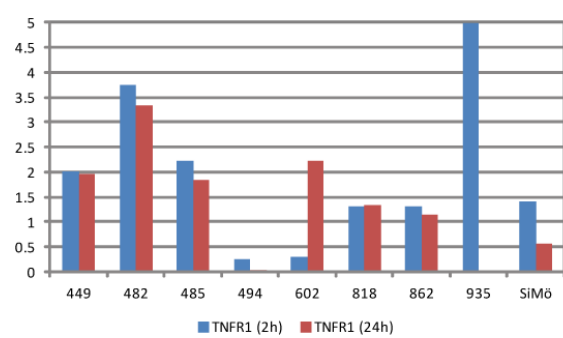
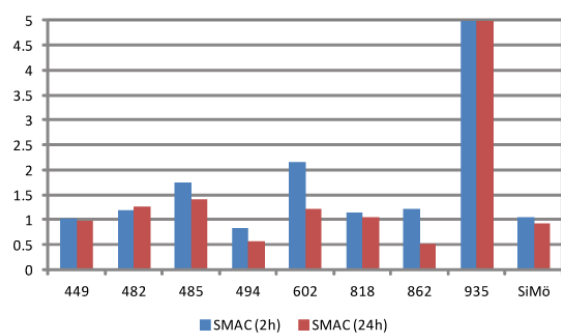
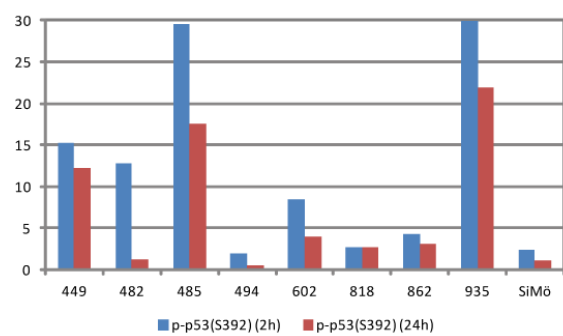
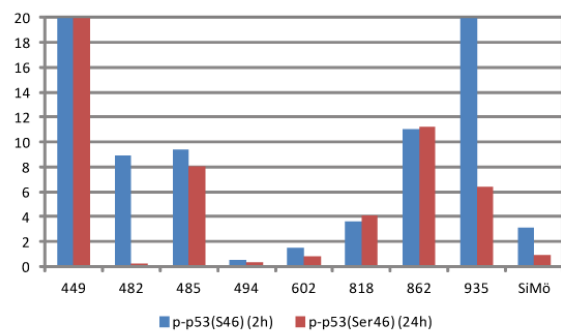
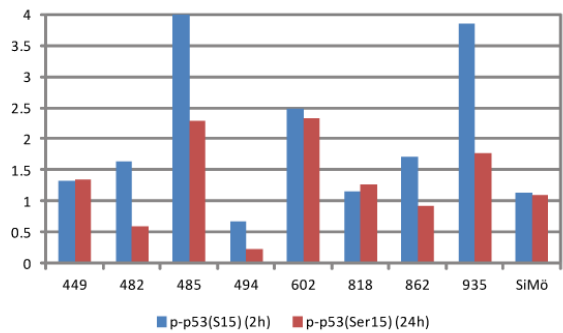
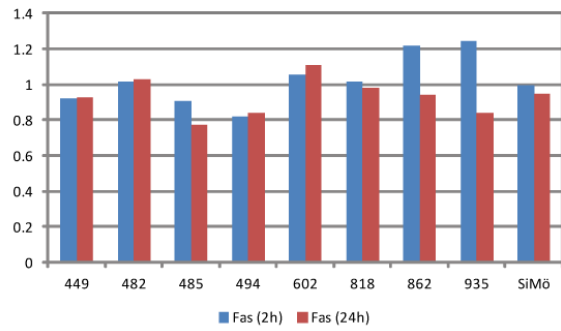
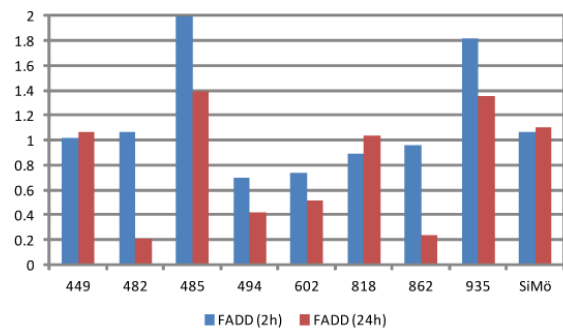
Anlage 1: Proteinexpression I in KORA-Linien nach der Bestrahlung mit 10 Gy



Anlage 2: Proteinexpression II in KORA-Linien nach der Bestrahlung mit 10 Gy



Anlage 3: Proteinexpression I in LUCY-Linien nach der Bestrahlung mit 10 Gy



Anlage 4: Proteinexpression II in LUCY-Linien nach der Bestrahlung mit 10 Gy

Funktionelle Analyse molekularer Mechanismen der strahleninduzierten Apoptose, die nicht über direkte DNA-Schäden vermittelt werden

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Apoptose ist ein wichtiger genetisch definierter Parameter für individuelle Strahlenempfindlichkeit. Erhöhte Empfindlichkeit von Individuen gegenüber Strahlung kann durch verstärkte Apoptose verursacht sein, während Probleme der Resistenzbildung von Tumoren durch reduzierte Apoptose bedingt sein können. Daher sind sowohl für den Strahlenschutz als auch für eine optimale Strahlentherapie verbesserte Kenntnisse der unterschiedlichen molekularen Mechanismen der strahleninduzierten Apoptose und deren Regulation von großer Bedeutung.

2. Wissenschaftliche Ergebnisse und wesentliche Erfahrungen des Vorhabens

a. Die Analyse von einzelnen apoptose-relevanten Faktoren in den Modellzellkultursystemen ergab eine große Bedeutung von EGFR für die Apoptoseinduktion. Zusätzlich wurde auch Caspase-8 als wichtige Komponente bei der strahleninduzierten Apoptose identifiziert. Da Caspase-8 ein Schlüsselprotein bei der Vermittlung Rezeptor-induzierten Prozessen ist spiegelt dieses Ergebnis die Bedeutung von Rezeptoren und deren Signalkaskaden für die strahleninduzierte Apoptose wieder. Als Schwierigkeit bei der quantitativen Auswertung stellte sich die unterschiedliche Güte der Knockdowns heraus. Deshalb könnten nicht alle angestrebten Faktoren analysiert werden.

b. Etoposidbehandlung generiert keine reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen

c. Eine äquivalente Dosis von DNA-Doppelstrangbrüchen führt bei Induktion durch Etoposid zu weniger Apoptose als bei Induktion durch ionisierende Strahlung. Dies weist auf einen zusätzlichen Beitrag von indirekten Strahleneffekten auf die Apoptose hin. Eine grobe quantitative Abschätzung deutet einen um bis zu 2-fach erhöhte Apoptose bei gleicher DSB-Induktion an.

c. Mit dem in diesem Vorhaben etablierten TBARS-Assay gelang der Nachweis von strahleninduzierter Lipidperoxidation. Lipidperoxide konnten im Zellkulturüberstand und in Zellysaten nachgewiesen werden. Die Analyse verschiedener Zeitpunkte nach Bestrahlung zeigte das transiente Vorhandensein dieser Verbindungen. Die Bestimmung von Lipidperoxiden in hoch-bzw. niedrig-apoptotischen Zelllinien zeigte keine Unterschiede.

d. Mit den im Vorhaben angewendeten Assay konnten innerhalb des Probenkollektives deutliche interindividuelle Unterschiede bezüglich der Apoptoseinduktion nach ionisierender Bestrahlung und nach Etoposidbestrahlung festgestellt werden. Der Vergleich zwischen primären und immortalisierten Zellen zeigte, dass sich die beiden Zellsysteme deutlich voneinander unterscheiden und die EBV-immortalisierten Zelllinien nur bedingt für mechanistische Untersuchungen geeignet sind. Lymphoblastoide Zellen sind nach den vorliegenden Ergebnissen nicht als Ersatz für primäre Lymphozyten geeignet.

Linien die nach Bestrahlung eine hohe bzw. niedrige Apoptoseinduktion zeigten, zeigten dies auch nach Etoposid oder Wasserstoffperoxid-Behandlung. Dieses anscheinend stabil in den Zellen verankerte Apoptoseverhalten von lymphoblastoiden Zelllinien sollte mit weiteren apoptose-induzierenden Agenzien untersucht werden.

e. Die Analyse der Proteinexpression apoptose-relevanter Proteine zeigte, dass mitochondriale und rezeptor-vermittelte Prozesse in der strahleninduzierten Apoptose aktiv sind. Ein Vergleich der Proteinexpression in LUCY und KORA Linien ergab eine unterschiedliche Regulation von TNFR1 und XIAP. Ein Vergleich der Proteinexpression zwischen Linien mit hoher und Linien mit niedriger Apoptoseinduktion zeigte Unterschiede in der Expression von Bcl-2, FADD und XIAP. Diese Proteine sollten auf ihr Potential als Biomarker für Apoptoseinduktion weiter analysiert werden.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Zum jetzigen Zeitpunkt des Projekts sind keine Erfindungs-/Schutzanmeldungen geplant. Die bisherigen Ergebnisse stellen jedoch eine gute Ausgangsbasis für weitere Analysen dar und werden für weitere Forschungsprojekte genutzt werden.

4. Arbeiten, die zu keinen Lösungen geführt haben

Laut Antrag sollte die Rolle der Lipidperoxidation für die strahleninduzierte Apoptose durch Komplexierung von Fe^{3+} durch Zugabe von Deferoxaminmesylat studiert werden. Die Zugabe von Deferoxaminmesylat war jedoch für HeLa Zellen toxisch. Alternative Methoden konnten im Rahmen dieses Antrags aus Zeitgründen nicht eingesetzt werden. Im Antrag war vorgesehen verschiedene Suspensionzelllinien zu untersuchen. Wir haben mit TK6, Jurkat und 721-Zelllinien drei verschiedene Modelle getestet, jedoch waren nur Jurkat-Zellen für die vorgesehenen Versuche geeignet. Aus Zeitmangel konnten keine weiteren Systeme getestet werden.

5. Präsentationsmöglichkeiten

Die erhobenen Befunde werden sowohl auf Fachkongressen als auch durch Publikation in geeigneten Fachzeitschriften veröffentlicht. Alle Abbildungen werden als Powerpoint oder pdf-File zur Verfügung gestellt.

6. Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung

a. Zeitplan

Der Zeitplan wurde weitgehend eingehalten. Durch den zwischenzeitlichen Mutterschaftsurlaub der angestellten Wissenschaftlerin und einer vorzeitigen Kündigung der technischen Assistentin zum 30.09.2010 konnte die Laufzeit des Projekts kostenneutral bis zum 30.06.2011 verlängert werden. Alle experimentellen Messungen konnten somit im angepassten Zeitfenster abgeschlossen werden.

b. Finanzplan

Beide Stellen konnten zum Projektstart besetzt werden. Nach dem Ausscheiden der technischen Assistentin wurde die Stelle für die verbleibenden 3 Monate nicht wieder besetzt. Die freien Personalmittel wurden für die kostenneutrale Verlängerung des Projekts und damit für die Beschäftigung der Wissenschaftlerin eingesetzt. Die beantragten Verbrauchs- und Reisemittel wurden gemäß Antrag verbraucht.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz