

**Molekularbiologische Untersuchungen**  
**an**  
**Weichteilsarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem**  
**p53-Genstatus nach Bestrahlung**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Matthias Bache  
geb. am 05. August 1968 in Wolfen

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Rudolph
2. Prof. Dr. D. van Beuningen
3. Dr. rer. nat.-habil. H. Taubert (mein Doktorvater)

Halle(Saale), 23.11. 2000

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Molekulare Ansätze in der Strahlentherapie	1
1.2	Das TSG p53 - ein Regulator der zellulären Strahlenantwort	5
1.3	Apoptoseinduktion, p53-Genstatus und Strahlensensitivität	7
1.4	G2/M-Zellzykluskontrolle und Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung	10
1.5	Das TSG p53 - ein prognostischer Marker in Weichteilsarkomen	13
1.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
2.1	Zelllinien, Herkunft und p53-Genstatus	17
2.2	Geräte und Verbrauchsmittel	19
2.3	Chemikalien, Feinchemikalien, Enzyme und Analysekits	19
2.4	Antikörper und Chemotherapeutika	20
2.5	Puffer und Lösungen	21
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
3.1	Zellkultivierung und Zellpassagierung	24
3.2	Bestrahlung	24
3.3	Strahlenbiologische Untersuchungen	25
3.3.1	Zellwachstum und Zellvitalität	25
3.3.2	Ermittlung der Strahlensensitivität mit dem Zellkoloniebildungstest	26
3.3.3	Apoptoseanalyse	28
3.3.3.1	DAPI-Analyse - morphologische Analyse des Zellkerns	28
3.3.3.2	TUNEL-Test - enzymatische Analyse von DNS-Fragmenten	29
3.3.3.3	Kombination von TUNEL-Test und DAPI-Analyse	30
3.3.3.4	DNS-Leiter-Assay - elektrophoretische Analyse von DNS-Fragmenten	30

3.3.3.5	Annexin-V-Test - Analyse von Umbauten der Zellmembran	31
3.3.4	Zellzyklusanalyse	32
3.3.5	Analyse der strahleninduzierten Genexpression	33
3.3.5.1	Proteinisolation	33
3.3.5.2	Proteinbestimmung nach Lowry	34
3.3.5.3	Westernblotanalyse	34
3.3.6	Flowzytometrische P53-Bestimmung	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in zwei WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus	37
4.1.1	Einfluß der Strahlendosis auf Zellwachstum und Zellvitalität	37
4.1.2	Einfluß der Strahlendosis auf Zellzyklus und Apoptoseinduktion	38
4.1.3	Apoptoseanalyse mit unterschiedlichen Methoden	41
4.2	Strahlenbiologische Charakterisierung von fünf humanen Sarkom- Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (wt, mt, null)	44
4.2.1	Darstellung der strahlenbiologischen Charakterisierung	44
4.2.2	Zellkoloniebildungstest, Platiereffizienz, Dosis-Überlebenskurve und strahlenbiologische Parameter	45
4.2.3	Apoptose- und Zellzyklusanalyse	47
4.2.4	Protein-Expression von p53 und p53-Targetgenen	49
4.2.5	Strahleninduzierte Protein-Expression in der Zelllinie A-204 (wt-p53)	51
4.2.5.1	Zeitliche Analyse	51
4.2.5.2	Flowzytometrische Analyse der P53-Expression	52
4.3	Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung mit Taxol und Koffein in zwei WTS-Zelllinien mit mt-p53	53
4.3.1	Einfluß von Taxol auf Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion, Zellkoloniebildungsrate und Strahlensensitivität	53
4.3.2	Einfluß von Koffein auf Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion, Zellkoloniebildungsrate und Strahlensensitivität	58

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1	Wertung der Untersuchungen zum Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in zwei WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus	64
5.2	Wertung der Ergebnisse zum Nachweis von Apoptose mit dem TUNEL-Test, der DAPI-Analyse, dem Annexin-V-Test und dem DNS-Leiter-Test	66
5.3	Wertung der Ergebnisse zur strahlenbiologischen Charakterisierung von fünf humanen Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (wt, mt, null)	69
5.3.1	Wertung der Ergebnisse zur Bestimmung der Strahlensensitivität in Abhängigkeit vom p53-Genstatus	69
5.3.2	Korrelation von G2/M-Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion und Strahlensensitivität	73
5.3.3	Wertung der strahleninduzierten Genexpression vom p53-Genstatus	77
5.4	Studien zur Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung mit Taxol und Koffein in zwei WTS-Zelllinien mit mt-p53 (US 8-93 und LMS 6-93)	80
5.4.1	Kombination der Bestrahlung mit einer Taxolbehandlung	80
5.4.2	Kombination der Bestrahlung mit einer Koffeinbehandlung	83
5.5	Wertung der Arbeitsstrategie und Ausblick	87
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>95</b>

## Abkürzungen, Einheiten und Begriffserläuterungen:

Abb.	Abbildung(en)
Abk.	Abkürzung(en)
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure(n)
AT	„ataxia-telangiectasia“
ATCC	„American-Type-Culture-Collection“, Amerikanische Zell- und Gewebe-Stammsammlung
bax	„bcl-x- aktivierendes-Protein“
bcl-2	„B-cell-Lymphoma-2- Protein“
bidest	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridine
BSA	„bovine-serum-albumin“, Rinderserumalbumin
ca.	circa
cAMP	„cyclic-AMP“, zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	„cyclin-dependent kinase“, Cyklin-abhängige Kinase
D10-Wert	Bestrahlungsdosis bei der 10 % der Zellen überleben
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DEA	Diethanolamin
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dest.	destilliertes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNT	Desoxydinucleotidtriphosphat
ds	„double-strand“, Doppelstrang
DTE	Dithioerythritol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	„enhancement-factor“, Verstärkungsfaktor
ELISA	„enzyme-linked-immunoabsorbent-assay“, Enzymimmuntest
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FACS	„fluorescence-activated-cell-sorting“, Durchflußzytometrie
FS	Fibrosarkom(e)
fs	Frameshift (Mutation mit Verschiebung des Leserasters)
FKS	Fötale Kälberserum
G2/M-Arrest	Anreicherung des Anteils an G2/M-Zellen durch eine temporäre Zellzyklusblockierung oder eine Verzögerung des Zellzyklus in der G2-Phase
Gadd 45	„growth-arrest-and-DNA-damage-gene“
Gln	Glutamin
Gy	Gray
Gluc	Glucose

HRP	„horseradish-peroxydase“, Merrettich-Peroxydase
IC50-Wert	Konzentration bei der 50 % der Zellen überleben
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LMS	Leiomyosarkom(e)
ln	Logarithmus (bei Basis e)
M	molar
mdm-2	„murine-double-minute-gene-2“
MFH	maligne(s) fibröse(s) Histiozytom(e)
MPF	„mitosis-promoting-factor“, CDK1(p34/CDC2)-Cyklin-B-Komplex
MPNST	maligne(r) periphere(r) Nervenscheidentumor(e)
mt	Mutante(n)- oder mutiert
n.b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleotide
o.g.	oben genannten
OS	Osteosarkom(e)
OT	Objekträger
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate-buffered-saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Platier-effizienz
PI	Propidiumjodid
POD	Peroxydase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PS	Phosphatidylserin
RMS	Rhabdomyosarkom(e)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„rotations-per-minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium-dodecyl-sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SF2-Wert	„survival-fraction“, Zellüberleben nach einer Strahlendosis von 2,0 Gy
ss	„single-stranded“, Einzelstrang
Tab.	Tabelle(n)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale Transferase
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TSG	Tumorsuppressor-Gen(e)
TUNEL	„terminal-uridin-nick-end-labeling“
U	Unit(s)
US	undifferenziertes Sarkom
wt	Wildtyp
WTS	Weichteilsarkom(e)
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Molekulare Ansätze in der Strahlentherapie

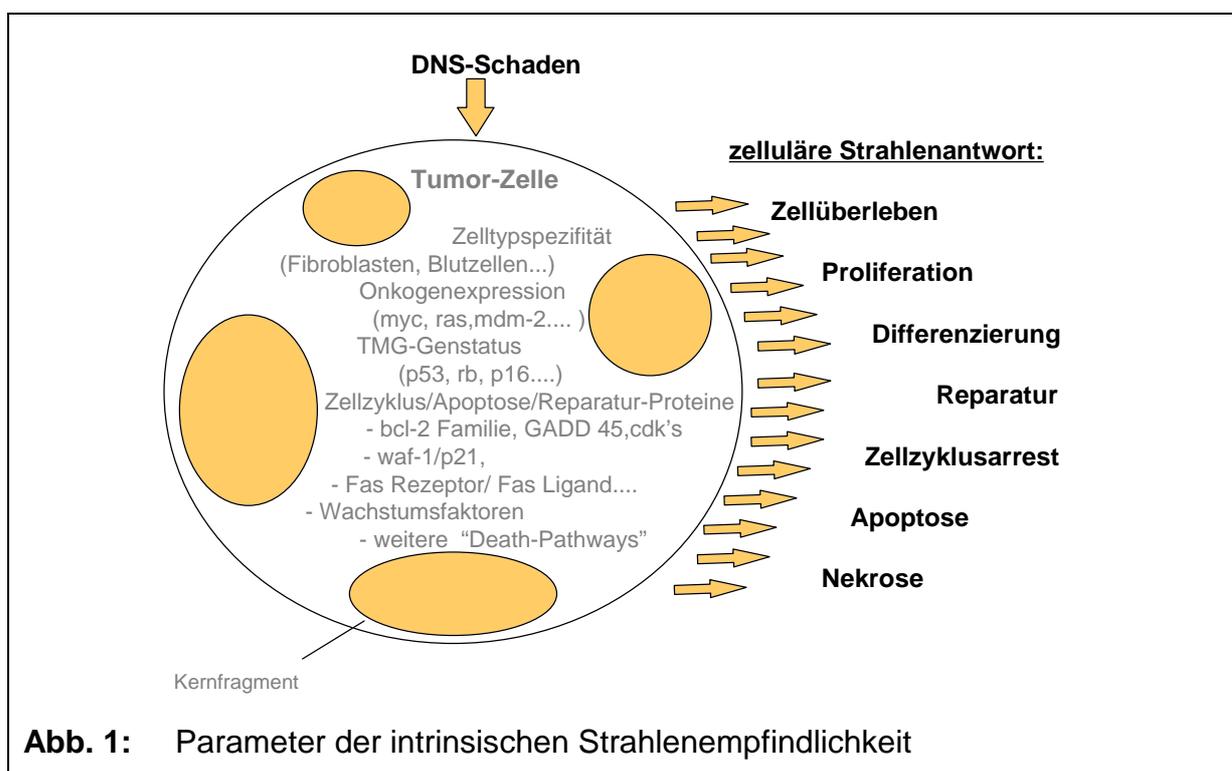
Ionisierende Strahlen finden in vielen Bereichen von Diagnostik und Therapie ihre Anwendung. Im Verlauf einer Tumorerkrankung erhalten ca. 50 % aller Patienten eine strahlentherapeutische Behandlung. Dabei kann die Strahlentherapie auf viele Behandlungserfolge verweisen. Vor allem durch die Anwendung multimodaler Therapiekonzepte und die technische Weiterentwicklung der Bestrahlungsgeräte wird eine zunehmend optimierte Bestrahlungsplanung möglich. Um jedoch die Therapieerfolge entscheidend weiter verbessern zu können, sind neue Ansätze erforderlich, die die Reaktion des Tumorgewebes noch deutlicher vom Normalgewebe unterscheiden (Rodemann et al., 1999).

Die Strahlenbiologie hat sich als Ziel gesetzt, die molekularen Mechanismen der **zellulären Strahlenwirkung** aufzuklären, um möglichst genaue Vorhersagen über den Erfolg bzw. das Risiko der Strahlentherapie für den einzelnen Patienten treffen zu können. Deshalb ist insbesondere die Suche nach prädiktiven Parametern, die Therapieentscheidungen erleichtern und individualisierbar machen, Gegenstand intensiver Forschung.

Ausgangspunkt aller biologischen Strahlenschäden sind Veränderungen der im Zellkern enthaltenen DNS, wobei 99,9 % der Strahlenschäden durch zelleigene Enzyme wieder repariert werden (Jung, 1998). Bekannt ist, daß Zellen nach einer Bestrahlung mit einem verzögerten oder arretierten Proliferationszyklus antworten. Dabei ermöglicht die Arretierung der Zelle in der G1- bzw. G2-Phase die Reparatur von DNS-Schäden vor der Replikation des genetischen Materials (Kastan et al., 1992, Lane et al., 1992) und der Zellteilung (Nagasawa et al., 1994). Schäden, die nicht oder falsch repariert werden, sind die Ausgangspunkte für die zelluläre Strahlenwirkung. Zellen besitzen generell die Fähigkeit, auf diese nicht- bzw. falschreparierten DNS-Schäden zu reagieren. Durch Inaktivierung der Teilungsfähigkeit (mitotischer Zelltod), Zellzyklusarrest oder den programmierten Zelltod (Apoptose) wird eine lokale Kontrolle über das Tumorwachstum erzielt. Zusätzlich können weitere benachbarte Zellen in den Untergang mitgerissen werden

(„bystander-Effekt“). Auch das Zellüberleben durch die Reparatur subletaler DNS-Schäden ist möglich, womit mutative Veränderungen der genetischen Information verbunden sein können (Strahlenrisiko).

In Tumoren liegen zwei große Gengruppen, die Onkogene und die Tumorsuppressor-Gene (TSG), häufig mutiert vor bzw. weisen Veränderungen in ihrer Expression auf (Weinberg, 1989). In der Regel sind die Onkogene in Tumoren durch eine Überfunktion gekennzeichnet („gain-of-function“), während die zumeist mutationsbedingte Inaktivierung der Tumorsuppressor-Gene zum Verlust der Genaktivität führt („loss-of-function“). Das dadurch ungebremste Wachstum einer Krebszelle beruht auf einer Störung der Gewebemöostase, dem Gleichgewicht von geregelter Zellteilung und programmiertem Zelltod. Verschiedene Signalwege, die die Apoptose in einer geschädigten, gealterten oder entarteten Zelle einleiten müßten, funktionieren in Krebszellen nicht mehr. Ebenso kann durch die Überexpression von Onkogenen oder durch einen Funktionsausfall von TSG die strahleninduzierte Signaltransduktion entscheidend modifiziert werden, was Veränderungen der **intrinsischen Strahlenempfindlichkeit** der Zelle zur Folge hat. Deshalb scheinen insbesondere die molekularen Veränderungen in den Tumorzellen entscheidend für den Erfolg einer strahlentherapeutischen Behandlung zu sein (Coleman, 1996, Hallahan, 1996, Maity et al., 1997, Crompton, 1998).



Wichtige Parameter, die die **intrinsische Strahlenempfindlichkeit** widerspiegeln, sind die Zellproliferation, die Zellzykluskontrolle, die Induktion von Apoptose, die DNS-Reparatur, die Zelldifferenzierung und das Zellüberleben (Abb. 1). Diese biologischen Zellparameter werden durch die strahleninduzierte Signaltransduktion beeinflusst. Insbesondere am G1/S-Übergang bzw. am G2/M-Übergang erfolgt eine Kontrolle durch das Zusammenwirken von zahlreichen Zellzyklus-, Apoptose- und Reparatur- Proteinen. Dabei steuern viele Genprodukte, die den Zellzyklus regulieren, auch die Induktion der Apoptose (Evan et al., 1995).

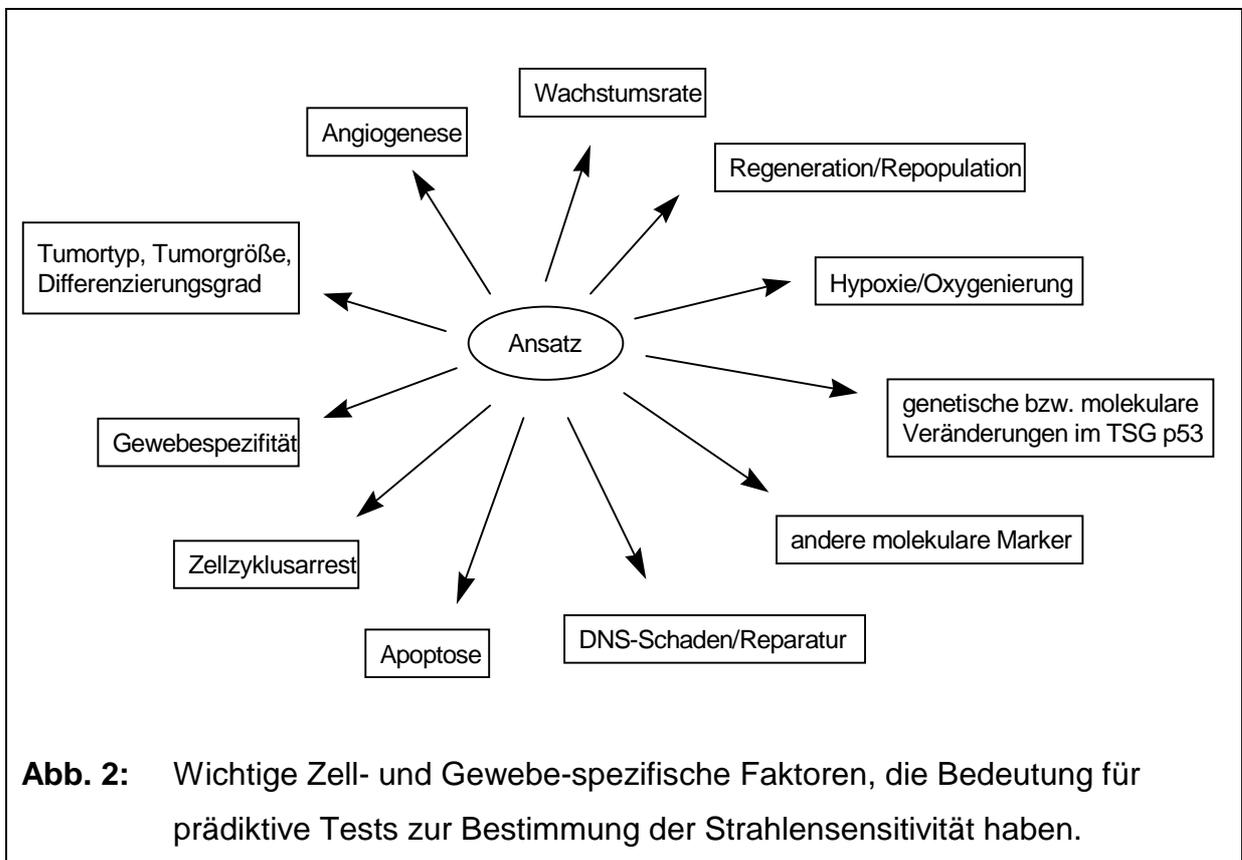
Für die Ermittlung der **zellulären Strahlenempfindlichkeit** sind neben der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit weitere Parameter, wie die Strahlenqualität, die Zellzyklusphase und die Sauerstoffversorgung der Zellen entscheidend. So zeigen beispielsweise die Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2-Phase und Mitose) eine unterschiedliche Strahlensensitivität (Sinclair, 1968). Ebenso scheinen die hypoxischen Zellen in humanen Tumoren für das Nichtansprechen einer konventionellen Strahlentherapie verantwortlich zu sein (Gatenby et al., 1988, Adams, 1990, Graeber et al., 1996).

Zelluläre Faktoren, die nach einer Strahlenreaktion das Überleben des Zellgewebes bestimmen, sind neben der intrinsischen Radiosensitivität, die Zellerholung, die Repopulierung und die Reoxygenierung (Withers, 1975). Ebenso ist die **Strahlenreaktion des Gewebes** durch gewebespezifische Parameter wie Tumorgroße, Tumortyp und Differenzierungsgrad gekennzeichnet. Um die prognostische Relevanz der einzelnen Faktoren von Zell- und Gewebs-Strahlenantwort zu überprüfen, werden insbesondere Zellkulturen und Tiermodelle als Modellsysteme eingesetzt.

Aktuelle Themen, die durch die Strahlenbiologie beantwortet werden sollen, sind:

- Warum sprechen histomorphologisch vergleichbare Tumore unterschiedlich auf Bestrahlung an? Gibt es molekulare Marker, die prognostisch relevant sind? Wie korrelieren diese mit den Parametern der zellulären Strahlenantwort?
- Gibt es geeignete Modellsysteme, um die Strahlensensitivität der Patienten individuell zu bestimmen?

- Mit welchen prädiktiven Tests lassen sich strahlensensible Patienten (z.B. AT-Patienten) herausfinden? Welche Faktoren sind für Bestimmung der Strahlensensitivität von Bedeutung? (siehe Abb. 2)
- Welche Tests sind in der klinischen Praxis als prädiktive Assays geeignet? - Neben der einfachen Durchführung sollten diese Tests schnelle Ergebnisse mit prognostischer Aussagekraft liefern bzw. eine klinische Entscheidung erlauben.
- Wie kann die Reaktion des Tumorgewebes noch deutlicher vom Normalgewebe unterschieden werden?
  - a) Kann ein strahlenresistenter Tumor gegenüber einer Bestrahlung sensibilisiert werden? Mögliche Ansätze sind die Kombination mit anderen Therapien wie der Chemotherapie und der Hyperthermie oder mit gentherapeutischen Ansätzen.
  - b) Wie kann das Normalgewebe geschützt werden (Radioprotektion)? Häufig ist der Erfolg der Strahlentherapie durch akute Nebenwirkungen des den Tumor umgebenden Normalgewebes limitiert.
- Welche strahlenbiologischen Spätreaktionen sind zu erwarten?



## 1.2 Das TSG p53 - ein Regulator der zellulären Strahlenantwort

Das humane p53-Gen ist ca. 20 kb groß und auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13) lokalisiert (Benchimol, et al., 1985, McBride et al., 1986, Miller et al. 1986, Isobe et al., 1986). Es kodiert ein 393 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, das ubiquitär in allen Zellen verbreitet ist. Das Tumorsuppressor-Gen (TSG) p53 ist in mehr als 50 % aller Malignome genetisch verändert und stellt damit die häufigste genetische Alteration in malignen Tumoren dar (Hollstein et al., 1991). Neben Mutationen kann es ebenfalls durch Wechselwirkung mit viralen oder zellulären Proteinen inaktiviert sein.

Das TSG p53 ist ein wichtiger Regulator der zellulären Strahlenantwort, da es an der Aufrechterhaltung und Steuerung grundlegender physiologischer Prozesse beteiligt ist. Nachgewiesen wurde ein wesentlicher Einfluß auf die Kontrolle des Zellzyklus, die DNS-Reparatur und -Synthese, die Zelldifferenzierung, die genomische Plastizität und den programmierten Zelltod (Hollstein et al., 1991, Levine et al., 1991, Harris und Hollstein, 1993). Das p53-Genprodukt wurde 1979 als zelluläres Protein entdeckt, welches mit dem großen Tumorantigen des Affenvirus 40 komplexiert (Lane und Crawford, 1979, Linzer und Levine, 1979).

Wenn zellulärer Streß ausgeübt wird, kontrolliert Wildtyp(wt)-p53 das Fortschreiten des Zellzyklus negativ. In Abhängigkeit von DNS-Schäden kommt es zur Anreicherung des p53-Proteins in der Zelle. Diese Anreicherung beruht auf einer erhöhten Translation bzw. gesteigerten Proteinstabilität (Maltzman und Czyzyk, 1984, Kastan et al., 1991 und 1992, Kuerbitz et al., 1992). Zusätzlich erfolgt eine Aktivierung des TSG p53 über zahlreiche Modifizierungen, wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und Glykosylierungen (Giaccia and Kastan, 1998). Im aktiven Zustand wirkt wt-p53 als Transaktivator in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Natur des zellulären Streßfaktors auf zahlreiche regulatorische Proteine, die für eine zeitliche Wachstumsarretierung, die DNS-Reparatur oder die Apoptose verantwortlich sind (Levine et al., 1991, Levine, 1997). Die Kontrolle der zellulären Strahlenantwort durch das TSG p53 ist in Abb. 3 dargestellt.

Die Arretierung des G1/S-Überganges erfolgt durch eine p53-vermittelte Induktion der WAF-1/p21-Expression, eines Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors, der die Inaktivierung des Retinoblastomgens, eines weiteren Tumorsuppressors, bewirkt

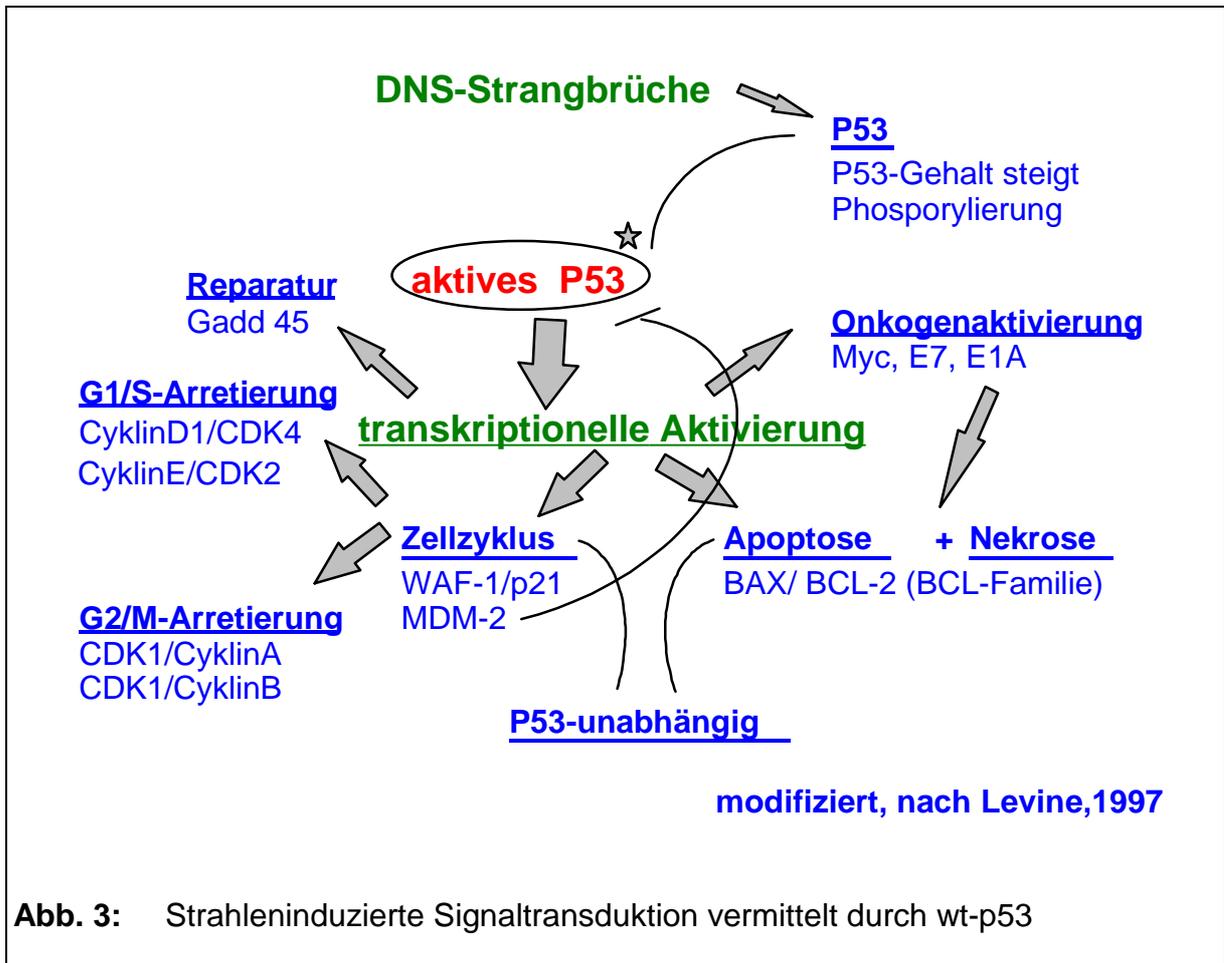
(El-Deiry et al., 1993). Zudem wird ebenfalls der G2/M-Übergang durch wt-p53 kontrolliert (Michalovitz et al., 1990, Agarwal et al., 1995, Stewart et al., 1995). Ein Weg der wt-p53 vermittelten G2/M-Kontrolle erfolgt über die transkriptionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors 14-3-3 $\sigma$  (Hermeking et al., 1997). Ebenso wird die Induktion von WAF-1/p21 in Verbindung mit einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase diskutiert (Agarwal et al., 1995, Bunz et al., 1998). Zudem scheint wt-p53 die Aktivität des CDK1(p34/<sup>CDC2</sup>)-Cyklin-B-Komplexes negativ zu beeinflussen (Winters et al., 1998, Innocente et al., 1999). Der p34/<sup>CDC2</sup>-Cyklin-B-Komplex vermittelt den Eintritt der Zellen aus der G2-Phase in die Mitose und wird deshalb auch als „mitosis-promoting-factor“ (MPF) bezeichnet.

Mit der Arretierung des Zellzyklus nach DNS-Schäden ist die Zelle in der Lage, die DNS-Reparatur oder die Induktion der Apoptose einzuleiten. Die wt-p53 vermittelte DNS-Reparatur erfolgt über die Aktivierung von Reparaturproteinen. So besitzt p53 eine sequenz-spezifische DNS-Bindungsstelle im Promotor von Gadd 45 (Kastan et al., 1992). Zusätzlich ist wt-p53 in der Lage, selbst DNS-Strangbrüche zu erkennen und zu reparieren (Lee et al., 1995, Janus et al., 1999, Albrechtsen et al., 1999).

Die wt-p53 vermittelte Apoptoseinduktion scheint über die transkriptionelle Regulation von „B-cell-Lymphoma-2-Protein“ (BCL-2) und „bcl-x-aktivierendes-Protein“ (BAX), zwei Apoptose-Regulatoren der bcl-2 Genfamilie, zu erfolgen (Chao und Korsmeyer, 1998). Bcl-2 befindet sich auf mitochondrialen, endoplasmatischen und nukleären Membranen (Hockenbery et al., 1990) und wird insbesondere in Geweben exprimiert, die eine relativ lange Überlebenszeit haben (Villuendas et al., 1991, Hockenbery et al., 1991). Bax, der Gegenspieler von Bcl-2, ist ein 21 kDa Protein, das durch wt-p53 transaktiviert wird (Miyashita and Reed, 1995). Bax kann mit sich selbst bzw. auch mit Bcl-2 dimerisieren. Ein Bax-Überschuß führt zur Ausbildung von Bax-Homodimeren und resultiert in der Induktion von Apoptose. Dagegen hat die Überexpression von Bcl-2 eine protektive Wirkung, da die Bildung von Bax-Homo-Dimeren verhindert wird (Yin et al., 1995). Beispielsweise hemmt eine Bcl-2 Überexpression die durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren vermittelte Induktion der Apoptose (Korsmeyer et al., 1992, Garcia et al., 1992, Vaux et al., 1992).

Der Abbau des P53-Proteins erfolgt über eine „feedback-Regulation“ mit dem „murine-double-minute-2“ (MDM-2)-Protoonkogen. Beide Proteine stehen in enger

Wechselwirkung zueinander. Die Expression von MDM-2 wird durch P53 aktiviert (Barak et al., 1993; Wu et al., 1993). MDM-2 wirkt wiederum negativ regulierend auf den P53-Level der Zelle, da es den Transport von P53-Protein aus dem Zellkern ins Zytoplasma zu den Proteasomen ermöglicht und den Ubiquitin-vermittelten Abbau von P53 fördert (Haupt et al., 1997a, Honda et al., 1997, Kubbutat et al., 1997).



### 1.3 Apoptoseinduktion, p53-Genstatus und Strahlensensitivität

Die Apoptose ist der physiologische Mechanismus der Zellen, sich selbst aktiv zu zerstören. Erstmals an Säugerzellen wurde dieser Prozeß von Kerr et al. (1972) beschrieben. Dieser zelleigene Mechanismus dient der Gewebemöostase bzw. der Entfernung von irreparabel geschädigten Zellen und ist durch charakteristische biochemische und morphologische Veränderungen gekennzeichnet (Arends und

Wyllie, 1992, Kerr et al., 1993, Wyllie et al., 1993). Neben der Chromatin-Aggregation, der Kondensation von Zytoplasma und Zellkern, erfolgt die Aufspaltung der Zelle in Membran-gebundene Vesikel („apoptotic-bodies“).

Während die Nekrose (der unphysiologische Zelltod) durch Anschwellen von Zellkörper und Zellorganellen gekennzeichnet ist, findet in apoptotischen Zellen eine Volumenreduktion (Schrumpfung) statt. Zudem rufen apoptotische Zellen im Gegensatz zur Nekrose in vivo keine Entzündungsreaktionen hervor, da die entstehenden „apoptotic-bodies“ eine intakte Membran aufweisen bzw. schnell phagozytiert werden. Weitere Merkmale der Apoptose sind die Aktivierung von zahlreichen Enzymen und Proteinen, die enzymatische DNS-Degradation, Umbauten der Zellmembran und ATP-Verbrauch.

Die besondere Bedeutung der Apoptose in der Onkologie läßt sich daran ermessen, daß alle Therapieprinzipien wie Radio-, Chemo- und Gentherapie mit ihrer Wirkung darauf abzielen, dieses in Tumorzellen häufig inaktivierte Selbstmordprogramm wieder zu reaktivieren (Cummings et al., 1997, Reed, 1999). So ist beispielsweise die Resistenzentwicklung maligner Tumore gegenüber Radio- und Chemotherapie im wesentlichen mit einer verstärkten bcl-2 Expression assoziiert (Dole et al., 1994, Reed et al., 1994, Strasser et al., 1997, Harima et al., 1998, Rakozy et al., 1998, Collecchi et al., 1998). Das TSG p53 gewinnt an Bedeutung, wenn man die Reevaluierung der Apoptoseinduktion für die Tumorbehandlung betrachtet. Beispielsweise korreliert die Wiederherstellung der wt-p53 Funktion in Tumorzelllinien mit einer gesteigerten Apoptoseinduktion (Cirielli et al., 1995, Liu et al., 1995, Yonish-Rouach et al., 1991 und 1996). Ebenso wird die zeitliche Verzögerung der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung in humanen Lymphoblasten-Zellen im Bezug zu ihrem unterschiedlichen p53-Genstatus diskutiert (Xia et al., 1995). Durch DNS-schädigende Agenzien kann in Nager-Thymuszellen eine p53-abhängige Apoptose induziert werden (Clarke et al., 1993, Lotem und Sachs, 1993, Lowe et al., 1993). Werden immunsupprimierte Mäuse mit hohen Strahlendosen bestrahlt, weisen ihre Transplantat-Tumore eine hohe Apoptoserate auf, wenn sie ein wt-p53 Gen besitzen. Demgegenüber sind die Tumore jedoch strahlenresistent bzw. zeigen fast keine Apoptose, wenn sie kein wt-p53 Gen tragen (Lowe et al., 1994). Die Steuerung der Apoptose ist jedoch ein sehr komplexer Prozeß, der bisher nur teilweise aufgeklärt werden konnte. So existieren neben den beiden wt-p53

regulierten Gegenspielern Bcl-2 und Bax weitere Proteine der bcl-2-Genfamilie, die proapoptotisch (bcl-xL, bcl-w, mcl-1 und A1/bfl-1) oder antiapoptotisch (bcl-xS, bak, bad, bik, bid und hrk) wirken können (Reed et al., 1999). Ebenso gibt es Mechanismen, die unabhängig von wt-p53 bzw. bcl-2 die Apoptose auslösen (Vaux et al., 1992, Clarke et al., 1993, Cuende et al., 1993, Fukunaga-Johnson et al., 1995).

Um die Beziehung zwischen p53-Status und Strahlensensitivität zu charakterisieren, werden unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen gibt es Studien, die den endogenen p53-Status (wt, mt, null) berücksichtigen. Zum anderen kann die p53-Funktion (wt-p53, mt-p53, null) beeinflusst bzw. modifiziert werden, wie beispielsweise durch die Transfektion mit wt-p53 oder mt-p53 bzw. den Einsatz von viralen Genprodukten (z.B. das E6-Protein des humanen Papillomavirus, das große Tumorentigen des Affenvirus 40). Auch ein Einsatz von temperatursensitiven p53-Mutanten ist möglich. Das heißt in Abhängigkeit von der Temperatur liegt das p53-Protein in der Wildtyp- oder in der Mutantenkonformation vor (Donehower und Bradley, 1993).

Obgleich der p53-Status ein molekularer Indikator für das Ansprechen von Radio- und Chemotherapie ist, wird die Beziehung zwischen Bestrahlung, p53-Status und Apoptoseinduktion insgesamt recht kontrovers diskutiert (Bristow et al., 1996, O'Connor et al., 1997, Brown und Wouters, 1999). Zum einen gibt es Befunde für eine erhöhte Strahlenresistenz, wenn Mutationen im TSG p53 auftreten. Zum Beispiel weisen in transgenen Mäusen die hämatopoetischen Zellen mit einer p53-Mutation im Vergleich mit wt-p53 Zellen eine erhöhte Strahlenresistenz auf (Lee und Bernstein, 1993). Ebenso korreliert in Tumor- oder epithelialen Zellen ein wt-p53 vermittelter G1-Zellzyklusarrest mit einer erhöhten Strahlensensitivität (O'Connor et al., 1993, McIlwrath, et al., 1994, Siles et al., 1996). Andererseits konnte in Tumor-Zelllinien kein Zusammenhang zwischen einem p53-Gendefekt und einer erhöhten Strahlenresistenz nachgewiesen werden (Brachmann et al., 1993, Strasser et al. 1994, Zaffaroni et al., 1995). Weiterhin weisen Fibroblasten von wt-p53-Mäusen im Vergleich mit p53-null Mäusen keine erhöhte Strahlensensitivität auf, obgleich ein wt-p53 vermittelter G1-Arrest zu beobachten war (Slichenmyer et al., 1993). Zudem können Tumorzellen bzw. Fibroblasten auch sensitiv auf Bestrahlung reagieren, wenn sie einen p53-Gendefekt aufweisen (Zölzer et al., 1995, Servomaa et al.,

1996). In der klinischen Praxis zeigte sich bei Kopf-Hals-Tumoren, daß der Erfolg einer Strahlentherapie vom p53-Status abhängen kann. Dabei wurde in einer Studie mit 110 Patienten gezeigt, daß nach einer Strahlentherapie ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines Lokalrezidivs besteht, wenn die Patienten eine p53-Mutation tragen (Koch et al., 1996). Für ovariale Tumore konnte in vivo und in vitro eine erhöhte Strahlensensitivität nach dem Transfer eines wt-p53 Gens nachgewiesen werden (Gallardo et al., 1996). Jedoch ist in vivo bislang nur eine relativ begrenzte Erfolgsrate bei der Behandlung von Tumoren mit wt-p53 erzielt worden (Roth et al., 1996, Swisher et al., 1999).

#### **1.4 G2/M-Zellzykluskontrolle und Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung**

Für das Ansprechen auf eine Bestrahlungstherapie hat sich in zunehmendem Maße das Verhalten der Tumorzellen an den Zellzyklus-Restriktionspunkten G1/S und G2/M als kritisch und wesentlich herausgestellt. Während die Kontrolle des G1/S-Überganges relativ gut charakterisiert ist (Kastan und Kuerbitz, 1993), wurde die G2/M-Zellzykluskontrolle bisher weniger untersucht.

Neuere Befunde lassen auf eine wt-p53 initiierte G2/M-Zellzykluskontrolle schließen. Die molekularen Mechanismen einer p53-abhängigen G2/M-Zellzyklusarretierung bzw. Transition sind jedoch noch unklar. So wird zum einen eine wt-p53 vermittelte G2/M-Blockierung nach Bestrahlung beobachtet (Michalovitz et al., 1990, Stewart et al., 1995, Agarwal et al., 1995), während zum anderen die G2/M-Transition mit einer erhöhten Induktion der Apoptose ebenfalls durch wt-p53 induziert wird (Guillouf et al., 1995, Skladanowski und Larsen, 1997).

Das Verständnis der Mechanismen der G2/M-Zellzykluskontrolle ist insbesondere von Interesse, da sie sowohl abhängig als auch unabhängig von wt-p53 verlaufen. Häufig liegt eine enge Kopplung zwischen dem Austritt der Zellen aus der G2/M-Arretierung und der Apoptoseinduktion vor (Guillouf et al., 1995, Palayoor et al., 1995, McKenna et al., 1996). Auch eine Korrelation zwischen der Dauer der G2/M-Arretierung, der DNS-Reparatur und dem Zellüberleben nach Bestrahlung wird in

der Literatur diskutiert (McKenna et al., 1991, Nagasawa et al., 1994). Dagegen führt der schnelle Übergang aus der G2-Phase in die Mitose zu strahleninduziertem Zelltod und einer erhöhten Strahlensensitivität (McKenna et al., 1991, Guillouf et al., 1995). Interessant ist, daß mit dem Wegfall des G1/S-Restriktionspunktes, wie er häufig in Tumorzellen auftritt, oft eine erhöhte Radioresistenz korreliert. Demgegenüber kann die zusätzliche Aufhebung des noch vorhandenen G2/M-Kontrollpunktes zu einer Strahlensensibilisierung führen, insbesondere in Zellen mit defektem p53-Gen (Russell et al., 1995, Powell et al., 1995, Yao et al., 1996, Bracey et al., 1997). Dies erklärt eine zunehmende Suche nach Therapeutika, welche den G2/M-Zellzyklusarrest aufheben.

Als ein wirksamer Kandidat erscheint das Koffein, ein pflanzliches Purinderivat (1,3,7-Trimethylxanthin). Koffein kann die cytotoxischen Effekte von DNS-schädigenden Agenzien, wie beispielsweise alkylierenden Agenzien oder Strahlung, erhöhen (Busse et al., 1978, Fingert et al., 1986, Musk und Steel, 1990). Es verhindert nach Bestrahlung den strahleninduzierten G2/M-Arrest und bewirkt in verschiedenen Tumor-Zelllinien eine Radiosensitivierung (Rowley, 1992, Crompton et al., 1993). Obgleich Koffein für viele Wirkungen verantwortlich zu sein scheint, sind die genauen Mechanismen nur teilweise aufgeklärt. Als Phosphodiesterase-Inhibitor bewirkt Koffein, daß der Abbau von cAMP (einem „second-messenger“) in der Zelle verhindert wird (Ehmann, 1976). Auch die Hemmung der DNS-Reparatur durch Koffein konnte nachgewiesen werden (Smeets et al., 1994b, Link et al., 1995). Zudem scheint Koffein essentiell für die Tumor-inhibierende Wirkung von schwarzem bzw. grünem Tee zu sein (Huang et al., 1997). In vivo Versuche zeigen weiterhin, daß gute Ergebnisse erzielt werden, wenn eine Chemotherapie in Patienten mit Weichteilsarkomen (WTS) zusätzlich mit einer Koffeinbehandlung gekoppelt wird (Tsuchiya et al., 1998, Yamagishi et al., 1999). Interessanterweise scheint die Sensitivierung gegenüber Bestrahlung in Zellen mit einer defekten p53-Funktion größer zu sein als in Zellen mit intaktem p53 (Powell et al., 1995, Russell et al., 1995, Yao et al., 1996, Bracey et al., 1997). In welcher Weise jedoch Koffein die strahleninduzierte Zellantwort beeinflusst, ist noch relativ wenig erforscht. Bekannt ist, daß es die strahleninduzierte Inaktivierung der p34<sup>CDC2</sup>-Kinase Aktivität verhindert, wodurch es zu vorzeitigen Mitosen kommt (Hain et al., 1993, Smeets et al., 1994a, Yao et al., 1996). Zudem wurde in einigen Studien nachgewiesen, daß

mit dem Verlust der strahleninduzierten G2/M-Arretierung die Apoptosefrequenz zunimmt (Palayoor et al., 1995, Bernhard et al., 1996, McKenna et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit, den Zellzyklus in der G2/M-Phase zu beeinflussen, bietet sich mit dem Einsatz von Paclitaxel (Taxol). Taxol ist ein Diterpen, welches aus der inneren Borke der Eibe („*Taxus-brevifolia*“) extrahiert wird (Wall und Wani, 1995). Taxol bindet spezifisch und reversibel an Mikrotubuli, was ihre Aggregation fördert und die Depolarisation hemmt (Schiff et al., 1979). Dadurch wird die Bildung von stabilisierten Tubulinpolymeren bewirkt. Es kommt zur Verhinderung der Reorganisation des Zytoskeletts und damit zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. Begründet auf den Befund, daß die einzelnen Zellzyklusphasen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Bestrahlung aufweisen, kann die Taxol-vermittelte Synchronisierung der Zellen in der G2/M-Phase eine Radiosensitivierung bewirken (Tishler et al., 1992, Choy et al., 1993). Zudem besitzt Taxol eine antineoplastische Aktivität unter anderem gegenüber humanen Mamma-, Colon- und Bronchialkarzinom-Zellen und kann zusammen mit einer Bestrahlung additiv Apoptose induzieren (Liebmann et al., 1994, Pulkkinen et al., 1996). Im Zusammenhang mit einer Radiosensitivierung *in vivo* wird ebenfalls die reoxygenierende Wirkung von Taxol diskutiert (Milas et al., 1995a und b). Zudem zeigen neuere Untersuchungen, daß Taxol auch auf die Kernlamina wirkt (Theodoropoulos et al., 1999).

In klinischen Studien konnte ebenfalls ein Ansprechen von Patienten auf eine kombinierte Taxol- und Bestrahlungstherapie gezeigt werden (Huizing et al., 1997, Rosenthal et al., 1997, Steinberg et al., 1997). Dagegen zeigen Studien der klinischen Phasen I und II an Patienten mit WTS gegenüber bestehenden Chemotherapien keine Verbesserung durch eine Taxolbehandlung (Gian et al., 1996, Casper et al., 1998, Sandler et al., 1998). Die Bedeutung von Taxol zur Behandlung von malignen Tumoren könnte weiterhin durch den Fakt zunehmen, daß es unabhängig vom p53-Status wirken kann. So konnte bei einer Taxol-Behandlung für humane Ovarialkarzinom-Zellen oder in einer klinischen Phase I-Studie für das Mammakarzinom eine p53-unabhängige Wirkung nachgewiesen werden (Debernardis et al., 1997, Smith-Sørensen et al., 1998). Zudem korreliert in Tumorzellen der Verlust der p53-Funktion mit einer Sensitivierung gegenüber der Taxolbehandlung (Wahl et al., 1996, Vikhanskaya et al., 1998).

## 1.5 Das TSG p53 - ein prognostischer Marker in Weichteilsarkomen

Zu den Weichteilsarkomen (WTS) werden alle malignen Tumoren des nichtepithelialen und extraskeletalen Gewebes, mit Ausnahme des retikuloendothelialen Systems sowie der Glia und des Stützgewebes parenchymatöser Organe gezählt. Weiterhin schließt die WTS die Tumorgruppe der neuroektodermalen Malignome des peripheren und autonomen Nervensystems mit ein (Enzinger und Weiss, 1995). Die WTS kommen mit einer Häufigkeit von ca. 1 % an allen malignen Geschwülsten vor (Katenkamp und Stiller, 1990). Sie sind durch eine ausgesprochene Heterogenität gekennzeichnet, was ihre Diagnose und Behandlung ausgesprochen schwierig gestaltet. Bisher gibt es für WTS keine ausreichenden Kriterien für die molekulare Diagnostik, für eine individualisierbare effektive Therapie und die Prognose.

Die radikale Tumoresektion (weit im Gesunden) ist die Haupttherapieform bei WTS. Daneben findet die systemische Chemotherapie und die Strahlentherapie meist in Kombination mit der Chirurgie ihren Einsatz. Mit der Weiterentwicklung der plastischen Chirurgie und multimodaler Therapiekonzepte wird die Indikation zur Amputation bei WTS immer mehr zugunsten der funktionserhaltenden Operation zurückgedrängt (Schütte et al., 1995). Insbesondere bei extremitätenerhaltenden Eingriffen kann mit Hilfe der adjuvanten Strahlentherapie das Lokalrezidivrisiko gesenkt werden (Shiu et al., 1991). In einer umfangreichen Studie an 498 Patienten mit WTS wurde die lokale Tumorkontrolle durch die Strahlentherapie von 59,9 auf 75,4 % verbessert (Coindre et al., 1996). Obgleich WTS nicht uniform strahlenresistent sind, ist die alleinige Strahlentherapie einer Kombination von Resektion und Bestrahlung unterlegen (Tepper and Suit, 1985, Slater et al., 1986). Insbesondere das Grading, die TumorgroÙe, der Tumortyp, der Differenzierungsgrad und die Höhe der Strahlendosis sind prädiktive Faktoren für ein Ansprechen der Strahlentherapie bei WTS (Suit et al., 1988, Slater et al., 1986, Budach et al., 1992).

Untersuchungen zeigen weiterhin, daß mutative Defekte des TSG p53 auch in WTS eine tumorbiologische Relevanz besitzen (Andreassen et al., 1993, Wadayama et al., 1993, Cordon-Cardo, 1994). Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, daß p53-Mutationen in WTS entitätsspezifisch auftreten (Taubert et al., 1995, Würll et al., 1996). Während p53-Mutationen in malignen fibrösen Histiocytyomen (MFH),

Rhabdomyosarkomen (RMS), Leiomyosarkomen (LMS) und Liposarkomen (LS) mit einer Häufigkeit von 10 bis 25 % detektiert wurden, wiesen maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) und Fibrosarkome (FS) keine p53-Mutationen auf. Weiterhin stellte sich heraus, daß die Art der Mutation ebenfalls prognostische Aussagekraft besitzt (Taubert et al. 1996 und 1998a, Taubert, 1999, Würfl, 1998b). So wiesen nur Patienten mit einer „non-frame-shift“ Mutation eine schlechte Prognose auf. Eine weitere in WTS häufig beobachtete Form der Inaktivierung von wt-p53 erfolgt durch die Überexpression des Onkogen-Produkts MDM-2 (Momand et al., 1992, Oliner et al., 1992, Leach et al., 1993, Cordon-Cardo et al., 1994, Nakayama et al., 1995, Pollock et al., 1997). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an WTS-Patienten zeigen zudem, daß eine P53-Überexpression, eine MDM-2-Überexpression sowie eine P53- und MDM-2-Co-Überexpression mit einer schlechten Prognose korreliert (Würfl et al., 1997a und b, Würfl et al., 1998a und b).

## **1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Das TSG p53 gewinnt an Bedeutung, wenn man die Reevaluierung der Zellzykluskontrolle und Apoptoseinduktion für die Tumorbehandlung betrachtet. Das ungebremste Wachstum einer Krebszelle beruht auf der Störung des Gleichgewichts von Proliferation und Apoptose. Da die tumorspezifische Wirkung der meisten anti-karzinogenen Substanzen auf der Wirkung der Induktion von Apoptose basiert, ist ein besseres Verständnis der Mechanismen von Zellzyklus- und Apoptosekontrolle essentiell, um die Behandlungsstrategien zu verbessern. Von besonderem Interesse ist dabei die Suche nach „Sensitizern“, die unabhängig von wt-p53 wirken können, da ca. 50 % aller Tumore p53-Mutationen tragen.

Für WTS gibt es bisher keine ausreichenden Kriterien für die molekulare Diagnostik, für eine individualisierbare effektive Therapie und die Prognose. Insbesondere der Einfluß von p53-Genstatus und Apoptoseinduktion auf die Strahlentherapie ist für WTS bisher nur schlecht charakterisiert. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen für WTS jedoch, daß mutative Defekte des TSG p53 eine tumorbiologische Relevanz besitzen. Aus postoperativem Tumormaterial gelang die Kultivierung von zwei WTS-Zelllinien (US 8-93 und LMS 6-93) mit einer heterozygoten p53-Mutation

und deren Kryokonservierung in niedrigen Passagen (Taubert et al., 1997, Meye et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden WTS-Zelllinien strahlenbiologisch charakterisiert. Zudem sind drei weitere humane ATCC-Sarkom-Zelllinien (A-204, RD und SAOS-2) mit unterschiedlichem p53-Genstatus (wt, mt, null) in diese Untersuchungen einbezogen worden.

**Im ersten Teil** wurde der Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in den beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) untersucht. Dazu wurde die Zellproliferation, der Zellzyklus und die Induktion von Zelltod in Abhängigkeit von der Strahlendosis untersucht. Weiterhin sind mit dem TUNEL-Assay, der DAPI-Analyse, dem DNS-Leiter-Assay und dem Annexin-V-Test unterschiedliche Methoden etabliert worden, um Apoptose qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

**Im zweiten Teil** erfolgte die strahlenbiologische Charakterisierung der drei humanen Sarkom-Zelllinien: LMS 6-93 (mt-p53), SAOS-2 (p53-null) und RD (mt-p53). Zudem wurde für alle fünf humane Sarkom-Zelllinien die Strahlensensitivität mittels Zellkoloniebildungstest bestimmt und die strahleninduzierte Genexpression des TSG p53, von p53-Targetgenen (waf-1, mdm-2, bax) und weiteren Zellzyklus- bzw. Apoptose-regulierenden Proteinen (bcl-2, Cyklin-B und p34<sup>CDC2</sup>) mittels Westernblotanalyse untersucht.

**Im dritten Teil** wurde an den selbst etablierten WTS-Zelllinien US8-93 und LMS6-93 die Möglichkeit getestet, die strahleninduzierte G2/M-Zellzyklusarretierung einerseits aufzuheben (Koffeinbehandlung) bzw. andererseits zu verstärken (Taxolbehandlung), um dabei Veränderungen im strahlenbiologischen Verhalten zu induzieren. Obgleich Koffein und Taxol auf unterschiedliche Weise den Zellzyklus in der G2M-Phase beeinflussen, scheinen beide Substanzen geeignete Kandidaten zu sein, um eine Strahlensensitivierung in Tumorzellen mit p53-Defekt zu induzieren. Dabei scheint die Induktion der Apoptose durch beide Chemotherapeutika ein wichtiger Mechanismus für das Ansprechen einer therapeutischen Behandlung zu sein. Insgesamt wäre eine Sensitivierung von Tumorzellen mit und ohne p53-Defekt gegenüber einer Bestrahlung bei gleichzeitig unveränderter Empfindlichkeit der normalen umgebenden Zellen (mit wt-p53 Funktion) von großem therapeutischen Interesse.

Mit der strahlenbiologischen Charakterisierung der fünf humanen Sarkom-Zelllinien sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluß hat der p53-Genstatus in humanen WTS-Zelllinien auf die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen?
- Lassen sich Zusammenhänge zwischen Strahlensensitivität, Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und p53-Genexpression aufzeigen? Wie korrelieren diese Faktoren mit dem Genstatus des TSG p53 der jeweiligen WTS-Zelllinie?
- Läßt sich die in der Literatur beschriebene inverse Korrelation von G2/M-Arrest und Apoptoserate auch in den fünf Sarkom-Zelllinien im Versuch wiederfinden? Welchen Einfluß hat die Stärke bzw. die Dauer der strahleninduzierten G2/M-Arretierung auf Strahlensensitivität und Apoptoseinduktion?
- Inwieweit führt eine Modulation des strahleninduzierten G2/M-Arretierung (Koffein- bzw. Taxolbehandlung) in den zu untersuchenden WTS-Zelllinien zu einer erhöhten Strahlensensitivität? Welche Rolle spielt dabei die Induktion von Apoptose?

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien, Herkunft und p53-Genstatus

In der vorliegenden Studie wurden fünf humane Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53 Genstatus (wt, mt, null) bestrahlt und hinsichtlich Strahlensensitivität, Zellzyklusverlauf, Apoptoseinduktion und p53-Genexpression charakterisiert. Neben den drei humanen ATCC-Zelllinien RD, SAOS-2 und A-204 wurden die beiden selbst etablierten humanen Sarkom-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 analysiert (siehe Tab. 1). Die kommerziell erhältlichen Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig) erworben.

Für die Etablierung, Kultivierung und Konservierung der WTS-Zelllinien wurden Standardprotokolle unserer Abteilung Zell- und Gewebezüchtung genutzt (leicht modifiziert nach Freshney, 1994 und Lindl und Bauer, 1994). Dabei fand regelmäßig die Kontrolle zelltypspezifischer Parameter (Zellmorphologie, Wachstumsmuster, Verdopplungszeit und Platiereffizienz) statt. Ebenso wurden die Zelllinien mittels DAPI-Färbung oder ELISA-Test („Mycoplasma-detection-kit“) auf Mykoplasmen-Infektionen kontrolliert. Bei nachgewiesenen Infektionen erfolgte die Behandlung mit dem Cyklin-B-Kit.

#### Zelllinien:

Die RMS-Zelllinie **RD** weist für das TSG p53 eine Punktmutation (CGG->TGG) in Exon 7 (Kodon 248) auf. Zusätzlich fehlt bei dieser Zelllinie das zweite p53-Allel (Stratton et al., 1990).

In der Osteosarkom-Zelllinie **SAOS-2** wurden zahlreiche Deletionen in beiden Allelen des TSG p53 detektiert. Sie wurde in dieser Studie als „p53-null“ Zelllinie eingesetzt, da keine p53-mRNA bzw. -Protein exprimiert werden (Masuda et al., 1987).

Das p53-Mutationsscreening (Exone 4 bis 9) für die RMS-Zelllinie **A-204** ergab keine genetische Abweichung von der Wildtypsequenz. Sie wurde als „wt-p53“ Zelllinie identifiziert (Bache et al., 1997).

Die WTS-Zelllinie **US 8-93** stammt von einem 40 jährigen Patienten und wurde histomorphologisch als undifferenziertes Sarkom klassifiziert. Mittels Sequenzierung wurde für das TSG p53 ein Basenaustausch (TGG zu TAG) im Exon 4 (Kodon 91) nachgewiesen (Taubert et al., 1997).

Die WTS-Zelllinie **LMS 6-93** stammt von einem 61 jährigen Patienten und wurde als gering differenziertes LMS charakterisiert. Die LMS 6-93 trägt im TSG p53 eine 1 bp Insertion im Exon 6 (Kodon 215) (Meye et al., 1998).

In den beiden selbst etablierten Zelllinien führt die Veränderung im p53-Gen zu einem vorzeitigen Transkriptionsstop (frameshift Mutation). Für das zweite p53-Allel war die p53-Wildtypsequenz detektierbar, was auf einen heterozygoten p53-Genstatus hinweist. Die beiden selbst etablierten Zelllinien konnten über 120 Passagen kultiviert werden.

**Tab. 1** Zelllinien, Herkunft, p53-Genstatus und p53-Charakterisierung

Zelllinie	Entität	p53-Gen Status	Art der p53-Mutation	Ursprung/ p53-Charakterisierung
US 8-93	US	mt/wt	Nichtsinn	Taubert et al., 1997
LMS 6-93	LMS	mt/wt	1-bp-Insertion	Meye et al., 1998
RD	RMS	mt/-	Fehlsinn	McAllister et al., 1969 Stratton et al., 1990
SAOS-2	OS	-/-	Deletionen	Masuda et al., 1987
A-204	RMS	wt/wt	Wildtyp	Giard et al., 1973 Bache et al., 1997

**Abk.:** US-undifferenziertes Sarkom, OS-Osteosarkom, LMS-Leiomyosarkom, RMS-Rhabdomyosarkom, mt-Mutation, wt-Wildtyp

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmittel

Firma	Bezeichnung
Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)	FACSscan, Einwegspritzen,
Bender (Blankenburg)	Schwimmständer, Neubauer-Zählkammer, Mikropipetten,
Biometra (Göttingen)	Fast-Blotter (16x20 cm, ohne Kühlung) TRIO-Thermoblock TB1, Westernblot-Elektrophorese Mini-Gelkammer-Systeme, Blottingpapier, Glasplatten mit fixierten Spacern, Miniblotter, Schaumstoffkissen,
BioPlex (Freiburg)	Elektrophorese-Gerät, Gießkämme,
BioRad (Richmond, CA, USA)	PVDF-Membran (0,2 micron),
Bioscience (Fernwald)	Biocenter 2001 (Brutschrank), „Pipetboy“ (automatische Pipette), „Fireboy“ (Brenner), MediaKap2 (Filter), Pipettenhalter,
Braun-Dexon (Melsungen)	Einmal-Injektionskanülen, (0,4x20 mm, 0,6x50 mm, 0,8x50 mm, 1,2x50 mm), U-40 Insulin-Einmalspritze, Z1 (Zellzählgerät), Isoton II (Puffer für Z1),
Coulter (Krefeld)	Thermomixer 5436, Mikropipetten, Reaktionsgefäße,
Eppendorf (Hamburg)	Einweg-Plastikartikel für Zellkultur (Petrischalen, Gewebekulturflaschen, Pipettenspitzen, Pipetten Zentrifugenröhrchen, Gewebekulturplatten,
Greiner( Frickenhausen)	Laminarbox,
Heraeus (Hanau)	Universal-30 RF (Zentrifuge) Filterkarten,
Hettich (Tuttlingen)	Wilovert (Umkehrmikroskop),
Hund (Wetzlar)	Vortex-Schüttler VF2, Ultraturrax T8,
IKA-Labortechnik (Staufen)	Biomax MR (Röntgenfilme),
Kodak (New York, U.S.A.)	Handschuhe, Stoppuhr, Parafilm, Trichter,
Merk (Darmstadt)	Meßzylinder, Magnetrührstäbchen Bechergläser, Mettler (Giessen)
Mettler (Giessen)	Mettler AM 100 (Analysenwaage),
Millipore (Eschborn)	PVDF-Membran (0,45 µm, Westernblotanalyse),
Nunc (Wiesbaden-Biebrich)	Multischalen, Kammerobjektträger, „Nunclon-Triple-Flasks“, Pasteurpipetten, Kryokartons, Pipetten, Flasketten, Kulturflaschen,
Pharmacia (Freiburg)	Ultraspec III (UV/VIS Spektrophotometer)
TPP (Trasadingen, Schweiz)	Petrischalen mit Polycarbonat-Filtereinsatz,
Zeiss (Jena)	Axiophot/Axioplan (Fluoreszenzmikroskop).

## 2.3 Chemikalien, Feinchemikalien, Enzyme und Analysekits

Firma	Bezeichnung
Amersham (Braunschweig)	„ECL-Western-blotting-detection-reagens“,
Bayer (Leverkusen)	Ciprofloxacin,
Becton Dickinson (San Jose)	„Cell-Cycle-Test“ (DNS-Reagenzkit),
Biowhittaker (Heidelberg)	RPMI 1640 (mit 25 mM HEPES und L-Glutamin,

BioRad (Richmond, CA, USA)	AG 501-X8 (Ionenaustauscher),
Boehringer Ingelheim (Serva) (Ingelheim)	Agarose, Acrylamide/Bisacrylamide-Lösung, Bromphenolblau, Penicillin-Streptomycin Mixture, Gentamicinsulfate, DEPC, DEA, SDS, DTE, DMSO, D-Gluc-1,6-Diphosphat, EDTA, FKS, Kaliumchlorid, Glutamin, Glycerol, Kanamycin-Lösung, Antifading, Proteinase K, TEMED, Trypsin, Trypanblau-Lösung, Isopropanol, Tris-HCl, Ethidiumbromid, Triton X-100, Tween 20,
Boehringer Mannheim (Mannheim)	„In-Situ-Cell-Death-Detections-Kit“, „BM-Cyclin“, „Cell-Proliferation-ELISA“, BrdU, DNase I, RNase, Mycoplasmen-Detektions Kit,
Calbiochem	Koffein, Paclitaxel (Taxol),
Clontech GmbH (Heidelberg)	„Apo-Alert-Annexin-V-Kit“, Apoptose-Kit,
Dako (Hamburg)	Kaninchen-Anti-Maus IgM (HRP-konjugiert), Maus-IgG-Fraktion (HRP-konjugiert), Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (HRP-konjugiert), anti-p53-AK (FITC-konjugiert), ms-IgG2b (FITC-konjugiert),
Fluka (Neu-Ulm)	Aceton, Magermilchpulver,
Merck (Darmstadt)	Chloroform, Citronensäure, Diethylether, Ethanol (96%), Essigsäure, Formaldehyd, Natriumcitrat, Mayers-Haemalaun, Wasserstoffperoxid, Salzsäure (37% ig),
Pharmingen GmbH (San Diego, CA, USA)	Annexin-V-FITC,
Roth (Karlsruhe)	Essigsäure, Glycin, Methanol, Natrimhydroxid,
Sigma (St. Louis, MO, USA)	Aspartat, BSA, Dextransulfat, 3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DTE, Giemsa -Lösung, Kaliumhydrogencarbonat, Poly-L-Lysin, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Protein-ASSAY-Kit.

## 2.4 Antikörper und Chemotherapeutika

Antikörper	Bezeichnung	Firma	Epitop (AS)	Eingesetzte Konz.
Actin	CP01	Sigma	-	1:500
Bax	ID3	Oncogene	n.b.	1:100
BCL-2	124	DAKO	41-54	1:50
P34 <sup>CDC2</sup>	A17	Oncogene	220-227	1:100
Cyklin-B	7A9	Novocastra	n.d.	1:100
P53	Do-7	Novocastra	1-45 (N-terminal)	1:100
MDM-2	IF2	Oncogene	26-168(N-terminal)	1:50
MDM-2	19E3	Medac	(C-terminal)	1:50
WAF-1/p21	-	Santa Cruz	58-77	1:300

Abk.: Konz.-Konzentration, n.b.-nicht bestimmt, AS-Aminosäuren,

Chemotherapeutika	Firma	Lösungsmittel	Eingesetzte Konzentration
Koffein	Calbiochem	PBS	0,1 mM bis 10 mM
Taxol	Calbiochem	DMSO	1 nM bis 100 nM

## 2.5 Puffer und Lösungen

### Zellkultur

#### PBS (pH 7,5)

0,4 g KCl  
 8,0 g NaCl  
 0,3 g NaHCO<sub>3</sub>  
 1,0 g Glucose  
 0,2 g EDTA  
 in 1 l dest H<sub>2</sub>O lösen  
 sterilfiltrieren und autoklavieren

aufbewahren bei 4 °C,

#### Kulturmedium

500 ml RPMI-1640 mit HEPES und L-Gln  
 100 ml FKS  
 10 ml Penicillin/Streptomycin  
 5 ml Pyruvat

aufbewahren bei 4 °C,

#### RPMI-PBS

100 ml FKS  
 10 g/l RPMI-PBS  
 in 1 l dest H<sub>2</sub>O lösen und sterilfiltrieren

aufbewahren bei 4 °C,

#### Trypsin-Lösung

0,5 g Trypsin  
 100 ml PBS (siehe oben)

aufbewahren bei 4 °C,

### DNS-Leiter-Assay

#### Puffer 1 (pH 7,5)

10 mM Tris-HCl  
 1 mM EDTA  
 Triton X 100

frisch herstellen,

#### Puffer 2

10 mM NaCl  
 10 mM Tris-HCl  
 10 % N-Lauroylsarcosin  
 0,1 mg/ml Proteinase K

aufbewahren bei -20 °C,

Puffer 3 (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

aufbewahren bei RT,

RNase-Lösung

10 µg/ml RNase in PBS

20 min bei 95°C erhitzen

(Inaktivierung potentieller DNasen)

aliquotieren

aufbewahren bei -20 °C,

Auftragspuffer

60 µl Formamid (deionisiert)

12 µl Laufpuffer (10X)

12 µl EtBr (500 µg/µl)

24 µl Formaldehyd (deionisiert)

aufbewahren bei 4 °C,

**Westernblotanalyse:**

Trenngel-Lösung(10 %ig) 6 ml pro Gel

2 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Biacrylamid

1,2 ml 1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)

1,2 ml 0,5 % SDS

1,6 ml bidest H<sub>2</sub>O

5 µl TEMED

30 µl APS, 10 % ig

(Sammelgel: 5 % ig)

frisch herstellen,

2xSDS-Ladungspuffer (Laemmli-Puffer) (pH 7,5)

2 ml 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8 ml 100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 g SDS

10 g Glycerol

200 mM DTE

0,2 % Bromphenolblau

auf 100 ml mit bidest H<sub>2</sub>O auffüllen

aufbewahren bei -20 °C,

Laufpuffer (pH 8,3) (für 5 l)

15,1 g Tris-Base

72,0 g Glycin

5,0 g SDS

aufbewahren bei RT,

Transfer-Puffer

25 mM Tris-HCl

150 mM Glycin

10 % Methanol

frisch herstellen,

Coomassieblau-Lösung

0,1 % Coomassie

5 % Essigsäure

50 % Methanol

45 % bidest H<sub>2</sub>O

aufbewahren bei RT,

Entfärbe-Lösung

45 % Ethanol  
10 % Essigsäure  
75 % bidest H<sub>2</sub>O

aufbewahren bei RT,

Wasch-Lösung

0,05 % Tween-20 in PBS

frisch herstellen,

Blockierungsreagenz

Wasch-Lösung  
5 % Milchpulver

frisch herstellen,

**weitere Lösungen:**

PBS

8 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
1,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

aufbewahren bei RT,

Permeabilisierungs-Lösung

1,0 g Na-Citrat  
1,0 ml Triton-X-100  
in 1,0 l PBS lösen

aufbewahren bei 4 °C,

TBE (10 X) (pH 8,0)

108 g/l Tris-HCl  
55 g/l Borsäure  
40 ml 0,5 M EDTA

aufbewahren bei 4 °C.

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultivierung und Zellpassagierung**

Für die Zellkultivierung der WTS-Zelllinie wurden Standardprotokolle unserer Abteilung Zell- und Gewebezüchtung genutzt (leicht modifiziert nach Freshney, 1994, Lindl und Bauer, 1994).

#### Anlegen von Zellkulturen und Passagierung:

- a) steril und intraoperativ entnommene Tumorstücke 30 min in PBS (mit 740 U/ml Penicillin, 740 µg/ml Streptomycin) inkubieren,
- b) Gewebestücke in möglichst kleine Fragmente zerkleinern und mit 2 ml Collagenase Typ 1A (2000 U/ml), 18 ml Kulturmedium (RPMI1640 mit 20 %, FKS, 1 % Natriumpyruvat, 185 U/ml Penicillin, 185 µg/ml Streptomycin) über Nacht bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubieren,
- c) Überstand abnehmen und Zellen mit PBS waschen,
- d) Zellen mit frischem Kulturmedium ansetzen und im Abstand von 1 bis 3 Tagen füttern, Zellen bis zur Konfluenz kultivieren,
- e) verbrauchtes Medium abnehmen und Zellen mit PBS waschen,
- f) mit 0,05 %iger Trypsin-Lösung 3 min bei 37 °C inkubieren,
- g) 3 ml RPMI-PBS zugeben und den gesamten Inhalt der Kulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführen,
- h) 5 min bei 1.200 rpm zentrifugieren,
- i) Überstand abnehmen und Zellpellet in Kulturmedium resuspendieren,
- j) mit einer Verdünnung 1:3 bis 1:5 in neue Kulturflaschen umsetzen,
- k) Zellen nach 2-3 Tagen mit frischem Kulturmedium füttern,
- l) regelmäßige Mycoplasmenkontrolle mittels DAPI-Färbung durchführen.

### **3.2 Bestrahlung**

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden mit Röntgentiefenstrahlengerät Phillips RT 250 (200kV/ 0,5 mm Cu) bei einer Dosisleistung von 2,0 Gy/min bestrahlt. Die

Ermittlung der Bestrahlungszeit für die jeweilige Strahlendosis erfolgte mittels Dosimetrie durch Herrn Dr. Gerlach (Klinik für Strahlentherapie der MLU Halle). Die Bestrahlung wurde als Strahleneinzeldosis bei einem Bestrahlungsregime von 0,4 bis 24,0 Gy appliziert (2,0 Gy entsprechen einer Bestrahlungsdauer von 1,24 min). Vorbereitend auf die Bestrahlung wurden 3 bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro Kulturflasche eingesät und bis zum Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase kultiviert (ca. 24 bis 48 h).

#### Bestrahlungsablauf:

- a) Transport der Zellen zur Strahlentherapie,
- b) Röntgentiefenstrahlengerät/Phillips RT 250 anstellen,
- c) Bestrahlungszeit einstellen,
- d) Tubus (40x15x20) einsetzen, ausrichten und arretieren,
- e) Filter einlegen (200 kV/ 0,5 mm Cu),
- f) Gerät einschalten (Schalter drücken bis Impuls kommt),
- g) Rücktransport der Zellen,
- h) bis zur Aufarbeitung Inkubation der Zellen bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub>.

### **3.3 Strahlenbiologische Untersuchungen**

#### **3.3.1 Zellwachstum und Zellvitalität**

Nach einer Bestrahlung erfolgte das Bestimmen der Zellzahl und der Zellvitalität in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0,4; 2,0; 6,0 und 12,0 Gy) und der Zeit (0, 24, 48, 72 und 96 h). Als interne Kontrolle wurden für jede Untersuchung unbestrahlte Zellen der gleichen Zelllinie mitgeführt. Der strahlenbiologische Effekt der Zelllinie wurde aus dem Vergleich der Ergebnisse von unbestrahlten Kontrollzellen und bestrahlten Zellen gewonnen. Die Vitalität der Zellen wurde durch Inkubation mit Trypanblau-Lösung ermittelt. Dieser Farbstoff reichert sich nur in toten Zellen (defekte Zellmembran) an (Lindl und Bauer, 1994). Die Bestimmung der Zellzahl bzw. der Vitalität pro Strahlendosis und Zeit erfolgte als Doppelansatz. Es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

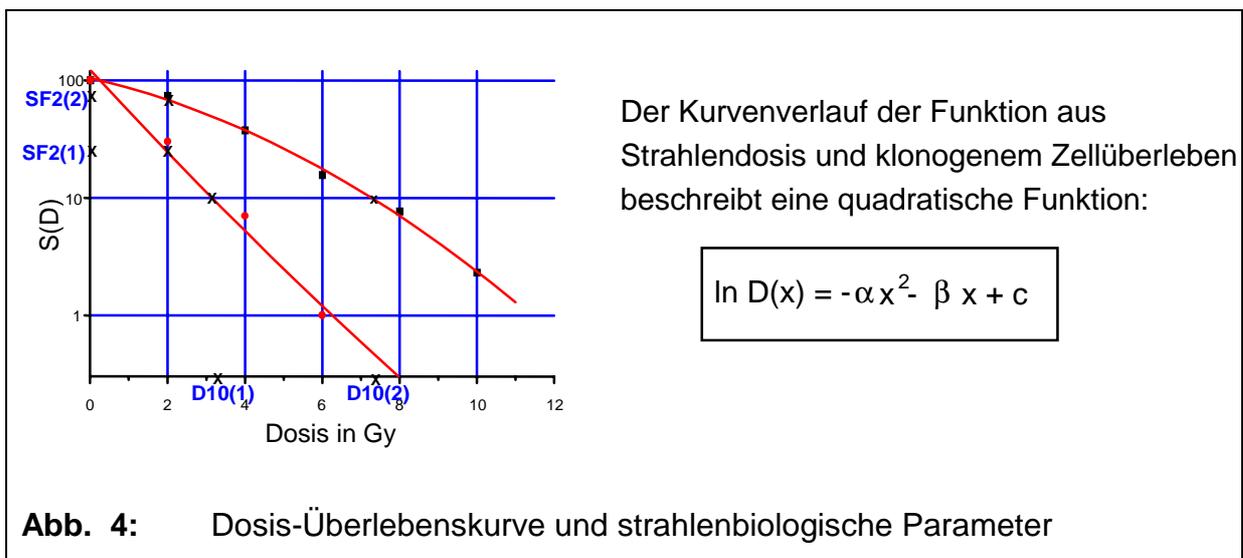
Vorgang:

- a) Zellen zu definierten Zeiten (siehe 3.1) nach Bestrahlung trypsinieren,
- b) Zellen mit Überstand vereinigen,
- c) Zellen 5 min bei 1.200 rpm zentrifugieren,
- d) Zellen waschen und in 20 µl PBS resuspendieren,
- e) 20 µl 1 %ige Trypanblau-Lösung zugeben,
- f) Zellzahl bzw. Vitalität mit der Neubauer-Zählkammer bestimmen.

### 3.3.2 Ermittlung der Strahlensensitivität mit dem Zellkoloniebildungstest

Die Bestimmung der Strahlensensitivität in vitro erfolgt in der Regel durch Endpunktmessungen. Neben Proliferations- und Aktivitätsuntersuchungen ist der Zellkoloniebildungstest der klassische Assay, um in vitro Strahlensensitivität zu ermitteln. Beim Zellkoloniebildungstest wird eine konfluent wachsende Zellkultur mit unterschiedlichen Strahlendosen (0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 und 12,0 Gy) bestrahlt und anschließend so dünn ausplattiert, daß Einzelzellen Zellkolonien ausbilden.

Der Verlauf der Dosis-Überlebenskurve gibt Auskunft über die Strahlensensitivität der Zelllinie (Abb. 4). Während Schulterkurven charakteristisch für strahlenresistente Zelllinien sind, weist ein linearerer Verlauf der Funktion auf eine strahlensensitive Zelllinie hin.



Aus der Dosis-Überlebenskurve können die verschiedenen strahlenbiologischen Parameter ermittelt werden. Wichtige Parameter einer Dosis-Überlebenskurve sind der SF2-Wert, der D10-Wert, der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Wert.

strahlenbiologische Parameter:

- SF2-Wert      Zellüberleben nach einer Strahlendosis von 2,0 Gy,
- D10-Wert      Bestrahlungsdosis, bei der 10,0 % der Zellen überleben,
- $\alpha$ -Wert      Maß für die Strahlensensitivität bei niedrigen Strahlendosen,
- $\beta$ -Wert      Maß für die Strahlensensitivität bei hohen Strahlendosen.

Die Bestimmung der klonogenen Überlebensraten pro Strahlendosis erfolgte als Dreifachansatz. Für die Ermittlung der Überlebenskurve wurden 5 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Im Vorfeld wurde die optimale Plattiereffizienz (PE) für die verschiedenen Sarkom-Zelllinien ermittelt.

Vorgang:

- a) konfluent wachsende Zellen unmittelbar nach Bestrahlung trypsinieren,
- b) 5 min bei 1.200 rpm zentrifugieren,
- c) Überstand abnehmen und Pellet in Medium bzw. PBS resuspendieren,
- d) Zellzahl bestimmen,
- e) Vorbereiten der Kulturflaschen und Einstreuen einer definierten Zellzahl (200 bis 400 Zellen),
- f) Verteilen der Zellen durch gleichmäßiges schwenken,
- g) pro Ansatz werden 3 Parallelansätze durchgeführt,
- h) Kulturflaschen in den Brutschrank zwischen 10 bis 14 Tagen kultivieren,
- i) Medium nach ca. 5 Tagen wechseln,
- j) Medium abgießen und waschen mit H<sub>2</sub>O,
- k) Fixieren der Zellkolonien mit 4 %iger Formaldehyd-Lösung, 20 min bei RT,
- l) mit H<sub>2</sub>O abgießen und waschen,
- m) mit Giemsa-Lösung für 8 bis 10 min inkubieren,
- n) zweimal waschen mit H<sub>2</sub>O und anschließend trocknen,
- o) Auszählen der markierten Zellkolonien (>50 Zellen, mikroskopische Kontrolle).

### 3.3.3 Apoptoseanalyse

#### 3.3.3.1 DAPI-Analyse - morphologische Analyse des Zellkerns

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole) interkaliert in die AT-reichen Regionen der DNS. Nach DNS-Markierung ist die morphologische Analyse der DAPI markierten Zellkerne mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Fluoreszenzfiltersatz für blaue Fluoreszenz (DAPI-Filter). 500 Zellkerne wurden nach den morphologisch-apoptotischen Kriterien Kernpyknose, Kernfragmentierung und Zellgröße analysiert. Der durchschnittliche prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl wurde in 10 Sichtfeldern bestimmt. Die Messung von Induktion und Verlauf der Apoptose erfolgte im Untersuchungszeitraum 0 bis 72 h nach Bestrahlung qualitativ und quantitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie. Für das Bestimmen der Apoptoserate wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

#### Vorgang:

- a) Zellen trypsinieren und mit Überstand vereinigen,
- b) 5 min zentrifugieren bei 1.200 rpm,
- c) Pellet in PBS resuspendieren,
- d) Zellzahl bestimmen,
- e) in einem Tropfen PBS resuspendieren und unter schwenken 80 % igen Ethanol zutropfen, 10-20 min fixieren und bei 4 °C lagern,
- f) 2x mit PBS waschen und resuspendieren,
- g) 2,5 bis 5 x 10<sup>4</sup> Zellen 5 min bei 1500 rpm auf Objektträger (OT) zentrifugieren,
- h) vorsichtig Überstand abnehmen,
- i) 2 min bei 3.000 rpm trocken zentrifugieren,
- j) Zellen auf OT 5 min antrocknen lassen,
- k) DAPI-Stamm-Lösung 1:10.000 mit PBS verdünnen und OT 5 min im Dunkeln inkubieren (eingesetzte Konzentration: 0,1 µg/ml PBS),
- l) 2x mit PBS waschen,
- m) OT mit Antifading eindecken,
- n) fluoreszenzmikroskopische Auswertung bei 490 nm.

### 3.3.3.2 TUNEL-Test - enzymatische Analyse von DNS-Fragmenten

Der TUNEL („terminal-uridine-nick-end-labeling“) -Test ist ein enzymatischer Assay, um an fixierten Zellen DNS-Fragmentierung in situ nachzuweisen. Mittels Terminaler Transferase (TdT) werden FITC-markierte dUTP's an einzel- und doppelsträngigen DNS-Enden synthetisiert. In Zellen mit fragmentierter DNS (apoptotische Zellen) wird verstärkt FITC-markiertes dUTP eingebaut. So lassen sich die apoptotischen Zellen von den nichtapoptotischen durch ihre stärkere Fluoreszenzintensität unterscheiden. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Fluoreszenzfiltersatz für grüne Fluoreszenz (FITC-Filter). Ebenso wie bei der DAPI-Analyse erfolgte die Analyse von 500 Zellen bei 10 Sichtfeldern.

#### Vorgang:

- a) Zellen trypsinieren und mit Überstand vereinigen,
- b) 5 min zentrifugieren bei 1.200 rpm,
- c) Pellet in PBS resuspendieren
- d) Zellzahl bestimmen,
- e) in 1 Tropfen PBS resuspendieren und unter schwenken 4 %ige Formaldehyd-Lösung zutropfen (Beachte: Formalin frisch herstellen 30 min/ RT fixieren.),
- f) 2x mit PBS waschen und resuspendieren,
- g) ca. 2,5 bis  $5 \times 10^4$  Zellen 5 min bei 1.500 rpm auf OT zentrifugieren,
- h) vorsichtig Überstand abnehmen,
- i) 2 min bei 3.000 rpm trocken zentrifugieren,
- j) 5 min Zellen auf OT antrocknen lassen,
- k) 3 min mit eiskalter Permabilisierungslösung inkubieren,
- l) OT mit PBS waschen,
- m) 60 min mit TUNEL-Reagenz im Dunkeln bei 37 °C inkubieren

#### TUNEL-Reagenz (Kit):

450 µl Puffer mit DNT's,

50 µl Enzym (TdT),

- n) 2x mit PBS waschen,
- o) OT mit Antifading eindecken,
- p) fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

### **3.3.3.3 Kombination von TUNEL-Test und DAPI-Analyse**

Zusätzlich ist die Kombination der beiden oben beschriebenen Methoden (siehe 3.3.3.1 und 3.3.3.2) möglich, da die beiden Fluoreszenzfarbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren und emittieren. Es erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Signale mit dem Fluoreszenzfiltersatz für blaue Fluoreszenz (DAPI-Filter) und für grüne Fluoreszenz (FITC-Filter).

#### Vorgang:

- a) Schritte 3.3.3.2 a-n,
- b) Schritte 3.3.3.1 k-n.

### **3.3.3.4 DNS-Leiter-Assay - elektrophoretische Analyse von DNS-Fragmenten**

Der DNS-Leiter-Assay ist ein Apoptosenachweis, bei dem die isolierte DNS elektrophoretisch aufgetrennt wird. Während der Apoptose erfolgt ein enzymatischer Abbau des Chromatins. Da Nukleasen die DNS nur in den Histon H1-Linkerregionen („nackte-DNS“) schneiden können, weisen DNS-Fragmente bei der enzymatischen Lyse charakteristische Fragmentlängen (das jeweils Vielfache von 146 bp) auf. Die gesamte DNS wird mit EtBr markiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNS von apoptotischen Zellen sind charakteristische DNS-Banden („DNS-Leiter“) detektierbar.

#### Vorgang:

- a)  $10 \times 10^6$  Zellen trypsinieren und mit Überstand vereinigen,
- b) Zentrifugieren bei 1.200 rpm/ 5 min,
- c) Pellet in PBS resuspendieren und Zellzahl bestimmen,
- d) Lysieren der Zellen mittels 0,5 ml Lysepuffer (Puffer 1) 20 min bei RT,
- e) Zentrifugieren bei 13.000 rpm/ 20 min bei 4 °C,
- f) Überstand vorsichtig abnehmen (DNS-Fragmente),
- g) Überstand + 0,5 mM Proteinase-Puffer (Puffer 2), 1 h bei 50 °C inkubieren, anschließend abkühlen auf 4°C,
- h) Zentrifugieren bei 13.000 rpm/ 20 min bei 4 °C,

- i) Überstand vorsichtig abnehmen (DNS-Fragmente),
- j) mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol(1:1:1) vorsichtig schütteln,
- k) Zentrifugieren bei 13.000 rpm/ 10 min bei 4 °C ,
- l) obere Phase abnehmen (bei breiter Interphase wiederholen),
- m) Zugabe von 2 Volumen Ethanol und DNS über Nacht bei -20 °C ausfällen lassen,
- n) Zentrifugieren bei 13.000 rpm/ 10 min bei 4°C ,
- o) Überstand verwerfen, Pellet trocknen lassen und in Auftragspuffer lösen,
- p) optische Dichte bei 260 nm (OD) bestimmen,
- q) 10 µg/ml RNase 1 h bei 37 °C inkubieren,
- r) neutrale Elektrophorese:

Agarosegel: 1,5-2,0 %,

1xTBE-Puffer, pH 8,0,

Lauf: 30 V, ca 16 h.

### **3.3.3.5 Annexin-V-Test - Analyse von Umbauten der Zellmembran**

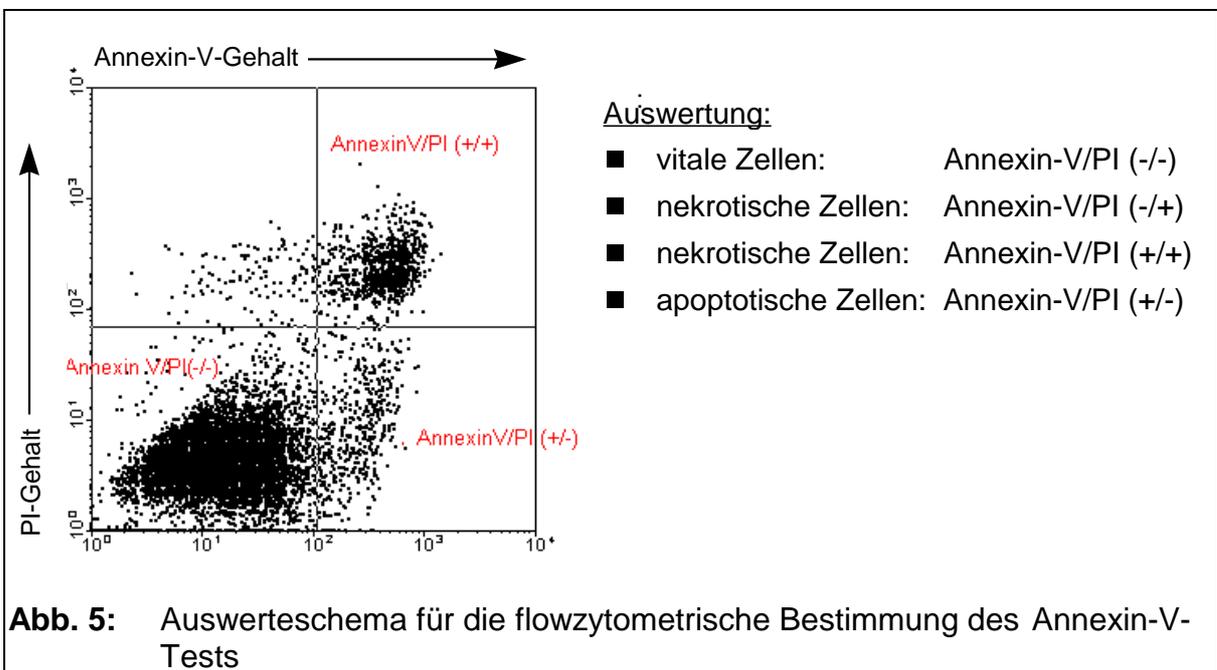
In apoptotischen Zellen kommt es frühzeitig zu einer Translokation des an der Innenseite der Zellmembran ständigen Phospholipids Phosphatidylserins (PS) (Martin et al., 1995). Beim Annexin-V-Test werden die Zellen unter vitalen Bedingungen mit einem FITC-konjugiertem-Annexin-V und einer Propidiumjodid (PI)- Lösung inkubiert. Annexin-V bindet aufgrund seiner starken natürlichen Affinität PS.

Durch die flowzytometrischen Analyse lassen sich die apoptotischen Zellen mittels Zweiparameteranalyse (Dotplot) als PI-negative und „Annexin-V-positive“ Zellen detektieren (siehe Abb. 5). Die Auswertung der Durchflußzytometrie-Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms Win-MDI.

#### Vorgang:

- a) Zellen trypsinieren und mit Überstand vereinigen,
- b) zentrifugieren bei 1.200 rpm /5 min,
- c) Pellet in PBS resuspendieren und Zellzahl bestimmen,
- d) ca.  $1 \times 10^5$  Zellen zentrifugieren bei 1.200 rpm/ 5 min,
- e) Zellpellet in einem Tropfen PBS resuspendieren,
- f) mit 500 µl Annexin-Puffer waschen,

- g) Zentrifugieren bei 1.200 rpm/ 5 min,  
h) Zellpellet resuspendieren in 1 Tropfen Annexin-V-Puffer,  
i) mit 100 µl Reaktionsmix 10 bis 15 min im Dunkeln inkubieren,  
Reaktionsmix: 100 µl Annexin-V-Puffer,  
+ 5 µl Annexin-FITC,  
+10 µl PI-Lösung (50 µg/ ml Stamm-Lösung),  
j) auf 500 µl mit Annexin-Puffer auffüllen,  
k) flowzytometrische Vermessung der Zellpopulationen am FACSScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany),  
l) Zellen mit dem Auswerteprogramm Win-MDI analysieren.



### 3.3.4 Zellzyklusanalyse

Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgt durch die Analyse des DNS-Gehaltes der Zellen nach PI-Einbau. PI-markierte Kerne emittieren das Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von 580 nm bis 650 nm. Im Untersuchungs-Zeitraum (0 h bis 72 h nach Bestrahlung) wurden die Zellen mittels Flowzytometrie analysiert. Alle Messungen erfolgten mit dem „Cycle-TEST™-PLUS-DNS-Reagent-Kit“ am FACSScan im Rahmen von Routineuntersuchungen durch Frau Schramm, Herrn Dr.

Fröde und Herrn Klapperstück (Hautklinik der MLU Halle). Da PI an die DNS stöchiometrisch bindet, ist mit dieser Ein-Parameter-Messung eine Einteilung der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase-Zellen möglich (vergleiche Abb. 6). Die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde mit dem Auswerteprogramm CellFit (Vers 2.0) durchgeführt.

Vorgang:

- a) Zellen trypsinieren und mit Überstand vereinigen,
- b) Zentrifugieren bei 1.200 rpm/ 5 min,
- c) Pellet in PBS resuspendieren und Zellzahl bestimmen,
- d) 5 bis  $10 \times 10^5$  Zellen zentrifugieren bei 1.200 rpm/ 5 min,
  - a) in einem Tropfen PBS resuspendieren,
  - b) unter Vortexen 5 ml 80 % igen Alkohol zutropfen (Fixieren der Zellen),
  - c) bei 4°C bis zum Vermessen aufbewahren,
  - d) 5 min mit 1500 rpm zentrifugieren,
  - e) Überstand entfernen und mit 1 ml Citronat-Puffer 15 min inkubieren,
  - f) 5 min mit 1500 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren,
  - g) 350 µl RNase-Lösung hinzugeben, 10 min Inkubation bei RT,
  - h) 400 µl PI-Lösung hinzugeben (125 µg/ml Citronatpuffer) (Becton Dickinson) und 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubieren,
  - i) flowzytometrische Auswertung der DNS-Verteilung der Zellen mit dem Programm CellFit (Vers 2.0).

### **3.3.5 Analyse der strahleninduzierten Genexpression**

#### **3.3.5.1 Proteinisolation**

Vorgang:

- a) Zellen trypsinieren (siehe Zellkultivierung) und mit Überstand vereinigen,
- b) 5 min zentrifugieren bei 1.200 rpm,
- c) Zellpellet in 20-50 µl Laemmli-Puffer resuspendieren,
- d) Zell-Homogenisat 10 min bei 95 °C kochen und anschließend kurzzeitig mit Ultraschall behandeln (2 bis 5 s),
- e) 10 min zentrifugieren bei 12.000 rpm,

- f) Überstand (lösliche Proteine) abnehmen und Proteingehalt mit Hilfe der Lowry-Methode bestimmen („Protein-Assay-Kit“, Sigma),
- g) das Protein bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei  $-20\text{ °C}$  lagern.

### 3.3.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry

#### Vorgang:

- a) je 5  $\mu\text{l}$  Probe in Teströhrchen überführen,
- b) Zugabe von 0,1 ml DOC-Lösung,
- c) Probe durchmischen und 10 min bei RT inkubieren,
- d) Zugabe von 0,1 ml Trichloraceton, gut durchmischen,
- e) 5 bis 10 min bei 12.000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen,
- f) Pellet in 1 ml Lowry-Lösung lösen und in Teströhrchen überführen,
- g) mit 1 ml dest  $\text{H}_2\text{O}$  ausspülen und in Teströhrchen überführen,
- h) gut durchmischen und 20 min bei RT inkubieren,
- i) Zugabe von 0,5 ml F&C Phenol unter schwenken,
- j) 30 min bei RT inkubieren (Farbentwicklung),
- k) Vermessen der Standardkonzentrationen, Blindwert und Proben bei 750 nm,
- l) Erstellen der Eichkurve,
- m) Ermittlung der zu bestimmenden Proteinkonzentrationen aus der Eichkurve.

### 3.3.5.3 Westernblotanalyse

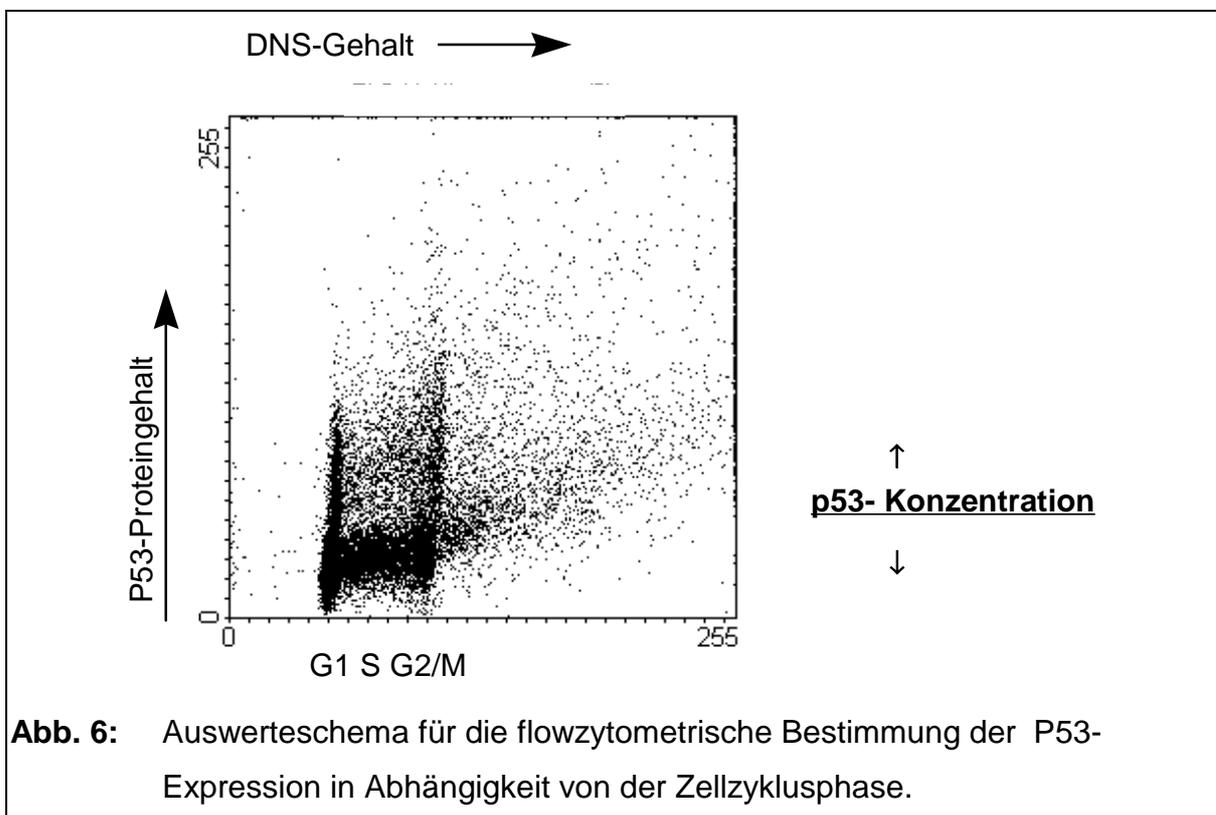
#### Vorgang:

- a) 30-50  $\mu\text{g}$  Protein unter Zusatz von Bromphenolblau in 10 oder 12 %igen SDS-PAA-Gelen bei 25-30 mA 2-4 h lang auftrennen,
- b) 2x inkubieren mit Wasch-Lösung, 20 min bei RT,
- c) Proteintransfer auf PVDM-Membran (0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore) mittels Transferpuffer mit einer Elektrotransferapparatur (Fastblot, „Halb-Trocken-Blot-Methode“, Biometra) bei 460-480 mA/  $\text{cm}^2$ ; 1,0 bis 1,5 h),
- d) Proteinfärbung mit 0,1 %iger Coomassieblau-Lösung,
- e) 2x inkubieren mit Entfärbe-Lösung, 20 min bei RT,

- f) Blockieren der PVDM-Membran mit Blockierungsreagenz, 30 min bei RT,
- g) Inkubieren mit dem Primär-Antikörper (Ak), 1-2 h im Kühlschrank,
- h) 3x waschen mit Blockierungsreagenz, 20 min bei RT,
- i) Inkubation mit dem POD-konjugierten Sekundär-Antikörper, 1h bei RT,
- j) Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System (Amersham Buchler),
- k) Blots auf Röntgenfilm exponieren, 1 bis 15 min bei RT.

### 3.3.6 Flowzytometrische P53-Bestimmung

Die Zellen werden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit einem FITC konjugiertem p53-Ak bzw. mit PI-Lösung inkubiert und am FACSscan vermessen. Bei dieser flowzytometrischen Zweiparameteranalyse lassen sich die einzelnen Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) separat auswerten (siehe 3.3.4 Zellzyklusanalyse). Zusätzlich wurde das Fluoreszenzmaximum der zu analysierenden Probe mit der Isotypenkontrolle verglichen, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Win-MDI.



**Abb. 6:** Auswerteschema für die flowzytometrische Bestimmung der P53-Expression in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase.

Vorgang:

- a) Zellen trypsinieren und mit Überstand vereinigen,
- b) Zentrifugieren bei 1.200 rpm/ 5 min,
- c) Pellet in PBS resuspendieren und Zellzahl bestimmen,
- d)  $5 \times 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren,
- e) Überstand dekantieren, ca 100 µl belassen und Pellet aufklopfen
- f) 1ml Ethanol (-20 °C) unter sanftem Schütteln eintropfen und Zellen 5 min bei 4 °C fixieren,
- g) 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren (Filterpapier),
- h) Permeabilisieren der Zellmembran mit 2 ml PBT, Pellet aufklopfen und 10 min inkubieren,
- i) 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen,
- j) Zellen mit 15 µl P53-AK (Do7-FITC) bzw. Isotypenkontrolle (X0959) 30 bis 45 min im Dunkeln inkubieren,
- k) Entfernen des überschüssigen Antikörpers mit 2 ml PBT/ 5 min,
- l) 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen,
- m) 300 µl RNase-Lösung hinzufügen und 10 min inkubieren,
- n) 300 µl 5 %ige PI-Lösung hinzufügen und 10 min im Dunkeln inkubieren,
- o) bei 4 °C im Durchflußzytometer vermessen,
- p) Auswertung der Durchflußzytometrie Analyse mit Hilfe des Programmes WinMDI.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in zwei WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus**

#### **4.1.1 Einfluß der Strahlendosis auf Zellwachstum und Zellvitalität**

Im ersten Abschnitt wurde der Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in den beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) bestimmt. Untersucht wurde die Dosisabhängigkeit von Zellwachstum und Zellvitalität bei Strahlendosen zwischen 0,4 und 24,0 Gy im Untersuchungszeitraum von 0 bis 96 h nach einer Bestrahlung. In beiden WTS-Zelllinien ist zu beobachten, daß eine Bestrahlung sowohl die Zellproliferation hemmt als auch das Zellüberleben beeinflusst. Dabei waren die strahlenbiologischen Effekte für beide WTS-Zelllinien zeit- und dosisabhängig. Das heißt mit zunehmender Strahlendosis nehmen in beiden Zelllinien die strahlenbiologischen Effekte zu. Eine Bestrahlung mit Strahlendosen von 0,4 oder 2,0 Gy löst sowohl in der Zelllinie A-204 (wt-p53) als auch in der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) eine Wachstumsverzögerung (lag-Phase) aus. Jedoch ca. 24 bis 48 h nach Bestrahlung kehren beide Zelllinien wieder in die logarithmische Wachstumsphase zurück. Dagegen findet nach der Bestrahlung mit Strahlendosen von 6,0 oder 12,0 Gy keine Zellverdopplung mehr statt (Tab. 2).

Die Analyse der nekrotischen Zellen mit dem Trypanblau-Test zeigt ebenso, daß die Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen in beiden WTS-Zelllinien nur in geringem Maße die Zellvitalität beeinflusst. So sinkt nach Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 0,4 oder 2,0 Gy die Vitalität der Zelllinie A-204 (wt-p53) um 2,3 bis 5,9 % bzw. die Vitalität der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) um 0 bis 4,6 % (Tab. 2). Mit zunehmender Strahlendosis (6,0 bis 12,0 Gy) nimmt in beiden WTS-Zelllinien der Effekt der Bestrahlung zu. Jedoch zeigen sich auch Unterschiede zwischen den Zelllinien nach einer Bestrahlung mit hohen Strahlendosen. Während die Vitalität der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) nach der Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 6,0 oder 12 Gy noch 86,6 bis 83,4 % beträgt (bei unbestrahlten Kontrollzellen 91,3 %), sinkt die Vitalität der WTS-Zelllinie A-204 (wt-p53) von 87,7 % (unbestrahlte Kontrollzellen)

auf 74,7 bis 64,3 %. So reagiert die Zelllinie A-204 (wt-p53) im Vergleich mit der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) insbesondere bei hohen Strahlendosen sensitiver auf Bestrahlung.

**Tab. 2** Einfluß der Strahlendosis auf die Verdopplungszeit und Vitalität

<u>Dosis</u>	A-204(wt-p53)		US8-93(mt-p53)	
	<u>Verdopplungszeit</u>	<u>Vitalität</u>	<u>Verdopplungszeit</u>	<u>Vitalität</u>
0 Gy	31,8 h	87,7 % (86,0 %-91,0 %)	32,7 h	91,3 % (89,0 %-94,0 %)
0,4 Gy	37,0 h	85,4 % (83,2 %-87 %)	34,2 h	91,4 % (86,0 %-93,0 %)
2,0 Gy	40,0 h	81,8 % (80,0 %-84,7 %)	39,0 h	86,7 % (78,7 %-93,0 %)
6,0 Gy	-	74,7 % (68,0 %-79,0 %)	-	86,6 % (83,6 %-90,6 %)
12,0 Gy	-	64,3 % (55,0 %-71,0 %)	-	83,4 % (82,8 %-87,0 %)

**Tab. 2:** Dosis-abhängige Verdopplungszeit und Vitalität der beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) zwischen 48 und 96 h nach einer Bestrahlung mit 0; 0,4; 2,0; 6,0 und 12,0 Gy (aus Bache et al., 1997).

#### 4.1.2 Einfluß der Strahlendosis auf Zellzyklus und Apoptoseinduktion

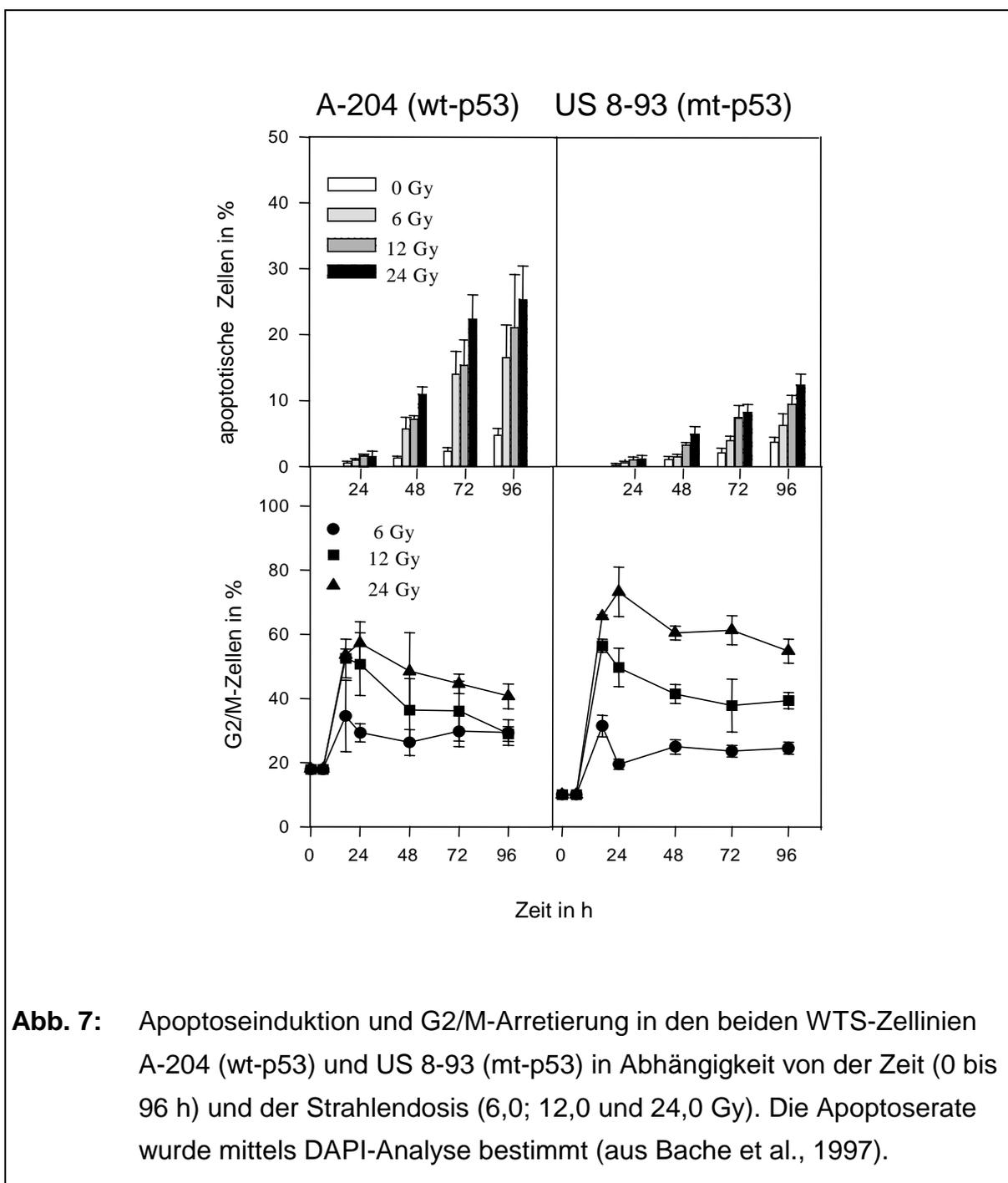
Die Analyse des Zellzyklus bzw. der Apoptose nach Strahlendosen von 0,4 bis 24,0 Gy erfolgte für die beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) 0 bis 96 h nach Bestrahlung. Während Untersuchungen mit Strahlendosen von 0,4 und 2,0 Gy keinen Einfluß auf eine Zellzyklusarretierung erkennen lassen, zeigen Untersuchungen mit 6,0; 12,0 und 24,0 Gy, daß durch eine Bestrahlung mit hohen Strahlendosen in beiden WTS-Zelllinien ein G2/M-Arrest ausgelöst wird. Dabei nimmt die Stärke des G2/M-Blocks in beiden WTS-Zelllinien mit zunehmender Strahlendosis zu. So arretieren nach der Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 6,0 Gy; 12,0 Gy bzw. 24,0 Gy in der Zelllinie A-204 (wt-p53) 34,6 %, 52,6 % bzw. 57,2 % (bei den unbehandelten Kontrollzellen 18,1 %) und in der Zelllinie US 8-93

(mt-p53) 32,8 %, 58,2 % bzw. 75,3 % (bei den unbehandelte Kontrollzellen 11,0 %) in der G2/M-Phase (Abb. 7). Das Maximum an G2/M-Zellen wird in beiden WTS-Zelllinien erst ca. 18 bis 24 h nach Bestrahlung erreicht. Nach Erreichen des G2/M-Maximums ist wieder ein Absinken an G2/M-Zellen zu beobachten. Jedoch auch 96 h nach einer Bestrahlung wird in beiden Zelllinien nicht das Ausgangsniveau an G2/M-Zellen erreicht. So induziert eine Bestrahlung mit Strahlendosen von 6,0 bis 24,0 Gy in beiden WTS-Zelllinien einen lang andauernden G2/M-Block (Abb. 7).

Betrachtet man die Dosisabhängigkeit des G2/M-Blocks in den beiden Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53), so sind ebenfalls hohe Strahlendosen von 6,0 bis 24,0 Gy erforderlich, um Apoptose zu induzieren. Mit zunehmender Strahlendosis nimmt in beiden WTS-Zelllinien die Apoptoserate zu. Weiterhin wird in beiden WTS-Zelllinien (mit ca. 48 h nach Bestrahlung beginnend) Apoptose erst spät induziert. Mit zunehmender Inkubationszeit (48 bis 96 h nach Bestrahlung) ist in beiden WTS-Zelllinien ein Ansteigen der Apoptosefrequenz zu beobachten. Dabei konnte das Apoptosemaximum erst mit dem Endpunkt der Messungen ermittelt werden (96 h nach der Bestrahlung). Das Apoptosemaximum nach einer Strahlendosis von 6,0 Gy; 12,0 Gy bzw. 24,0 Gy beträgt in der Zelllinie A-204 (wt-p53) 16,6 %, 21,1 % bzw. 25,3 % (bei den unbehandelten Kontrollzellen 4,7 %) und in der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) 6,2 %, 9,6 % bzw. 13,6 % (bei den unbehandelten Kontrollzellen 3,9 %) (Abb. 7).

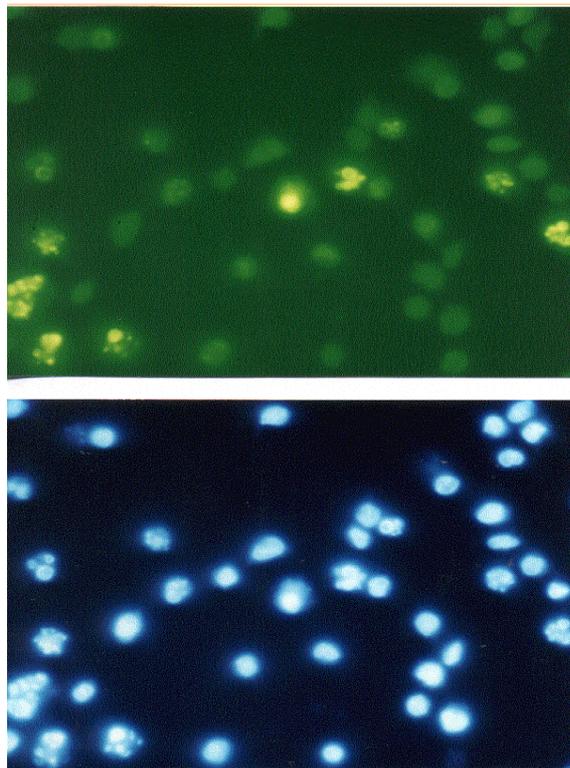
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose für die beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) zeit- und dosisabhängig erfolgt. Mit zunehmender Strahlendosis wird in beiden WTS-Zelllinien sowohl ein G2/M-Block als auch Apoptose induziert. Nach Erreichen des des G2/M-Maximums sinkt in beiden Zelllinien der Anteil an G2/M-Zellen zeitlich verzögert wieder ab. Gleichzeitig findet man nur einen allmählichen Anstieg der Apoptoserate, was darauf hinweist, daß der Austritt der Zellen aus ihrer G2/M-Arretierung und die Induktion der Apoptose in beiden WTS-Zelllinien miteinander gekoppelt sind. Auch 96 h nach Bestrahlung wird in beiden WTS-Zelllinien das Ausgangsniveau an G2/M-Zellen nicht erreicht. Dieser Effekt korreliert in den beiden WTS-Zelllinien sowohl mit den niedrigen Apoptosemaxima als auch mit der späten Induktion der Apoptose (Abb. 7). Unterschiede zwischen den beiden WTS-Zelllinien lassen sich sowohl im Zeitpunkt der Apoptoseinduktion als auch bei der Ausprägung

des G2/M-Blocks aufzeigen. In der mt-p53 Zelllinie (US 8-93) wird mit zunehmender Strahlendosis ein stärkerer G2/M-Block hervorgerufen als in der wt-p53 Zelllinie (A-204). Umgekehrte Verhältnisse sind dagegen in den Apoptoseraten zu finden (Abb. 7). So ist in der mt-p53 Zelllinie (US 8-93) ein mit zunehmender Strahlendosis stärkerer G2/M-Arrest an eine niedrigere Zelltodrate (siehe auch Zellvitalität) gekoppelt, während andererseits in der wt-p53 Zelllinie (A-204) ein schwach ausgeprägter G2/M-Arrest nach Bestrahlung mit einer erhöhten Apoptoseinduktion korreliert.



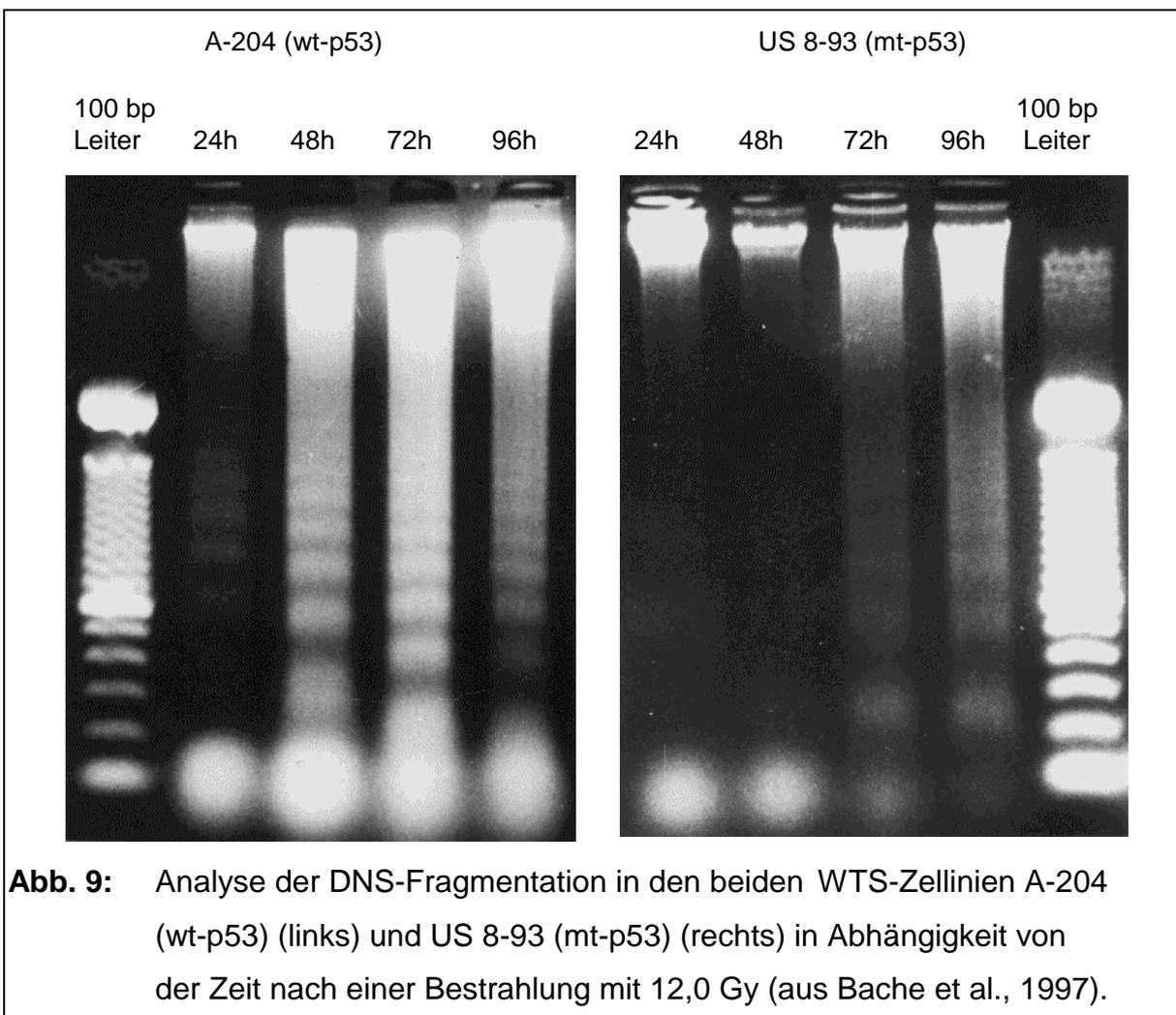
#### 4.1.3 Apoptoseanalyse mit unterschiedlichen Methoden

Um die Apoptose qualitativ und quantitativ zu bestimmen, wurden unterschiedliche Methoden etabliert, die verschiedene Merkmale apoptotischer Zellen erfassen (siehe Methodenteil 3.3.3). Der **TUNEL-Test** bzw. die **DAPI-Analyse** können sowohl einzeln als auch in Kombination durchgeführt werden. Dabei erlaubt die fluoreszenzmikroskopische Auswertung beider Methoden den Nachweis der Apoptose auf Einzelzellniveau. Mittels der Kombination von TUNEL-Test und der DAPI-Analyse konnte sowohl für die Zelllinie A-204 (wt-p53) als auch für die Zelllinie US 8-93 (mt-p53) gezeigt werden, daß Zellen mit morphologischen Apoptosemerkmalen (DAPI-Analyse) in hohem Maße auch enzymatisch fragmentierte DNS aufweisen (TUNEL-Test) (Abb. 8).



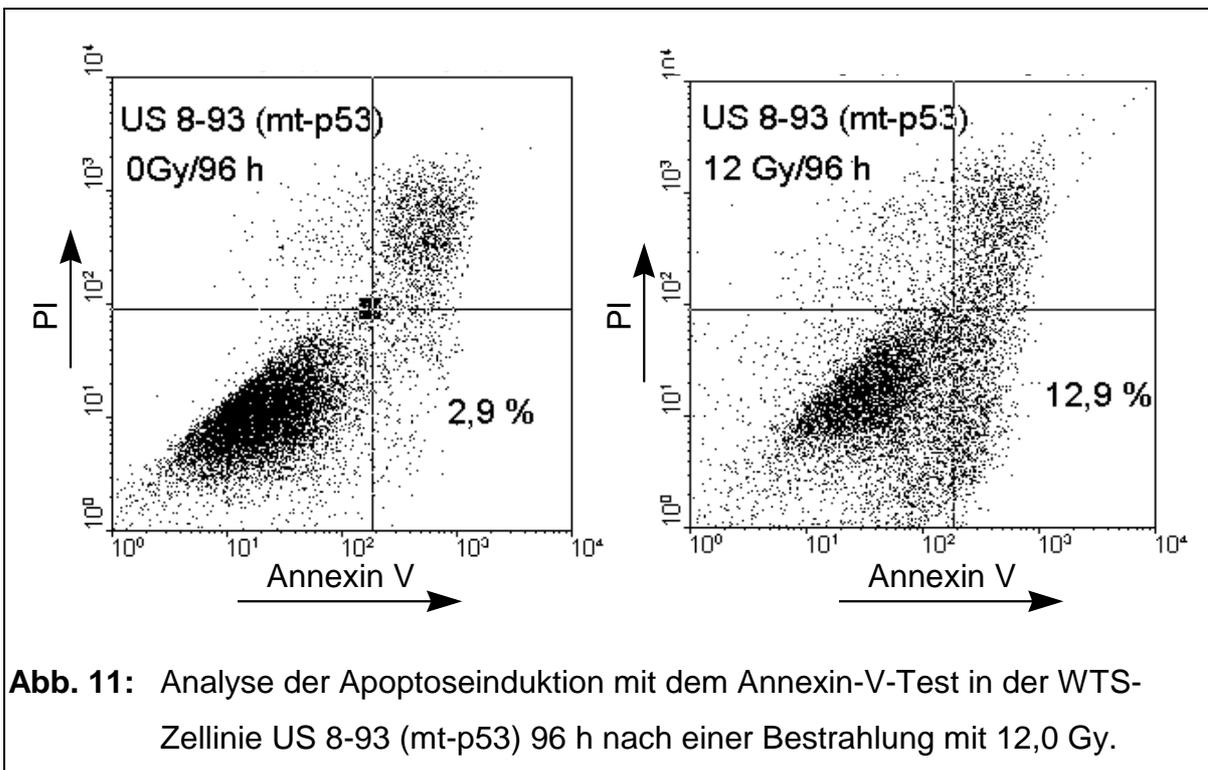
**Abb. 8:** Kombination von TUNEL-Reaktion (oben) und DAPI-Analyse (unten) an den nichtadhärenten Zellen (Überstand) der WTS-Zelllinie US 8-93 (mt-p53) 72 h nach einer Bestrahlung mit 12,0 Gy. Die mittels TUNEL-Reaktion stärker fluoreszierenden Zellen (gelbe Fluoreszenz) weisen nach DNS-Markierung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) typische morphologische Apoptosemerkmale auf (aus Bache et al., 1997).

Eine weitere Methode, um fragmentierte DNS nachzuweisen, ist der **DNS-Leiter-Assay**. Die elektrophoretische Auftrennung der DNS erlaubt die qualitative bzw. semiquantitative Bestimmung der Apoptose. Mittels der DNS-Leiter-Assay wurden die beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) mit verschiedenen Strahleneinzeldosen (2,0; 6,0 und 12,0 Gy) bestrahlt und 24 bis 96 h nach Bestrahlung analysiert. In beiden WTS-Zelllinien ist nach Bestrahlung eine DNS-Leiter nachweisbar. Dabei lassen sich sowohl in der A-204 (wt-p53) und als auch in der US 8-93 (mt-p53) semiquantitativ Unterschiede detektieren. Beispielsweise nimmt in beiden WTS-Zelllinien mit zunehmender Strahlendosis bzw. zunehmender Inkubationszeit die Intensität der DNS-Banden zu (Abb. 9 und 10). Zudem weist die mt-p53 Zelllinie US 8-93 nach einer Strahlendosis von 12,0 Gy nur eine schwache DNS-Fragmentation auf, was mit den niedrigen Apoptoseraten (unter 10,0 % bei 12,0 Gy) korreliert (Abb. 9).





Weiterführende Untersuchungen zeigen jedoch, daß der Annexin-V-Test nicht für jede Zelllinie geeignet ist. So scheint die Zellpräparation erhöhte Anforderungen an die Zellen zu stellen, da beispielsweise die unbehandelten Kontrollzellen der Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) nach der Zellpräparation ca. 30 % nekrotische Zellen (PI positive Zellen) aufwiesen.



**Abb. 11:** Analyse der Apoptoseinduktion mit dem Annexin-V-Test in der WTS-Zelllinie US 8-93 (mt-p53) 96 h nach einer Bestrahlung mit 12,0 Gy.

## 4.2 Strahlenbiologische Charakterisierung von fünf humanen Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (wt, mt, null)

### 4.2.1 Darstellung der strahlenbiologischen Charakterisierung

Im zweiten Arbeitsabschnitt wurde die strahlenbiologische Charakterisierung auf 5 humane Sarkom-Zelllinien ausgedehnt, um die Hypothese einer wt-p53 vermittelten Strahlenantwort in WTS zu überprüfen. Mit den Zelllinien LMS6-93, SAOS-2 und RD wurden drei weitere humane Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichen Veränderungen im p53-Gen ausgewählt (siehe Tab.1 ).

Aufgrund der strahlenbiologischen Charakterisierung der beiden Zelllinien A-204 und US 8-93 (Zeit- und Dosisabhängigkeit der Bestrahlung) wurden die drei Zelllinien LMS 6-93, SAOS-2 und RD mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy bestrahlt, um Zellzykluskontrolle und Apoptoseinduktion zu untersuchen. Für alle fünf Zelllinien erfolgte mit dem Zellkoloniebildungstest die Analyse des klonogenen Überlebens in Abhängigkeit von der Strahlendosis (Dosis-Überlebenskurve). Mit diesem Test wurde überprüft, ob auftretende Unterschiede in der Zellzykluskontrolle oder in der Apoptoseinduktion auch im Langzeitüberleben wiederzufinden sind. Ebenso wurde mittels Westernblotanalyse die Analyse der strahleninduzierten Genexpression von p53 und den p53-Targetgenen waf-1, mdm-2, bax bzw. den Zellzyklus- und Apoptose (regulierenden) Proteinen bcl-2, Cyklin-B und p34/<sup>Cdc2</sup> nach Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy untersucht.

#### **4.2.2 Zellkoloniebildungstest, Platiereffizienz, Dosis-Überlebenskurve und strahlenbiologische Parameter**

In Vorversuchen erfolgte die Optimierung des Zellkoloniebildungstests für die einzelnen Zelllinien. Dazu wurde die Platiereffizienz und Zellkoloniegröße in Abhängigkeit von der eingestreuten Zellzahl bzw. der Inkubationszeit ermittelt. Die einzelnen humanen Sarkom-Zelllinien weisen eine absolute Platiereffizienz von ca. 21,0 bis 60,0 % auf (siehe Tab. 3). Als optimal erwies es sich, ca. 100 bis 500 Zellen einzustreuen und diese 10 bis 14 Tagen zu kultivieren. Unter diesen Bedingungen waren die einzelnen Zellkolonien deutlich voneinander getrennt bzw. ließen sich optisch gut identifizieren. Bei Strahlendosen von mehr als 2,0 Gy wurde die doppelte Zellzahl eingestreut.

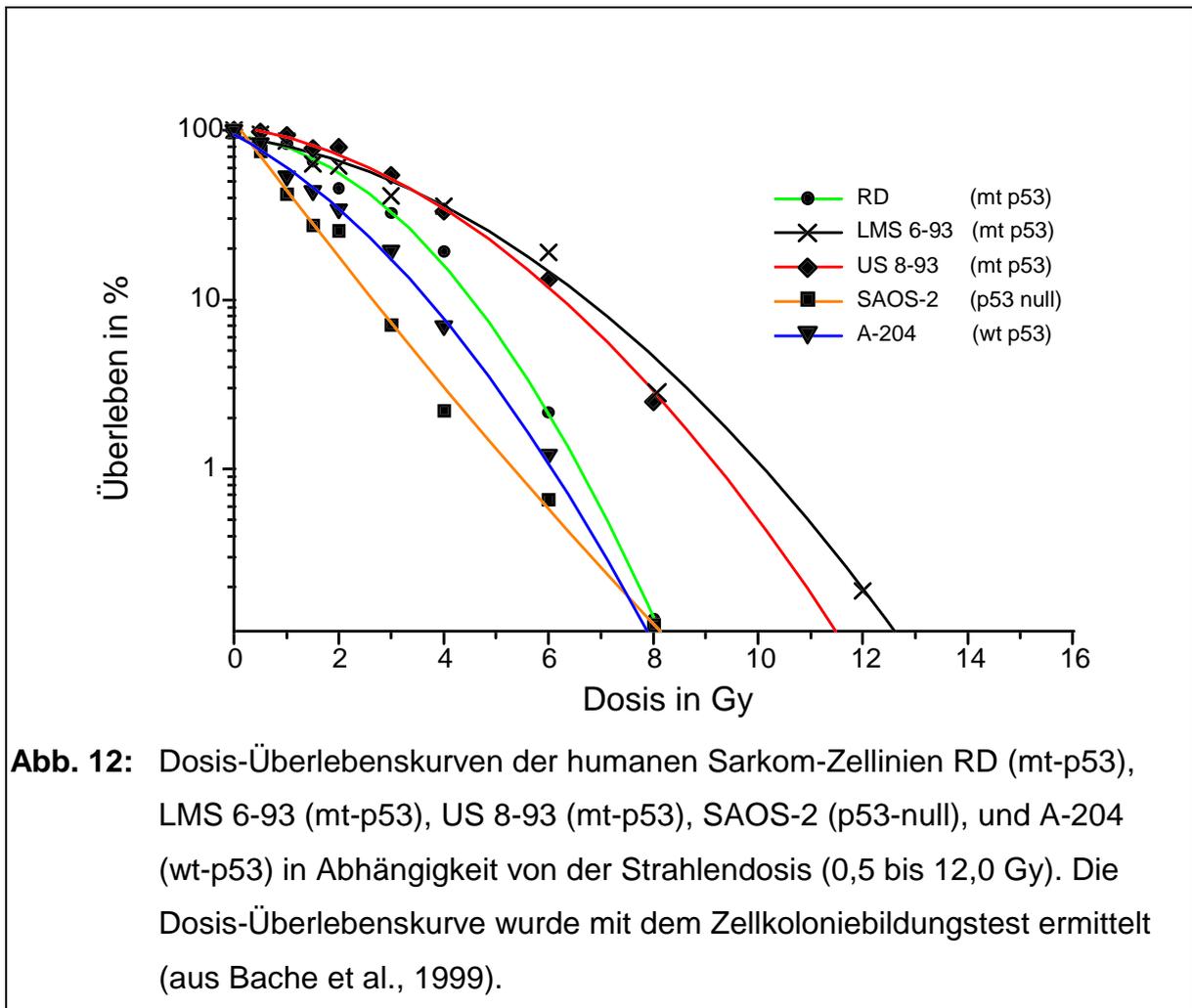
Für die Ermittlung der Dosis-Überlebenskurve wird die konfluent wachsende Zellkultur mit 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 und 12,0 Gy bestrahlt und die Platiereffizienz in Abhängigkeit von der Strahlendosis ermittelt (siehe Methodenteil 3.3.2). Die Dosis-Überlebenskurven der fünf Zelllinien bzw. die dazugehörigen strahlenbiologischen Parameter sind in Abb. 12 bzw. Tab. 3 dargestellt. Betrachtet man das klonogene Überleben der fünf Sarkom-Zelllinien nach Bestrahlung, so sind große Unterschiede detektierbar. Während beispielsweise in der Zelllinie US 8-93

(mt-p53) nach einer Strahlendosis von 2,0 Gy 79 % der Zellen überleben (SF2-Wert ist 0,79), weist die Zelllinie SAOS-2 (p53-null) nur noch ein klonogenes Zellüberleben von 28 % auf (Tab. 3). Ebenso lassen sich deutliche Unterschiede im klonogenen Zellüberleben der Zelllinien nach einer Bestrahlung mit höheren Strahlendosen detektieren. So überleben in den beiden selbst etablierten Sarkom-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) nach einer Strahlendosis von 6,0 Gy mehr als 10 % der Zellen (D10-Wert), während in den Zelllinien RD (mt-p53), A-204 (wt-p53) und der SAOS-2 (p53-null) kaum noch Zellkolonien ausgebildet werden (klonogenes Zellüberleben zwischen 1,3 % und 0,66 %). Ebenso weist die stark ausgeprägte Schulterkurve in den beiden selbst etablierten Sarkom-Zelllinien (US 8-93 und LMS 6-93) auf eine hohe Strahlenresistenz hin (Abb. 12). Dagegen zeigt der lineare Verlauf der Dosis-Überlebenskurve bei der Zelllinie SAOS-2 (p53-null), daß diese sensitiv auf Bestrahlung reagiert. Betrachtet man den p53-Genstatus der Zelllinien, läßt sich prinzipiell in den Zelllinien mit einer p53-Mutation ein erhöhtes klonogenes Überleben nach Bestrahlung (Strahlenresistenz) finden. So weisen drei von vier Sarkom-Zelllinien (US 8-93, LMS 6-93 und RD) mit defektem p53-Gen im Vergleich zur wt-p53 Zelllinie A-204 (SF2-Wert = 0,34, D10-Wert = 370 cGy) sowohl einen deutlich höheren SF2-Wert (SF2-Wert = 0.46 bis 0.79) als auch D10-Wert (D10-Wert = 456 bis 689 cGy) auf (Tab. 3).

**Tab. 3** Sarkom-Zelllinien, p53-Genstatus, Platiereffizienz und strahlenbiologische Parameter (SF2-, D10-,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Wert)

Zelllinie	p53-Status	PE	SF2-Wert	D10-Wert in cGy	$\alpha$ -Wert	$\beta$ -Wert
US 8-93	mt/wt	48 %	0,79 $\pm$ 0,22	633	0,110	0,043
LMS 6-93	mt/wt	60 %	0,62 $\pm$ 0,08	689	0,096	0,035
A-204	wt/wt	30 %	0,34 $\pm$ 0,15	370	0,339	0,060
SAOS-2	null	25 %	0,28 $\pm$ 0,08	273	-	-
RD	mt/-	21 %	0,46 $\pm$ 0,04	456	0,123	0,092

**Abk.:** US-undifferenziertes Sarkom, RMS-Rhabdomyosarkom, OS-Osteosarkom, LMS-Leiomyosarkom, mt-Mutation, wt-Wildtyp, PE-Platiereffizienz, SF2-Wert - Überlebende Zellfraktion (survival fraction) bei 2,0 Gy, D10-Wert -Strahlendosis bei der 10,0 % der Zellen überleben.

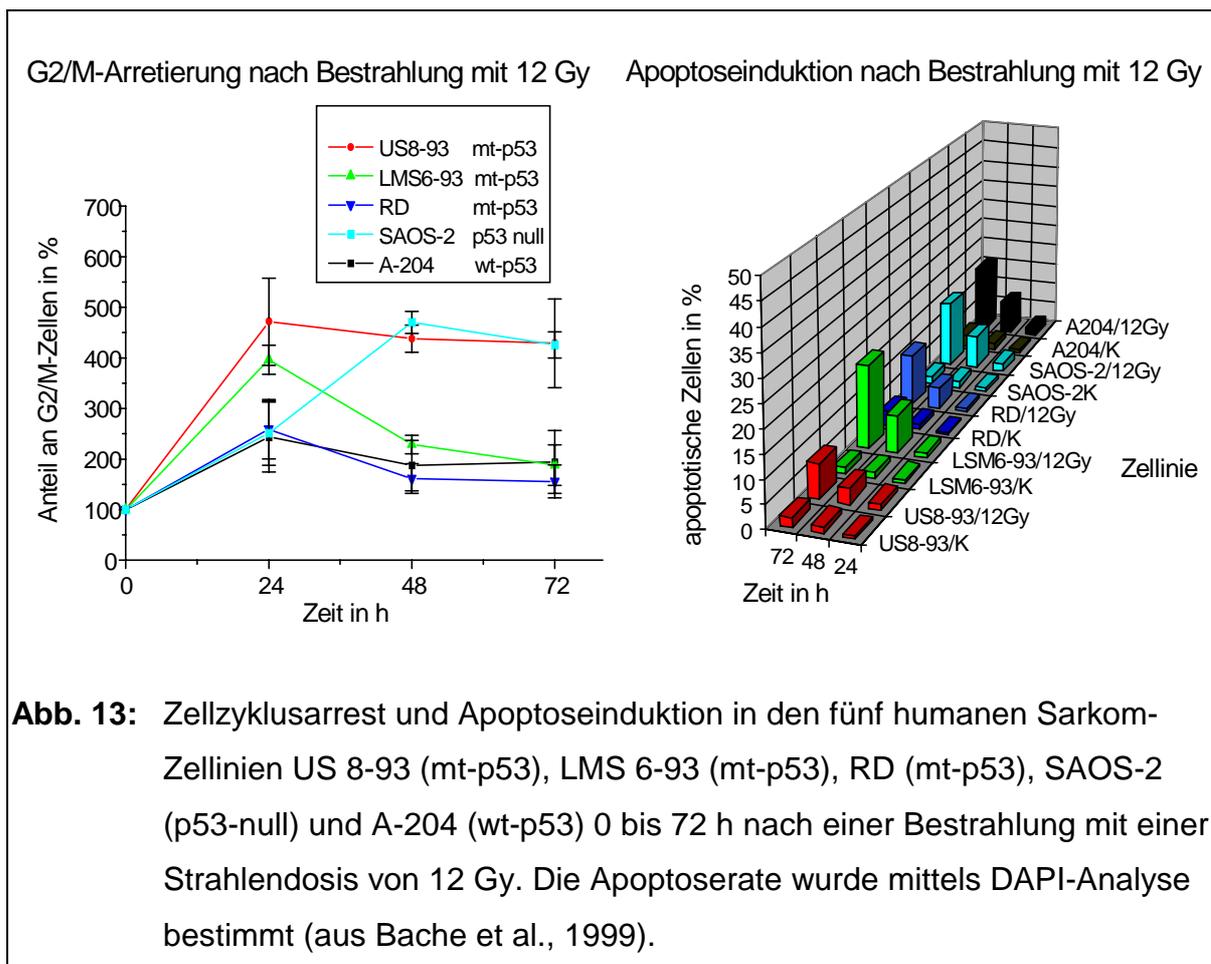


#### 4.2.3 Apoptose- und Zellzyklusanalyse

Die drei humanen Sarkom-Zelllinien LMS 6-93 (mt-p53), RD (mt-p53) und SAOS-2 (p53-null) wurden mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy bestrahlt und 0 bis 72 h nach Bestrahlung hinsichtlich Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest untersucht. Dabei reagieren zwei der drei Sarkom-Zelllinien (RD und LMS 6-93) auf Bestrahlung wie die bereits analysierten WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) sowohl mit einer Zellzyklusarretierung in der G2/M-Phase als auch der Induktion von Apoptose. Zudem scheint in den beiden Zelllinien RD und LMS 6-93 eine inverse Korrelation von G2/M-Zellen und Apoptoseinduktion vorzuliegen. So sinkt in beiden nach Erreichen des G2/M-Maximums (24 h nach Bestrahlung) der Anteil an G2/M-Zellen wieder ab. Gleichzeitig finden wir einen Anstieg der Apoptoserate 24 bis 72 h nach Bestrahlung. In den beiden WTS-Zelllinien RD (mt-p53) und LMS6-93 (mt-p53)

resultiert die Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy in einer Apoptoseinduktion von 9,8 % bzw. 18,2 % (Abb. 13).

In der strahlensensiblen Zelllinie SAOS-2 (p53-null) führt die Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy bereits vor Erreichen des G2/M-Maximums zur Apoptoseinduktion. Zudem wird das Maximum an G2/M-Zellen erst 48 h nach Bestrahlung erreicht (Abb. 13), wobei bereits nach 24 h ein Anstieg an S-Phase-Zellen zu beobachten ist (Daten werden nicht gezeigt).



Vergleicht man die fünf humanen Sarkom-Zelllinien miteinander, lassen sich sowohl Unterschiede in der Stärke der Apoptoseinduktion als auch bei der Ausprägung des G2/M-Blocks aufzeigen (Abb. 13). Jedoch weisen mit weniger als 20 % (7,6 bis 18,2 %) die untersuchten Sarkom-Zelllinien nach einer Strahlendosis von 12,0 Gy insgesamt nur ein niedriges Apoptosemaximum auf. Dabei korrelieren in vier von fünf Sarkom-Zelllinien (A-204, US 8-93, RD und LMS 6-93) der Austritt der Zellen aus der G2/M-Arretierung und die Induktion der Apoptose. So ist beispielsweise ein

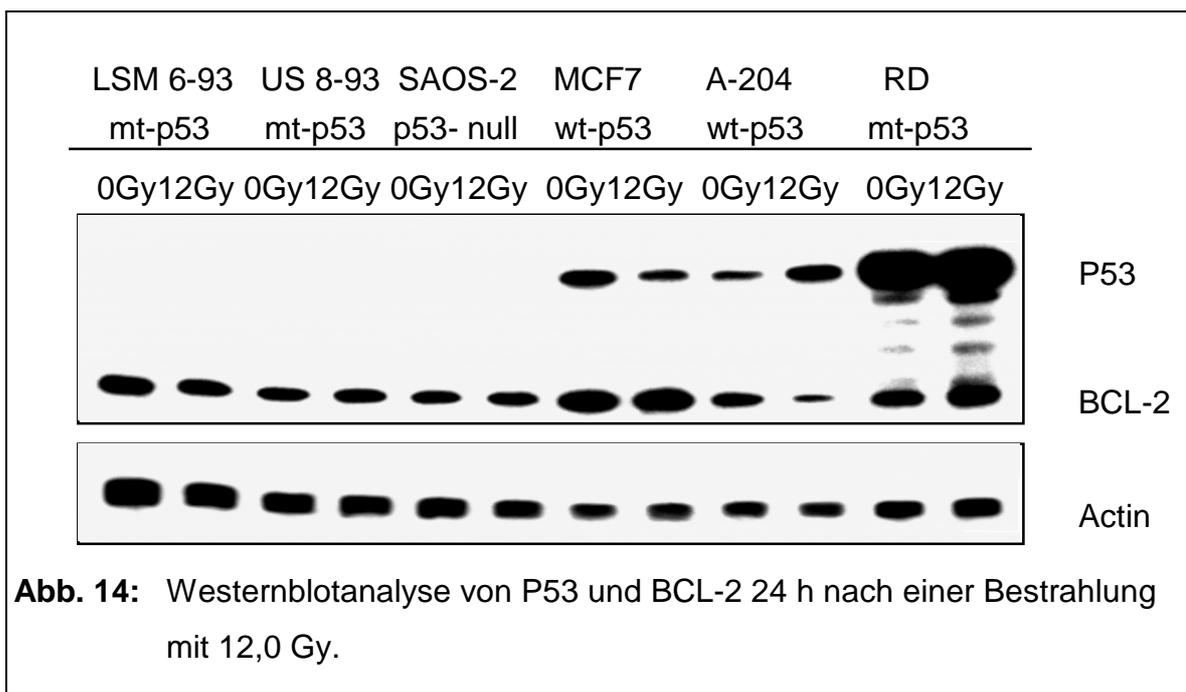
starker und lang anhaltender G2/M-Block in der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) an ein niedriges Apoptosemaximum (7,6 %) gekoppelt, während in der LMS 6-93 (mt-p53) die relativ rasche Aufhebung des G2/M-Blocks mit einem deutlich höheren Apoptosemaximum (18,2 %) korreliert. Vergleicht man jedoch die Apoptoseinduktion mit den strahlenbiologischen Parametern der Dosis-Überlebenskurve, läßt sich keine Korrelation in den untersuchten Sarkom-Zelllinien erkennen (Abb. 13 und Tab. 3). So weisen beispielsweise die Zelllinien SAOS-2, A-204 und LMS 6-93 ein ähnliches Apoptosemaximum (13,4 bis 18,2 %) auf, unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Strahlensensitivität (SF2-Wert von 0,28 bis 0,62). Ebenso korreliert weder die Dauer noch die Stärke des G2/M-Blocks in den fünf untersuchten Sarkom-Zelllinien mit der Strahlensensitivität. Dies wird deutlich, da Bestrahlung in der einen strahlenresistenten Zelllinie (US 8-93) einen starken und lang andauernden G2/M-Arrest auslöst, während in der anderen strahlenresistenten Zelllinie (LMS 6-93) dieser nur von kurzer Dauer ist. Weiterhin weist die strahlensensible Zelllinie SAOS-2 (p53-null) auch einen starken und lang andauernden G2/M-Arrest auf. Deshalb läßt sich schlußfolgern, daß in den untersuchten Sarkom-Zelllinien die Induktion der Apoptose invers mit der Dauer des G2/M-Blocks korreliert. Jedoch liegt keine Korrelation zwischen der Dauer der G2/M-Zellzyklusarretierung und der Strahlensensitivität vor.

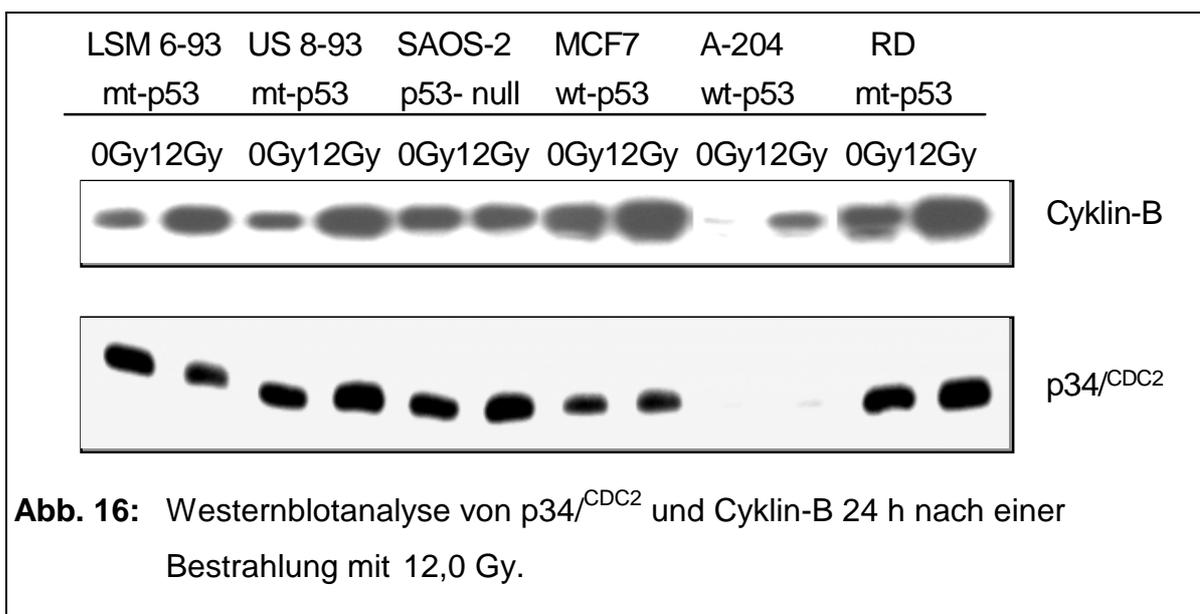
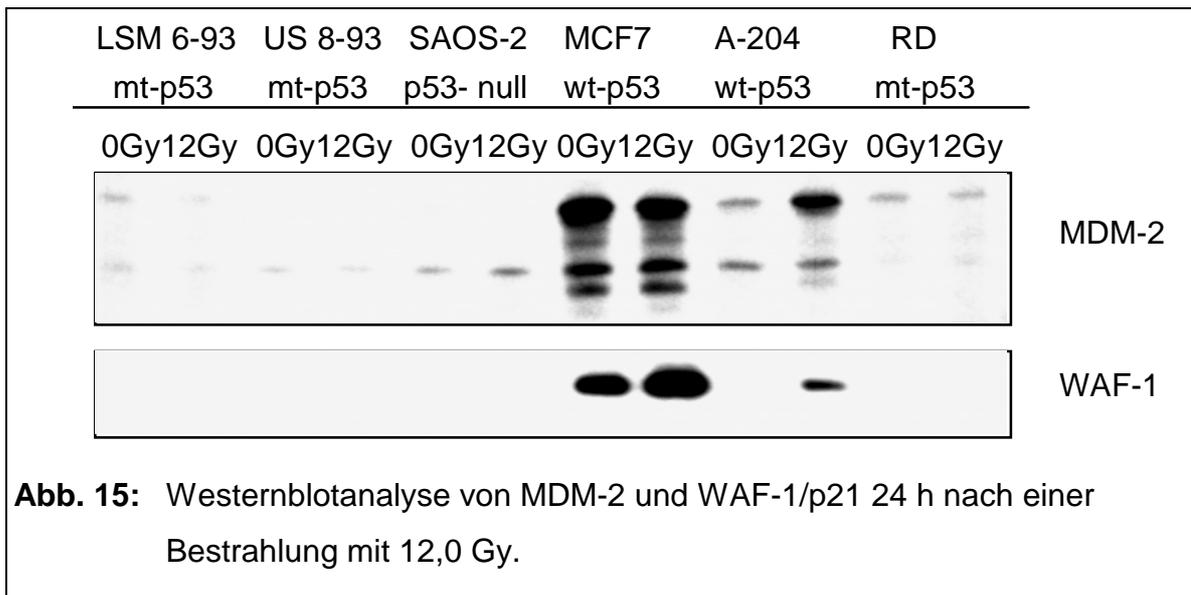
#### **4.2.4 Protein-Expression von p53 und p53-Targetgenen**

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Unterschiede im strahlenbiologischen Verhalten in Beziehung zur Expression von p53 bzw. den p53-Targetgenen stehen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Western-Hybridisierungen für die Proteine P53, WAF-1, MDM-2, BCL-2, BAX, Cyklin-B und p34<sup>CDC2</sup> nach einer Bestrahlung von 12,0 Gy (Zeitraum 0 bis 48 h) in den einzelnen Zelllinien durchgeführt.

In den Zelllinien mit p53-Gendefekt (US 8-93, LMS 6-93, RD und SAOS-2) löst jedoch Bestrahlung weder eine Veränderung der Protein-Expression von p53 noch der p53-Targetgene waf-1, mdm-2, bcl-2 und bax aus. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Zelllinien einen heterozygoten p53-Gendefekt (US 8-93, LMS 6-93), einen hemizygoten p53-Gendefekt (RD) oder gar kein P53-Protein (SAOS-2) aufweisen

(Abb. 14 und 15). Unterschiedlich war in den Sarkom-Zelllinien mit p53-Defekt die Expression des P53-Proteins der unbestrahlten Kontrollzellen. Während die Zelllinie RD (mt/-) das P53-Protein stark überexprimiert, konnte in den beiden selbst etablierten Zelllinien US 8-93 (mt/wt) und LMS 6-93 (mt/wt) das P53-Protein nicht detektiert werden. Erwartungsgemäß läßt sich ebenfalls in der SAOS-2 (p53-null) kein P53-Protein detektieren (Abb. 14). Das WAF-1/p21-Protein konnte weder in den unbestrahlten Kontrollzellen noch nach Bestrahlung detektiert werden. Dagegen werden BCL-2 und BAX (Daten werden nicht gezeigt) sowohl vor als auch nach Bestrahlung stark exprimiert, während das MDM-2 Protein vor und nach Bestrahlung nur schwach nachgewiesen werden konnte (Abb. 14 und 15). Eine Veränderung in der Protein-Expression zeigt sich nach Bestrahlung nur in der wt-p53 Zelllinie A-204. Bereits in den unbestrahlten Kontrollzellen ist eine P53-Protein-Expression deutlich nachweisbar. Bestrahlung induziert sowohl eine Zunahme der P53-Protein-Expression als auch die Zunahme der Protein-Expression der p53-Targetgene waf-1 und mdm-2. Dagegen wird die Protein-Expression der Protoonkogene bcl-2 und bax (Daten werden nicht gezeigt) durch Bestrahlung nicht beeinflusst (Abb. 14 und 15). In allen fünf Sarkom-Zelllinien korreliert mit dem strahleninduzierten G2/M-Block ein Anstieg der Expression von Cyclin-B und/bzw. von p34/<sup>CDC2</sup> (Abb. 16).



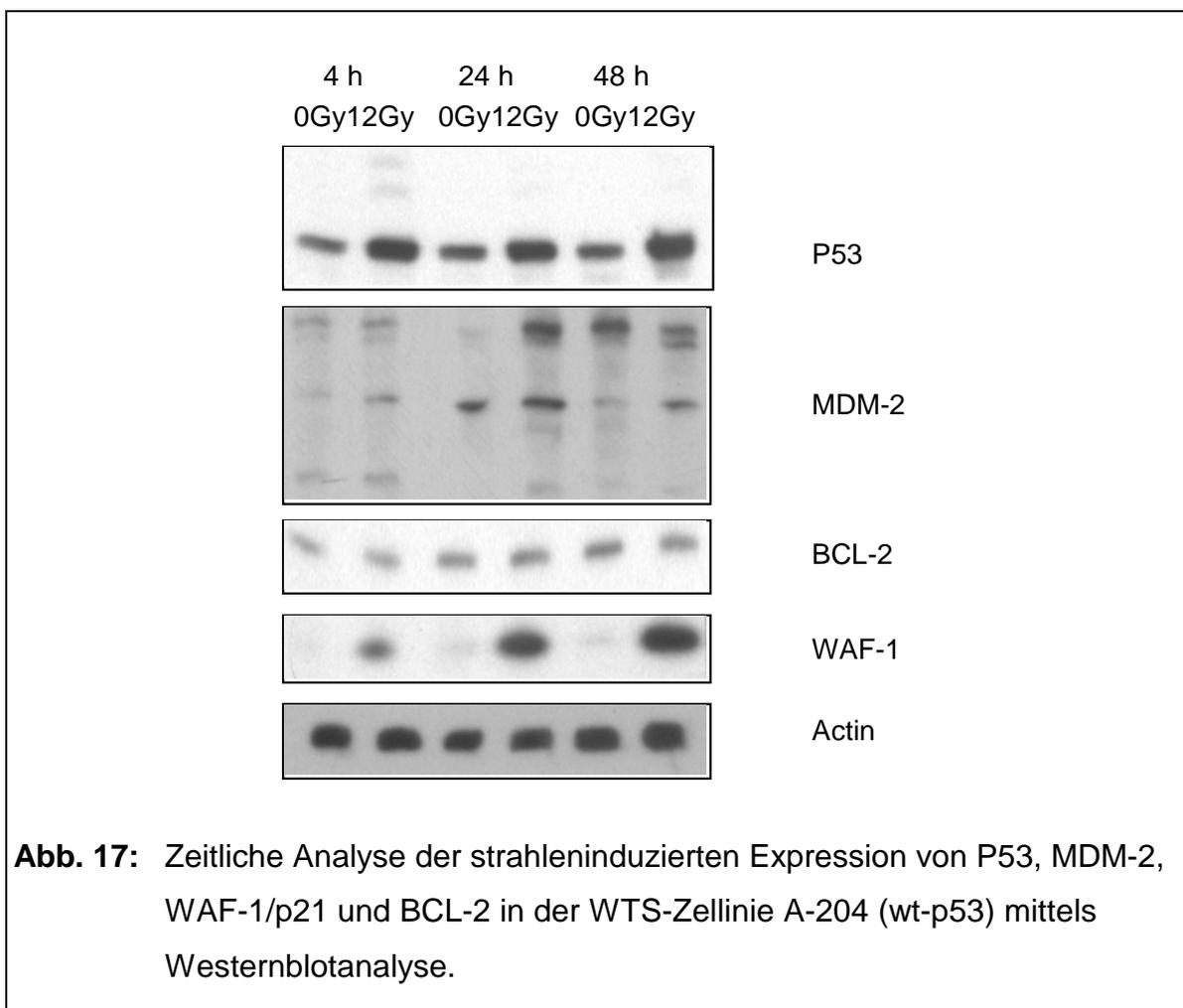


#### 4.2.5 Strahleninduzierte Protein-Expression in der Zelllinie A-204 (wt-p53)

##### 4.2.5.1 Zeitliche Analyse

Bereits 4 h nach Bestrahlung wird in der WTS-Zelllinie A-204 (wt-p53) P53 stärker exprimiert. Dieser Effekt ist auch 24 h und 48 h nach Bestrahlung nachweisbar (Abb. 17). Erwartungsgemäß korreliert mit dem Anstieg von P53 in dieser Zelllinie

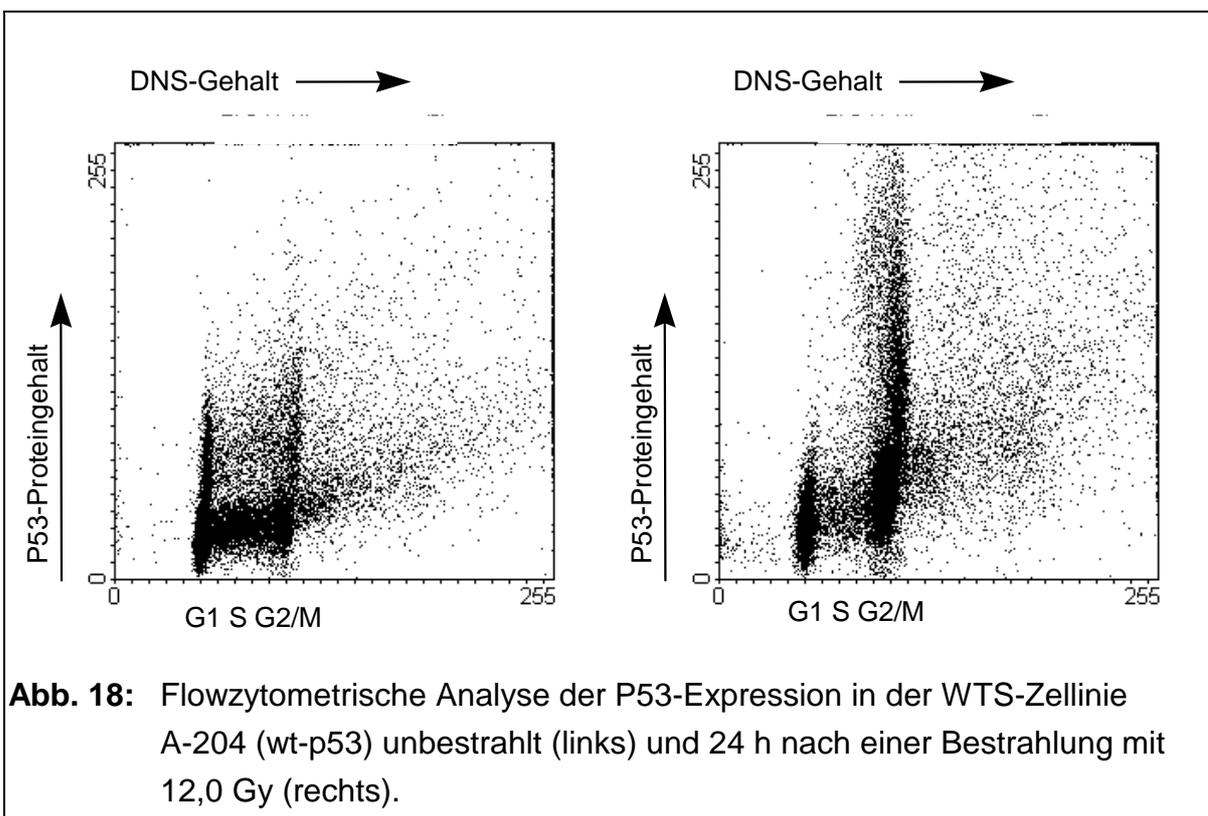
ebenfalls die Zunahme der Protein-Expression der p53-Targetgene waf-1 und mdm-2, was auf die transkriptionsaktivierende Wirkung von wt-p53 hinweist (Abb. 17). Die Protein-Expression von WAF-1/p21 wird mittels Westernblotanalyse erst nach Bestrahlung deutlich nachweisbar. Ebenso zeigt die zeitliche Analyse der Protein-Expression der wt-p53 Targetgene waf-1/p21 und mdm-2, daß beide Proteine mit zunehmender Inkubationszeit (von 4 zu 48 h) stärker exprimiert werden. Eine veränderte Protein-Expression von bcl-2 und bax (Daten werden nicht gezeigt) findet im gesamten Untersuchungszeitraum nicht statt (Abb. 17).



#### 4.2.5.2 Flowzytometrische Analyse der P53-Expression

Um die Fragestellung zu klären, ob P53 auch in der G2M-Phase verstärkt exprimiert wird, wurde die P53-Expression der wt-p53 Zelllinie A-204 nach Bestrahlung mittels Flowzytometrie analysiert. Bei dieser flowzytometrischen Zweiparameteranalyse

lassen sich die einzelnen Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) separat auswerten. Aus dem Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle wird deutlich, daß gerade die bestrahlten G2/M-Zellen verstärkt P53 exprimieren (Abb. 18). So beträgt die durchschnittliche P53-Protein-Expression der bestrahlten G2/M-Zellen das 1,52-fache der unbestrahlten G2/M-Zellen. Dagegen weist das Verhältnis von bestrahlten G1-Phase-Zellen zu unbestrahlten G1-Phase-Zellen nur das 1,15-fache auf.

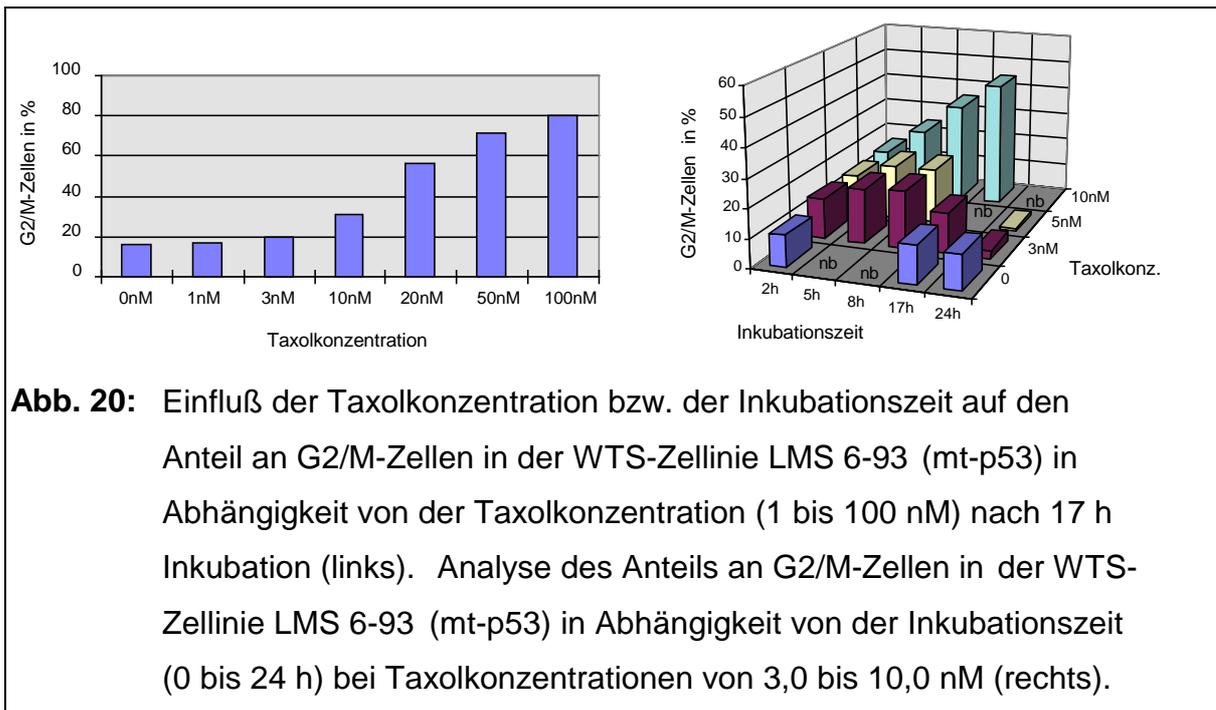


#### 4.3 Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung mit Taxol und Koffein in zwei WTS-Zelllinien mit mt-p53

##### 4.3.1 Einfluß von Taxol auf Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion, Zellkoloniebildungsrate und Strahlensensitivität

Im dritten Arbeitsabschnitt wurden die beiden strahlenresistenten WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) auf eine radiosensibilisierende Wirkung von G2/M-Block modulierenden Substanzen untersucht. Die beiden WTS-Zelllinien weisen nach Bestrahlung einen starken G2/M-Block bzw. eine schwache Apoptoseinduktion auf (Abb. 13). Mit den Chemotherapeutika Taxol (Paclitaxel) und



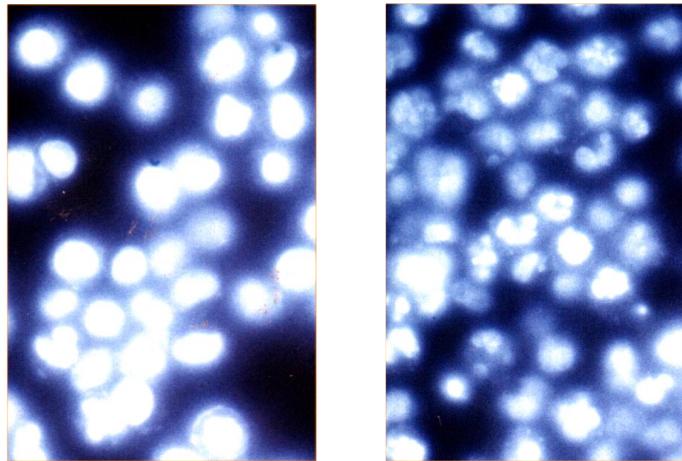


**Abb. 20:** Einfluß der Taxolkonzentration bzw. der Inkubationszeit auf den Anteil an G2/M-Zellen in der WTS-Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) in Abhängigkeit von der Taxolkonzentration (1 bis 100 nM) nach 17 h Inkubation (links). Analyse des Anteils an G2/M-Zellen in der WTS-Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0 bis 24 h) bei Taxolkonzentrationen von 3,0 bis 10,0 nM (rechts).

Die G2/M-Blockierung ist in beiden Zelllinien von der Taxolkonzentration und der Inkubationszeit abhängig. Mit zunehmender Taxolkonzentration (1 bis 100 nM) bzw. Inkubationszeit (0 bis 17 h) arretieren beide WTS-Zelllinien stärker in der G2/M-Phase (Abb. 20). Jedoch ist eine Mindestkonzentration von 10 nM Taxol (bei einer Inkubationszeit von 17 h) erforderlich, um überhaupt einen Anstieg an G2/M-Zellen hervorzurufen. So führt die Inkubation mit Taxolkonzentrationen von 1 bis 5 nM zu keiner Zunahme an G2/M-Zellen. Dagegen resultiert die Inkubation mit 50 nM bzw. 100 nM Taxol in einem fast vollständigen G2/M-Block (70 bis 80 % der Zellen arretieren in der G2/M-Phase) (Abb. 20).

Ein Vergleich von Zellzyklusanalyse und Zellkoloniebildungstest zeigt, daß beide WTS-Zelllinien sensitiv auf Taxol reagieren. So sind bereits Taxolkonzentrationen von 3 und 5 nM toxisch, obgleich noch kein G2/M-Block induziert wird. Nach einer Inkubation mit Taxolkonzentrationen (50 bzw. 100 nM), die einen vollständigen G2/M-Arrest auslösen, werden in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 jedoch kaum noch Zellkolonien ausgebildet (Abb. 19 und 20). Zudem zeigen weitere Untersuchungen, daß eine Behandlung mit niedrigen Taxolkonzentrationen (5 und 10 nM) in beiden WTS-Zelllinien das Zellwachstum bereits deutlich hemmt. Nach einer Inkubation von 30 bis 100 nM Taxol findet keine Zellverdopplung mehr statt (Daten werden nicht gezeigt). Weiterhin ist mit zunehmender Inkubationszeit das Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden zu beobachten.

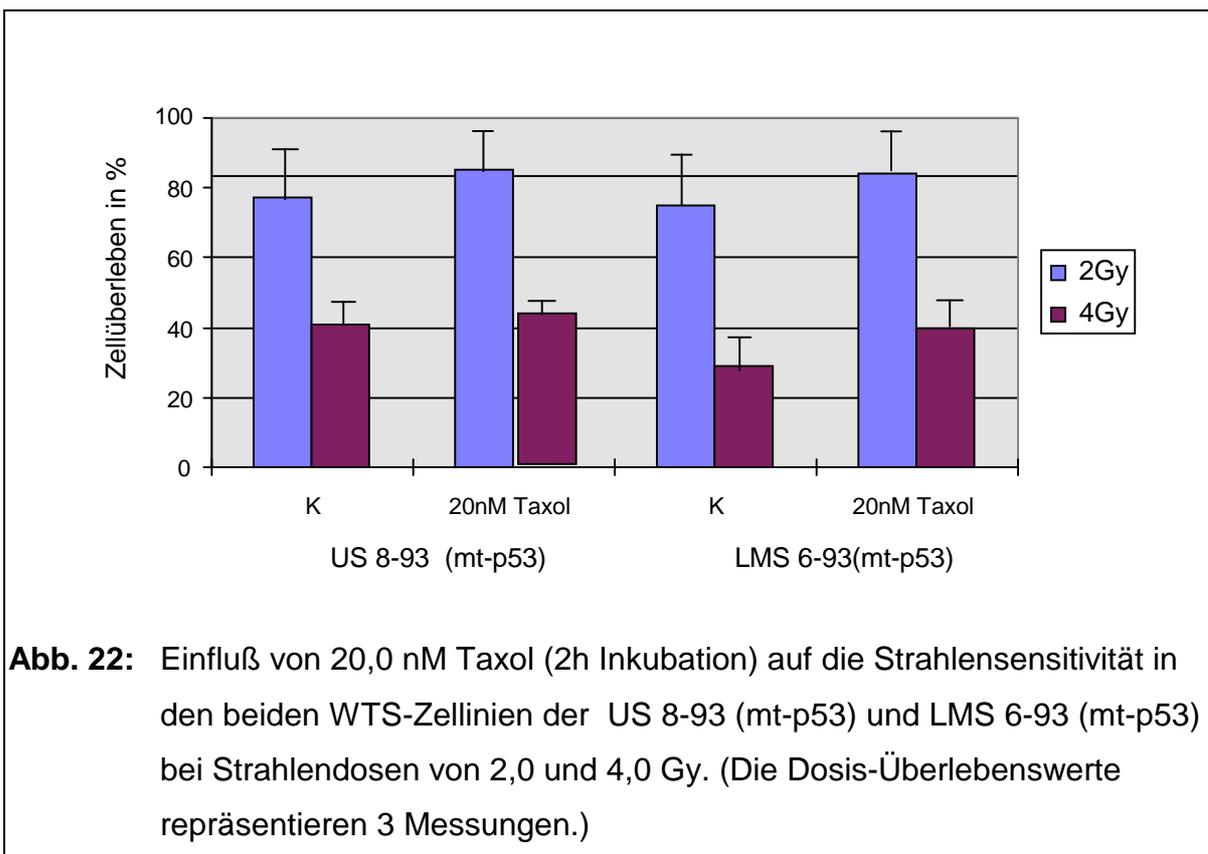
Mittels DAPI-Analyse wurde die Zellkernmorphologie in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 nach einer Inkubation mit unterschiedlichen Taxolkonzentrationen (3 bis 50 nM) untersucht. Dabei ist zu beobachten, daß die Behandlung mit 20 und 50 nM Taxol zur Ausbildung von zahlreichen sternförmigen Konfigurationen (typische und atypische Mitosen) führt (Abb. 21). Nach der Taxolbehandlung sind zunehmend Zellen mit morphologischen Apoptosemerkmalen zu beobachten. Dabei korreliert der Austritt der Zellen aus ihrer G2/M-Blockierung mit dem Anstieg an apoptotischen Zellen, was bereits in den Strahlenversuchen zu beobachten war.



**Abb. 21:** Analyse der Zellkernmorphologie der WTS-Zelllinie US 8-93 (mt-p53) 17h nach einer Behandlung mit 0 (links) und 50 nM Taxol (rechts) mittels DAPI-Markierung.

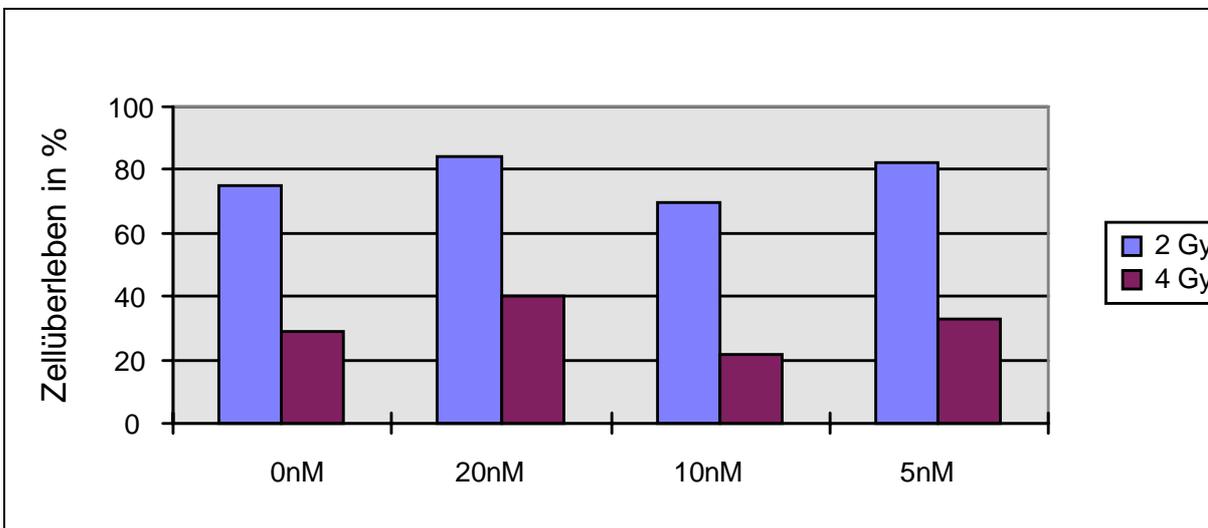
Weiterhin wurden die beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) mit dem Zellkoloniebildungstest hinsichtlich einer Strahlensensitivierung nach einer Taxolbehandlung untersucht. Es wurde überprüft, ob die Zugabe von subtoxischen Taxolkonzentrationen 5, 10 und 20 nM Taxol bei einer Inkubationszeit von 2 h in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) zu einer Radiosensibilisierung führt. Wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, resultiert die Inkubation mit 5,0 nM Taxol in beiden WTS-Zelllinien nicht in einer Anreicherung der Zellen in der G2/M-Phase (Abb. 20). Ebenso führt auch die zweistündige Inkubation mit 10 bzw. 20 nM Taxol nicht zur Ausbildung eines G2/M-Blocks (Daten werden nicht gezeigt). Um eine Zellzyklus-unabhängige Radiosensibilisierung von

Taxol in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) zu überprüfen, wurden die Zellen nach Taxolbehandlung (5, 10 und 20 nM Taxol bei einer Inkubationszeit von 2 h) mit 2,0 oder 4,0 Gy bestrahlt und das klonogene Zellüberleben ermittelt (Abb. 22 und 23). Ein Vergleich der Platiereffizienzen mit und ohne Taxolbehandlung läßt jedoch in keiner der beiden WTS-Zelllinien eine Strahlensensibilisierung durch Taxol erkennen.



Der Einfluß der Taxolkonzentration auf das klonogene Zellüberleben bei Strahlendosen von 2,0 und 4,0 Gy wird exemplarisch für die Zelllinie LMS 6-93 in Abb. 23 gezeigt. Die Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) weist ohne Taxolbehandlung nach einer Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 2,0 Gy ein klonogenes Zellüberleben von ca. 75 % auf (der SF2-Wert beträgt 0,75). Eine Taxolbehandlung (5 bis 20 nM) führt zu keiner wesentlichen Änderung des klonogenen Zellüberlebens nach einer Strahlendosis von 2,0 Gy (der SF2-Wert liegt zwischen 0,70 und 0,84) (Abb. 23). Ähnliche Effekte lassen sich auch nach einer Strahlendosis von 4,0 Gy erkennen. So beeinflusst Taxol das klonogene Zellüberleben nach einer Strahlendosis von

4,0 Gy nur unwesentlich. Die Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) weist nach einer Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 4,0 Gy ohne Taxolbehandlung bzw. mit einer Taxolbehandlung ein klonogenes Überleben von 29 % bzw. 31 % (22 bis 40 %) auf (Abb. 23).



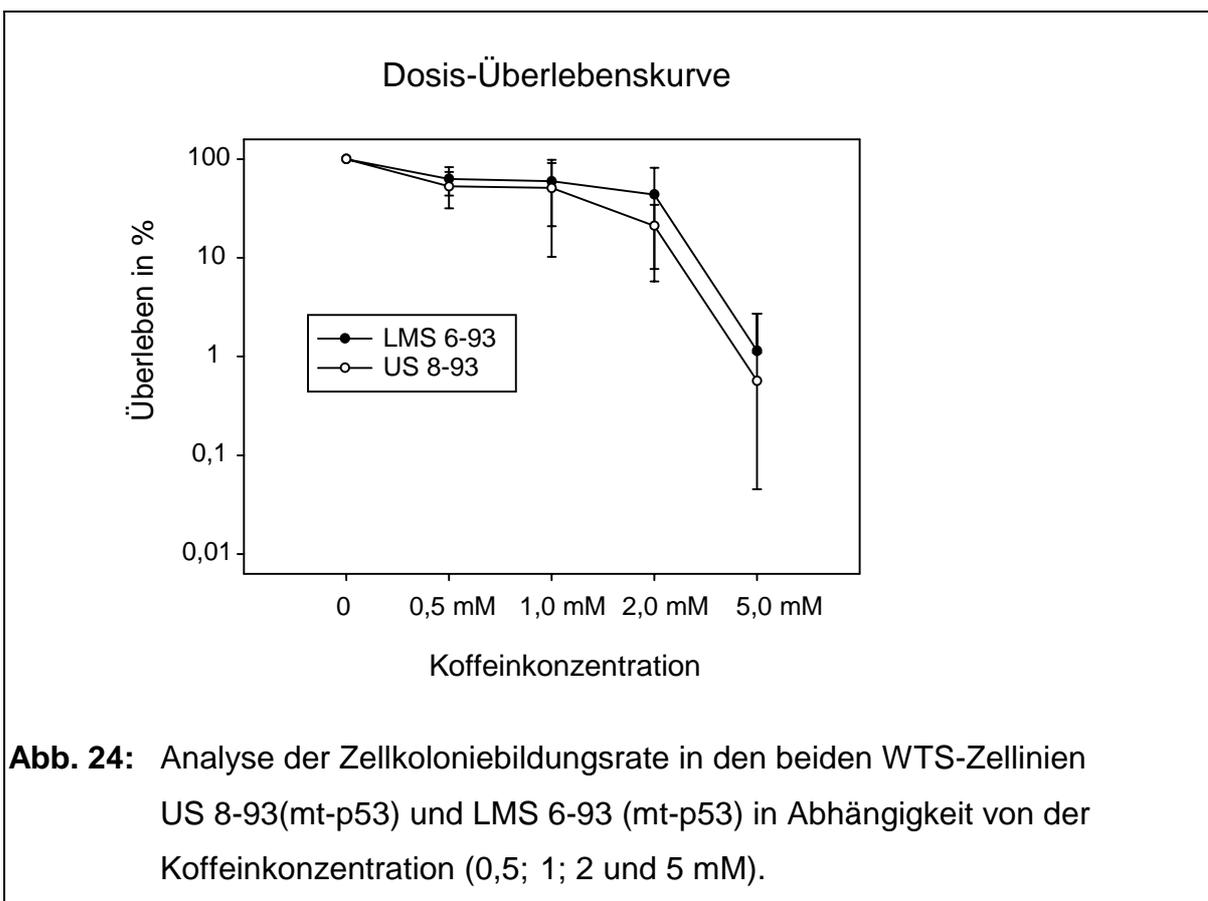
**Abb. 23:** Einfluß der Taxolkonzentration (5 bis 20 nM nach einer Inkubationszeit von 2h ) auf die Strahlensensitivität der WTS-Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) bei Strahlendosen von 2,0 und 4,0 Gy. Die Dosis-Überlebenswerte repräsentieren 2 (5 und 10 nM Taxol) bzw. 3 (20 nM Taxol) Messungen.

#### 4.3.2 Einfluß von Koffein auf Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion, Zellkoloniebildungsrate und Strahlensensitivität

Koffein wurde in PBS gelöst und in einer Konzentration von 0,1 bis 5 mM eingesetzt. In Vorversuchen wurde der Einfluß von PBS auf das Zellwachstum, den Zellzyklus und die Platiereffizienz bestimmt. Dabei konnte kein wesentlicher Einfluß des Lösungsmittels PBS festgestellt werden.

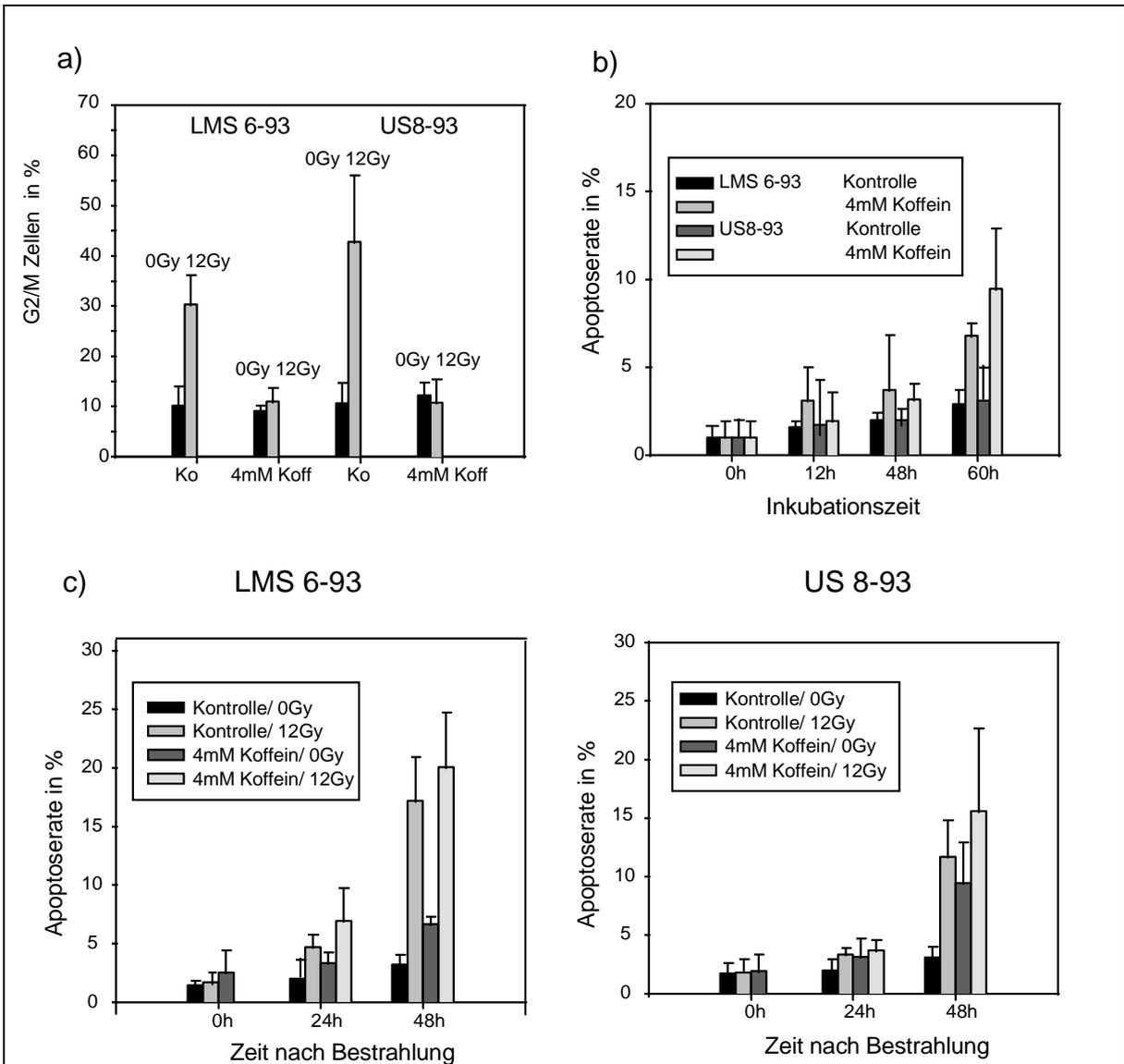
Um die Wirkung von Koffein auf die beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) zu bestimmen, wurden Koffeinkonzentrationen von 0,1 bis 5 mM eingesetzt und das Zellwachstum, die Platiereffizienz, die Apoptoserate bzw. der Zellzyklus ohne und mit Bestrahlung analysiert. Dabei zeigt sich in beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 mit zunehmender Koffeinkonzentration (von 0,5 bis

5 mM Koffein) sowohl eine Inhibierung der Zellproliferation als auch die Abnahme der Platiereffizienz. Beide WTS-Zelllinien weisen einen ähnlichen  $IC_{50}$ -Wert von ca. 2 mM auf (Abb. 24). Zudem ist die Abnahme des klonogenen Überlebens in beiden WTS-Zelllinien mit einem schwachen Anstieg der Apoptoserate gekoppelt. Dabei führt die Inkubation mit 4 mM Koffein nach 60 h zu einem Anstieg der Apoptoserate in der Zelllinie US 8-93 um 6,2 % bzw. in der Zelllinie LMS 6-93 um 3,5 % (Abb. 25b).



Um die Wirkung von Koffein auf die Bestrahlung zu analysieren, wurden die Zellen mit 4 mM Koffein inkubiert und nach einer Inkubationszeit von 12 h mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy bestrahlt. In beiden WTS-Zelllinien wird durch die Inkubation von 4 mM Koffein die Ausbildung eines strahleninduzierten G2/M-Blocks 24 h nach der Bestrahlung verhindert (Abb. 25 a). Jedoch korreliert in keiner der beiden WTS-Zelllinien das Fehlen des strahleninduzierten G2/M-Blocks mit einer erhöhten Apoptoseinduktion. Das heißt in den beiden WTS-Zelllinien LMS 6-93 und US 8-93 scheint keine inverse Korrelation zwischen den G2/M-Zellen und der Anzahl an apoptotischen Zellen vorzuliegen. So verringert 4 mM Koffein in beiden

WTS-Zelllinien den Anteil an G2/M-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 12,0 Gy um 20 % (LMS 6-93) bzw. 32 % (US 8-93), jedoch steigt die Apoptoserate (0 bis 48 h nach Bestrahlung) in beiden Zelllinien im Vergleich mit der bestrahlten Kontrolle nur geringfügig um 4 bis 6 % an (Abb. 25 a und c).

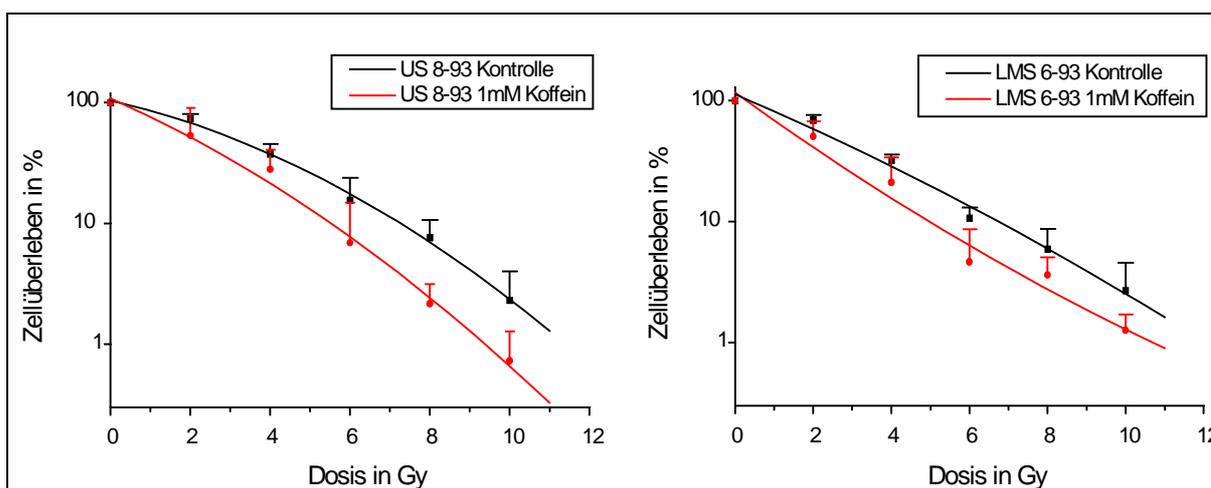


**Abb. 25:** Effekt von 4 mM Koffein auf den strahleninduzierten G2/M-Arrest in den WTS-Zelllinien LMS 6-93 und US 8-93 24h nach einer Bestrahlung mit 12,0 Gy (a).

Analyse der Apoptoseinduktion in den beiden WTS-Zelllinien LMS 6-93 und US 8-93 ohne und mit 4 mM Koffein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0 bis 60 h) (b).

Effekt der Kombination von Bestrahlung und 4 mM Koffein auf die Apoptoseinduktion in den WTS-Zelllinien LMS 6-93 und US 8-93 (c).

Um zu überprüfen, ob der Koffein-vermittelte Verlust des strahleninduzierten G2/M-Blocks in den beiden Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 an eine Radiosensibilisierung gekoppelt ist, wurden die Zellen während der Koffeinbehandlung (1 mM) mit unterschiedlichen Strahlendosen (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 und 10,0 Gy) bestrahlt und das klonogene Zellüberleben ermittelt. In beiden WTS-Zelllinien führt die Inkubation mit 1 mM Koffein zu einer Strahlensensitivierung (Abb. 26). Weiterhin zeigt ein Vergleich der Verstärkungsfaktoren (EFs) in Bezug zur jeweiligen Strahlendosis, daß bei höheren Strahlendosen (6,0 bis 10,0 Gy) die radiosensibilisierende Wirkung stärker wird (Tab. 4). Während die Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 2,0 bzw. 4,0 Gy in beiden WTS-Zelllinien lediglich eine schwache Strahlensensitivierung nach einer Koffeinbehandlung erkennen läßt (die EFs der beiden WTS-Zelllinien liegen zwischen 1,34 und 1,53), weisen Strahlendosen von 6,0; 8,0 und 10,0 Gy insbesondere in der Zelllinie US 8-93 auf eine deutliche Strahlensensitivierung hin. Der EF der Zelllinie US 8-93 liegt bei Strahlendosen von 8,0 und 10,0 Gy bei 3,45 bzw. 4,60 (Tab. 4). Ebenso nimmt in der Zelllinie LMS 6-93 die strahlensensitivierende Wirkung der Koffeinbehandlung mit zunehmender Strahlendosis zu. Jedoch ist der Effekt in dieser Zelllinie schwächer ausgeprägt. Bei der Zelllinie LMS 6-93 steigt die Radiosensitivierung nach Strahlendosen von 6,0; 8,0 oder 10,0 Gy durch 1 mM Koffein auf einen EF zwischen 1,64 und 2,33 (Tab. 4).



**Abb. 26:** Einfluß von 1 mM Koffein auf die Strahlensensitivität der beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) nach einer Bestrahlung. Die Dosis-Überlebenskurve wurde mit dem Zellkoloniebildungstest ermittelt.

**Tab. 4** Effekt von 1 mM Koffein auf die Radiopotenzierung in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53)

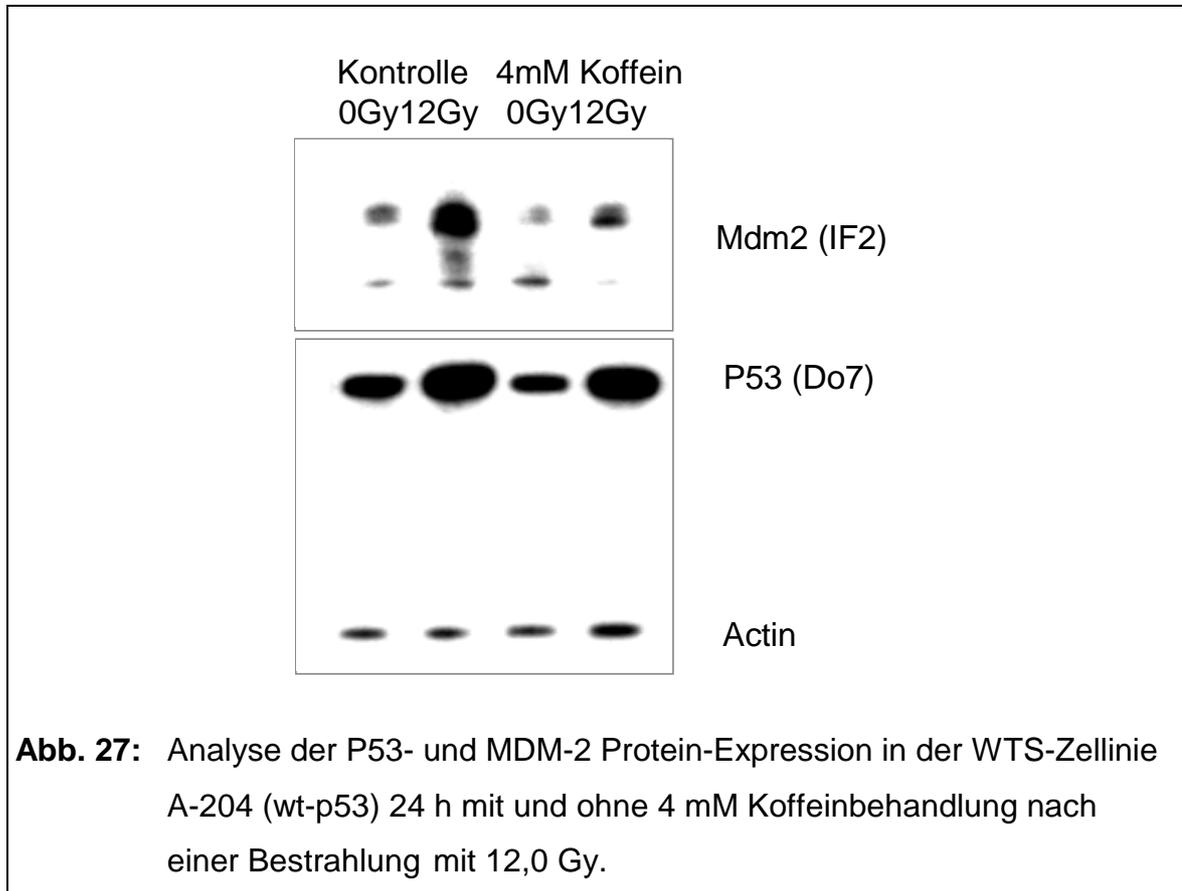
	US 8-93 (mt-p53)			LMS 6-93 (mt-p53)		
	<u>Kontrolle</u>	<u>1 mM Koffein</u>	<u>EF</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>1 mM Koffein</u>	<u>EF</u>
SF2-Wert	0,736+/-0,07	0,533+/-0,38	1,38	0,692+/- 0,07	0,506+/- 0,16	1,37
SF4-Wert	0,375+/-0,08	0,279+/-0,17	1,34	0,323+/- 0,04	0,211+/- 0,13	1,53
SF6 –Wert	0,156+/-0,08	0,069+/-0,08	2,26	0,107+/- 0,02	0,046+/- 0,04	2,33
SF8-Wert	0,076+/-0,29	0,022+/-0,01	3,45	0,059+/- 0,03	0,036+/- 0,01	1,64
SF10-Wert	0,023+/-0,17	0,005+/-0,01	4,60	0,026+/- 0,01	0,013+/- 0,04	2,00

**Abk.:** US-undifferenziertes Sarkom, LMS-Leiomyosarkom, mt-Mutation, SF2-Wert (4, 6, 8, 10)-Überlebende Zellfraktion („survival-fraction“) bei 2,0 Gy (4,0; 6,0; 8,0 und 10,0 Gy), EF-Wert-Verstärkungsfaktor, der Verstärkungsfaktor wurde aus dem Quotienten von  $SF(x)_{\text{Kontrolle}}$  und  $SF(x)_{1 \text{ mM Koffein}}$  ermittelt,

Um die Frage zu klären, ob die radiosensitivierende Wirkung von Koffein über wt-p53 erfolgt, wurde die Protein-Expression von P53 bzw. den p53-Targetgenen waf-1, mdm2, bcl-2 und bax in den Zelllinien US 8-93 (mt-p53), LMS 6-93 (mt-p53) und A-204 (wt-p53) bestimmt. Jedoch wird der radiosensitivierende Effekt in den Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) unabhängig von einer p53-Induktion hervorgerufen, da in keiner der beiden Zelllinien eine Zunahme der P53-Protein-Expression bzw. der p53-Targetgene waf-1/p21, mdm2, bcl-2 und bax durch eine Koffeinbehandlung nachgewiesen werden konnte. Weder eine alleinige Koffeinbehandlung noch die Kombination aus Koffeinbehandlung und Bestrahlung resultiert in den untersuchten Proteinen in einer Veränderung der Expression (Daten werden nicht gezeigt).

Ebenso lässt sich in der Zelllinie A-204 (wt-p53) keine wt-p53 vermittelte Aktivierung nach einer Koffeinbehandlung erkennen. Obwohl die alleinige Bestrahlung eine Zunahme der Protein-Expression von P53 bzw. den p53-Targetgenen waf-1/p21 und mdm-2 bewirkt, führt weder eine Koffeinbehandlung noch die Kombination aus Bestrahlung und Koffeinbehandlung in der Zelllinie A-204 (wt-p53) zu einer zusätzlichen P53- und WAF-1/p21-Expression. Vergleicht man zudem die MDM-2

Expression der Zelllinie A-204 (wt-p53) nach Bestrahlung mit und ohne Koffeinbehandlung, so resultiert die Kombination von Bestrahlung in einer Abnahme der MDM-2 Expression (Abb. 27). Scheinbar führt eine zusätzliche Koffeinbehandlung zu einer Inhibierung der strahleninduzierten MDM-2 Expression.



## 5 Diskussion

### 5.1 Wertung der Untersuchungen zum Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in zwei WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus

Im ersten Abschnitt wurde der Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in zwei humanen WTS-Zelllinien (A-204 mit wt-p53 und US 8-93 mit mt-p53) bestimmt. Untersucht wurde die Dosisabhängigkeit von Zellwachstum, Vitalität, Zellzyklus und Zelltod (Apoptose und Nekrose) bei Strahleneinzeldosen zwischen 0,4 und 24,0 Gy im Untersuchungszeitraum von 0 bis 96 h nach einer Bestrahlung. Der strahlenbiologische Effekt wurde aus dem Vergleich der Ergebnisse von unbestrahlten Kontrollzellen und bestrahlten Zellen gewonnen. Dabei sind für die beiden WTS-Zelllinien die strahlenbiologischen Effekte zeit- und dosisabhängig. Während eine Bestrahlung mit Strahlendosen von 0,4 und 2,0 Gy eine Verzögerung des Zellwachstums und eine geringfügige Abnahme der Zellvitalität (Nekrose) verursacht, nehmen die strahlenbiologischen Effekte in beiden WTS-Zelllinien mit höheren Strahlendosen zu. So führt eine Bestrahlung mit Strahlendosen von 6,0; 12,0 oder 24,0 Gy neben dem Verlust des Zellwachstums und einer deutlichen Abnahme der Zellvitalität auch zur Ausbildung eines strahleninduzierten G2/M-Blocks (Tab. 2 und Abb. 7). Ca. 24 h nach der Bestrahlung wird das Maximum an G2/M-arretierten Zellen erreicht. Mit der Abnahme des G2/M-Maximums konnte in beiden WTS-Zelllinien die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Dabei korreliert mit zunehmender Strahlendosis sowohl die stärkere Ausbildung des G2/M-Maximums als auch die erhöhte Induktion von Apoptose (Abb. 7). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wird auch in anderen Studien die dosisabhängige Ausbildung der G2/M-Zellzyklusarretierung und der Apoptoseinduktion beobachtet (McKenna et al., 1991 und 1996, Tauchi und Sawada, 1994, Palayoor et al., 1993 und 1995, Yanagihara et al., 1995, Soldatenkov et al., 1995). Eine Zunahme der Apoptoserate muß aber nicht generell dosisabhängig erfolgen. In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, daß die Induktion der Apoptose auch unabhängig von der eingesetzten Strahlendosis erfolgt (Meyn et al., 1993a, Stephens et al., 1993, Abend et al., 1995). In diesem

Zusammenhang wird in der Literatur diskutiert, daß eine Behandlung mit niedrigen Strahlen- bzw. Chemotherapeutika-Dosen überwiegend Apoptose induziert, während die Behandlung mit hohen Dosen bevorzugt Nekrose auslöst (Lennon et al., 1991, Kroemer, 1995). Beide Formen des Zelltods können jedoch durch denselben Stimulus induziert werden. Eigene Ergebnisse bestätigen diesen Befund. So resultiert die Bestrahlung in den beiden WTS-Zelllinien A-204 und US8-93 sowohl im Auftreten von nekrotischen Zellen als auch in der Induktion von Apoptose. Eine dosisabhängige Verschiebung des Gleichgewichts von beiden Zelltodformen war aber in keiner der beiden Zelllinien zu beobachten. Vielmehr scheint die Induktion der Apoptose an den Austritt der Zellen aus ihrer G2/M-Arretierung gekoppelt zu sein (Abb. 7). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Strahlenwirkung, kommt es innerhalb der ersten 24 h (nach einer Bestrahlung) erst zur Ausbildung eines G2/M-Zellzyklusblocks. Während dieser Zeit wird ausschließlich das Auftreten von nekrotischen (und nicht von apoptotischen) Zellen beobachtet. Erst mit dem Austritt der Zellen aus ihrer G2/M-Arretierung (48 h nach einer Bestrahlung) wurde in den beiden WTS-Zelllinien A-204 und US 8-93 Apoptose induziert. Mit 48 h ist jedoch die Induktion von Apoptose in beiden WTS-Zelllinien eine sehr späte Reaktion auf eine Bestrahlung.

Die von uns gefundenen geringen Apoptoseraten bestätigen den aus der Literatur bekannten Befund, daß Bestrahlung in Sarkomen generell Apoptose in nur geringem Maße induziert (Meyn et al., 1993a, Stapper et al., 1995). In vitro- und in vivo-Experimente zeigen weiterhin, daß die Induktion der Apoptose nach einer Bestrahlung abhängig vom Tumortyp ist. Während Tumore des hämatopoetischen Systems auf Bestrahlung mit einer starken Apoptoseinduktion reagieren, weisen Sarkome, Gliome und Melanome nur geringe Apoptosefrequenzen auf (Falkvoll, 1990, Meyn et al., 1993 a und b, Ryan et al., 1993, Stapper et al., 1995). Ein Hinweis auf die Induzierbarkeit von Apoptose scheint zudem das Auftreten von Spontanapoptosen zu sein. So konnten Meyn et al. (1993a) in verschiedenen Tumorentitäten nachweisen, daß eine Korrelation zwischen der spontanen Apoptosefrequenz und der durch Bestrahlung induzierten Apoptosefrequenz vorliegt. Fibroblasten wiederum reagieren auf DNS-Schäden anstelle der Induktion von Apoptose häufig mit einem wt-p53 vermittelten permanenten G1-Arrest (Diller et al., 1990, Mercer et al., 1990, Kastan et al., 1992, DiLeonardo et al., 1994). Deshalb wird in der Literatur eine wt-p53 vermittelte Strahlenantwort in Abhängigkeit vom Zelltyp

entweder mit einem G1-Arrest oder mit der Induktion von Apoptose diskutiert (Kastan et al., 1992, Kuerbitz et al., 1992, Clarke et al., 1993, Lowe et al., 1993). Neuere Befunde zeigen jedoch, daß auch der G2/M-Übergang durch wt-p53 kontrolliert wird. Dabei induziert wt-p53 nach Bestrahlung sowohl einen G2/M-Arrest als auch die G2/M-Transition und die damit verbundene Apoptoseinduktion (Agarwal et al., 1995, Stewart et al., 1995, Guillouf et al., 1995, Skladanowski und Larsen, 1997).

Vergleicht man die beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) miteinander, so lassen sich Unterschiede sowohl bei der Ausprägung des G2/M-Blocks als auch im Zeitpunkt bzw. in der Zunahme der Apoptosefrequenz nach Bestrahlung aufzeigen (Abb. 7). In der mt-p53 Zelllinie US 8-93 wird mit zunehmender Strahlendosis ein stärkerer G2/M-Block hervorgerufen als in der wt-p53 Zelllinie A-204. Umgekehrte Verhältnisse findet man dagegen sowohl in der Apoptose- als auch in der Nekrosefrequenz. Weiterhin erfolgt die Apoptoseinduktion in der mt-p53 Zelllinie (US 8-93) im Vergleich mit der wt-p53 Zelllinie (A-204) zeitlich verzögert. Diese strahlenbiologischen Unterschiede zwischen den beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) lassen sich gut mit ihrem unterschiedlichen p53-Genstatus in Verbindung bringen (Bache et al., 1997). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen weist ebenfalls die p53-mutierte Lymphoblasten-Zelllinie WTK1 im Vergleich mit der wt-p53 Lymphoblasten-Zelllinie TK6 eine zeitlich verzögerte Apoptoseinduktion nach einer Bestrahlung auf (Xia et al., 1995). Zudem zeigen Transfektionsversuche in HeLa-Zellen, daß in Zellen mit defektem p53 nur verzögert Apoptose induziert wird (Haupt et al., 1995 und 1997b).

## **5.2 Wertung der Ergebnisse zum Nachweis von Apoptose mit dem TUNEL-Test, der DAPI-Analyse, dem Annexin-V-Test und dem DNS-Leiter-Test**

Die Apoptose ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen, gekennzeichnet (siehe Einleitung 1.3). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden mit dem TUNEL-Assay, dem DAPI-Test, dem DNS-Leiter-Assay und dem Annexin-V-Test unterschiedliche Methoden etabliert, um Apoptose

qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Durch die Kombination von TUNEL-Test bzw. DAPI-Analyse konnte sowohl für die Zelllinie A-204 (wt-p53) als auch für die Zelllinie US 8-93 (mt-p53) nachgewiesen werden, daß Zellen mit morphologischen Apoptosemerkmalen (DAPI-Analyse) in hohem Maße auch ein positives Signal mit dem TUNEL-Test (enzymatischer Nachweis von DNS-Fragmenten) liefern (Abb. 8). Eine hohe Übereinstimmung von DAPI-Analyse und TUNEL-Assay belegen auch andere Studien (Haupt et al., 1995, Abend et al., 1998b). Eine enge Kopplung von enzymatischer DNS-Fragmentierung und morphologischen Apoptosemerkmalen tritt jedoch nicht generell auf. So weisen beispielsweise ca. 50 % der TUNEL-„positiven“ Zellen in unterschiedlichen Tumoren keine morphologischen Apoptosemerkmale auf (Gorczyca et al., 1994, Abend et al., 1998a). Zudem wurden Apoptosefiguren auch unabhängig von einer enzymatischen DNS-Fragmentierung beobachtet (Cohen et al., 1992, Oberhammer et al., 1993, Abend et al., 1998a). Während das Fehlen der enzymatischen DNS-Fragmentierung auf die unterschiedliche Aktivierung der DNS-Abbauprogramme von Zellsubtypen zurückgeführt werden kann, ist bislang nur wenig über die TUNEL-„positiven“ Zellen ohne typische morphologische Apoptosemerkmale bekannt. Da diese Zellen gehäuft in der Tumorregion vorkommen und Tumorzellen eine erhöhte genetische Instabilität aufweisen, ist eine Verbindung zur Mutagenese denkbar (Abend et al., 1998a).

Weiterhin können zwischen in vivo und in vitro Experimenten erhebliche Unterschiede bei der Induktion von Apoptose nach einer Bestrahlung auftreten. Während in vivo bereits ca. 3 bis 12 h nach einer Bestrahlung Apoptose nachgewiesen werden kann, erfolgt die Induktion der Apoptose insbesondere in Zellkultur-Experimenten (in vitro) meistens erst sehr spät (Stephens et al., 1991, Meyn et al., 1993a, Tauchi und Sawada, 1994, Xia et al., 1995, Abend et al., 1998c). Eigene Untersuchungen in den fünf humanen Sarkom-Zelllinien bestätigen, daß die Induktion von Apoptose, mit ca. 24 bis 48 h nach Bestrahlung beginnend, erst sehr spät einsetzt (Abb. 7 und 13). Warum diese Unterschiede auftreten, ist jedoch nicht geklärt. Generell scheint die Induktion der Apoptose insbesondere in vivo ein sehr heterogener Prozeß zu sein. So reicht für ein Quantifizieren von apoptotischen Zellen häufig ein Nachweisverfahren nicht aus. Deshalb sollten für in vivo Analysen zwei unterschiedliche Nachweismethoden durchgeführt werden, um apoptotische Zellen zu quantifizieren (Abend et al., 1998b). Dabei wird die morphologische Apoptoseanalyse favorisiert

(Collins et al., 1992, Harrison, 1996). Insgesamt hat sich eine Kombination von morphologischer Analyse und dem Nachweis der enzymatischen DNS-Fragmentierung als hinreichend erwiesen, um in vivo Apoptose umfassend nachzuweisen (Abend et al., 1998b).

Ein weiterer Apoptosenachweis ist der Annexin-V-Test, ein relativ neues Nachweisverfahren, das eine Abgrenzung der apoptotischen Zellen gegenüber nekrotischen Zellen ermöglicht (Koopman et al., 1994, Homburg et al., 1995, Vermes et al., 1995). Obgleich der Annexin-V-Test vorwiegend für Suspensionskulturen entwickelt wurde, ist er prinzipiell auch für adhärenente Zellen anwendbar (Boersma et al., 1996, van Engeland et al., 1996). Zudem wird der Umbau von Phosphatidylserin als ein zeitlich sehr frühes Merkmal apoptotischer Zellen beschrieben. Deshalb sollten mit dem Annexin-V-Test apoptotische Zellen bereits einige Stunden vor dem Auftreten von anderen Apoptosemerkmalen, beispielsweise der DNS-Fragmentierung, nachgewiesen werden können (Martin et al., 1995). In den fünf Sarkom-Zelllinien konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Aufgrund der niedrigen Apoptosefrequenzen bzw. dem nur allmählichen Ansteigen der Apoptoserate über einen Gesamtzeitraum von 96 h (Abb.7 und 13) ist eine solche Beobachtung in unseren Untersuchungen nicht zu erwarten gewesen. Vergleicht man die mittels DAPI- oder TUNEL-Test bestimmten Apoptosefrequenzen mit denen des Annexin-V-Tests, so wurden für die beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und A-204 (wt-p53) ähnliche Apoptosefrequenzen detektiert (Abb. 11). Weiterhin zeigen eigene Ergebnisse, daß dieser Apoptosetest nicht für jede adhärenente Zelllinie geeignet ist, da die unbehandelten Kontrollzellen der Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) mit ca. 30 % einen sehr hohen Anteil an nekrotischen Zellen (PI-positiven Zellen) aufwiesen. So scheint dieser Test erhöhte Anforderungen an die Zellpräparation zu stellen.

Zusätzlich konnte in den beiden WTS-Zelllinien US 8-83 und A-204 mit dem DNS-Leiter-Assay das Auftreten von Apoptose nach Bestrahlung qualitativ und semiquantitativ bestimmt werden (Abb. 9 und 10). Da jedoch auch nekrotische Zellen eine „DNS-Leiter“ aufweisen können, ist der DNS-Leiterassay allein nicht ausreichend, um Apoptose nachzuweisen (Collins et al., 1992).

Die getrennte Analyse von adhärenenten bzw. nicht-adhärenenten Zellen ergab, daß die apoptotischen Zellen zum überwiegenden Teil im Kulturüberstand zu finden sind. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der Literatur, da für ein Quantifizieren

von apoptotischen Zellen generell empfohlen wird, den Kulturüberstand in die Analyse einzubeziehen (Haupt et al., 1995, Soldatenkov et al., 1995). Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß in Fibroblasten die Einfurchung der Zellmembran („Membranblebbing“) an den Verlust der Adhärenz gekoppelt ist (Vidair et al., 1996, Guo et al., 1997).

### **5.3 Wertung der Ergebnisse zur strahlenbiologischen Charakterisierung von fünf humanen Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (wt, mt, null)**

#### **5.3.1 Wertung der Ergebnisse zur Bestimmung der Strahlensensitivität in Abhängigkeit vom p53-Genstatus**

Im zweiten Arbeitsabschnitt erfolgte mit der strahlenbiologischen Charakterisierung von fünf Sarkom-Zelllinien die Überprüfung der Hypothese, daß der p53-Genstatus die zelluläre Strahlenantwort in Sarkomen beeinflusst. Zudem soll mit diesen Untersuchungen die Fragestellung beantwortet werden, ob sich Zusammenhänge zwischen der Strahlensensitivität, der Zellzykluskontrolle, der Apoptoseinduktion und der p53-Genexpression in Sarkom-Zelllinien aufzeigen lassen bzw. wie die einzelnen Faktoren miteinander korrelieren. Hierfür wurden die beiden bereits untersuchten WTS-Zelllinien (US 8-93, A-204) und zusätzlich drei weitere Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (LMS 6-93: heterozygote 1bp-Insertion, SAOS-2: p53-null Zelllinie und RD: hemizygoter Fehlsinn-Mutation) analysiert.

In den fünf Sarkom-Zelllinien variiert das klonogene Überleben nach Bestrahlung sehr stark. So überleben in der Zelllinie US 8-93 (mit einem SF2-Wert von 0,79) nach einer Strahlendosis von 2,0 Gy 2,7 mal so viele Zellen wie in der Zelllinie SAOS-2 (mit einem SF2-Wert von 0,28). Ähnlich deutlich sind auch die Unterschiede im klonogenen Zellüberleben nach einer Bestrahlung mit hohen Strahlendosen (Abb. 12 und Tab.3). Berücksichtigt man den p53-Genstatus der fünf Sarkom-Zelllinien, weisen drei von vier Zelllinien mit einer p53-Mutation (US 8-93, LSM 6-93 und RD) gegenüber der wt-p53 Zelllinie A204 eine erhöhte Strahlenresistenz auf. Während das klonogene Überleben nach einer Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 2,0 Gy in der wt-p53

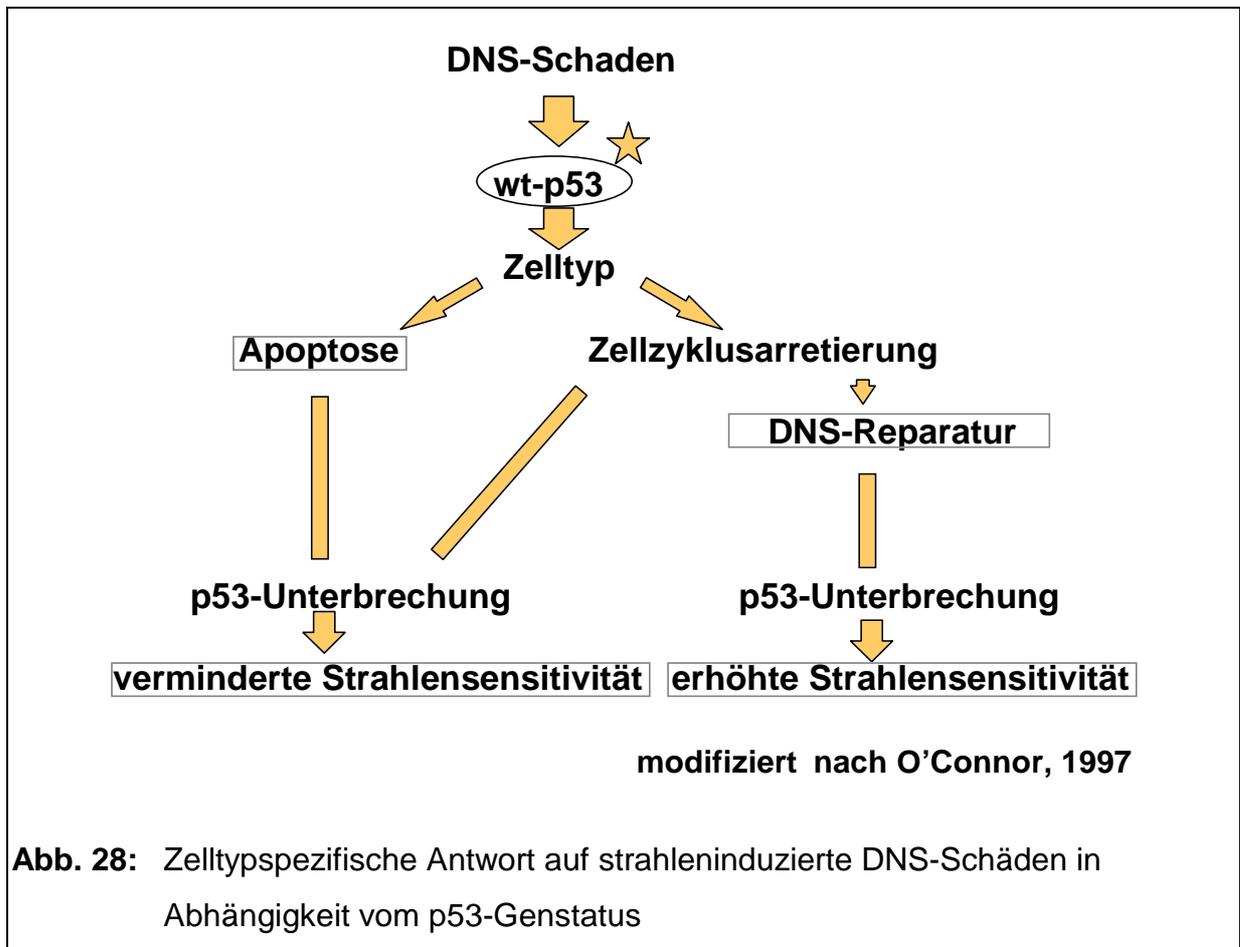
Zelllinie A-204 34 % beträgt, weisen die drei Sarkom-Zelllinien RD, LMS 6-93 und US 8-93 mit 46 bis 79 % ein deutlich höheres Zellüberleben auf. Ein hoher  $\alpha$ -Wert läßt auf eine starke Abnahme des klonogenen Zellüberlebens gegenüber niedrigen Strahlendosen schließen, da er den vorderen Abschnitt der Dosis-Überlebenskurve beschreibt (Hall 1988). Vergleicht man den  $\alpha$ -Wert der wt-p53 Zelllinie A-204 ( $\alpha$ -Wert ist 0,339) mit den  $\alpha$ -Werten der drei Sarkom-Zelllinien US 8-93, LSM 6-93 und RD ( $\alpha$ -Wert liegt zwischen 0,096 und 0,123), so ist dieser 2,7 bis 3,5 mal größer. Anders als erwartet reagiert die p53-null Zelllinie SAOS-2. Obgleich diese Zelllinie kein wt-p53 Allel aufweist, lassen eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung bzw. die niedrigen strahlenbiologischen Parameter (SF2-Wert ist 0,28; D10-Wert ist 273 cGy) auf eine hohe Strahlenempfindlichkeit schließen (Abb. 12 und Tab. 3). Dabei erscheint interessant, daß auch andere Studien insbesondere in p53-null Zelllinien eine erhöhte Strahlensensitivität nachweisen. Beispielsweise sind in Kopf- und Halstumoren die Zelllinien ohne intaktes wt-p53 Allel (p53-null oder hemizygot p53-mutiert) sensitiver gegenüber einer Bestrahlung als die Zelllinien, die zumindest ein intaktes wt-p53-Allel (wt-p53 oder heterozygot p53-mutiert) besitzen (Servomaa et al., 1996). Ebenso korreliert in epithelialen Rattenzellen mit dem Funktionsverlust beider p53-Wildtyp Allele eine erhöhte Strahlensensitivität (Biard et al., 1994). Andererseits findet man in der Literatur auch Beispiele, die diese Korrelation nicht bestätigen. So führt die Inaktivierung von wt-p53 durch das E6-Protein des humanen Papillomavirus in Tumor-Zelllinien nach einer Bestrahlung zwar zu einer verzögerten Apoptoseinduktion, jedoch eine Beeinflussung des klonogenen Zellüberlebens konnte nicht nachgewiesen werden (Huang et al., 1996, Yu et al., 1997). Weiterhin sind die hämatopoetischen Zellen transgener Mäuse besonders strahlenresistent, wenn beide p53-Allele mutiert sind (Lee und Bernstein, 1993). Die in dieser Arbeit untersuchte p53-null Zelllinie SAOS-2 wurde in anderen Studien mit unterschiedlichen p53-Genkonstrukten (wt-p53, mt-p53) transfiziert (Miyakoshi et al., 1995, Okaichi et al., 1998). Dabei zeigt sich, daß die Zellklone mit wt-p53 eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bestrahlung aufweisen, während die Zellklone mit mt-p53 in Abhängigkeit von der p53-Mutation unterschiedlich strahlenempfindlich sind. Das heißt, die neu entstandenen Zellklone mit mt-p53 waren in Abhängigkeit vom p53-Gendefekt im Vergleich mit der p53-null Kontroll-Zelllinie SAOS-2 entweder sensitiver, resistenter oder wiesen keine Veränderungen in der Strahlensensitivität auf. Dagegen resultiert

in derselben Zelllinie die Transfektion von mt-p53, welches als „hot-spot“ Mutation bekannt ist (AS: 175, 248, 273), nicht in einer Beeinflussung des klonogenen Zellüberlebens, der Apoptosefrequenz oder der DNS-Reparatur nach einer Bestrahlung (DiBiase et al., 1999). Weitere Untersuchungen an Zelllinien mit unterschiedlichen Defekten im p53-Gen zeigen, daß die zelluläre Strahlenantwort mit Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion, DNS-Reparatur und klonogenem Überleben in Abhängigkeit von der p53-Mutation verschieden ausfallen kann (Williams et al., 1995, Delia et al., 1997, Bristow et al., 1998, Okaichi et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit weisen insbesondere die beiden selbst etablierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 eine hohe Strahlenresistenz auf (SF2-Wert ist 0,79 und 0,62). Demgegenüber ist die Strahlenresistenz der drei ATCC-Linien deutlich niedriger (SF2-Werte liegen zwischen 0,28 bis 0,46), obgleich mit der Zelllinie RD (mt-p53) und der Zelllinie SAOS-2 (p53-null), zwei Zelllinien analysiert wurden, die kein intaktes wt-p53 aufweisen. Ein Vergleich der strahlenbiologischen Parameter dieser drei ATCC-Linien mit den strahlenbiologischen Parametern aus anderen Sarkom-Studien (Weichselbaum et al., 1988 und 1989, Dahlberg et al., 1993, Ruka et al., 1996) zeigt, daß die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte denen anderer Sarkom-Zelllinien entsprechen. So weisen Sarkom-Zelllinien in den gerade erwähnten strahlenbiologischen Untersuchungen ebenfalls einen mittleren SF2-Wert von 0,34 auf. Deshalb könnte eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die aufgetretene Strahlenresistenz der beiden selbst etablierten Sarkom-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 (der SF2-Wert liegt bei 0,62 bzw. 0,79) in dem ursprünglichen Charakter der Zellen begründet sein, da die beiden Zelllinien bereits während der 10. und 50. Passage strahlenbiologisch charakterisiert wurden. Plausibel erscheint, daß sich Zelllinien mit zunehmender Passagierung verändern und ihre ursprünglichen Eigenschaften verlieren. Beispielsweise weisen drei durch eine Klonierung aus der Zelllinie US 8-93 neu entstandene Zelllinien unterschiedliche zytogenetische Merkmale auf. Weiterhin ist interessant, daß alle drei Zellklone die p53-Mutation der polyklonalen Ausgangs-Zelllinie US 8-93 aufweisen (Taubert et al., 1997).

Eine Ursache für die in der Literatur so kontrovers geführte Diskussion zwischen p53-Status, Strahlensensitivität und Apoptoseinduktion könnte in der Zelltypspezifität zu finden sein (O'Connor, 1997). In dem nach O'Connor modifizierten Modell kann in Abhängigkeit vom Zelltyp nach strahleninduzierten DNS-Schäden entweder eine

wt-p53 vermittelte Apoptose oder aber DNS-Reparatur erfolgen (Abb. 28). Das Ausschalten von wt-p53 würde in Zellen, die bevorzugt reparieren, zu einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung führen. Dagegen würde der Verlust der wt-p53 Funktion in Zellen, die auf Bestrahlung bevorzugt mit Apoptose reagieren, eine erhöhte Strahlenresistenz hervorrufen.



Für dieses Modell spricht, daß auf der einen Seite in Thymozyten und Lymphozyten die vorherrschende Strahlenresistenz in Abhängigkeit von wt-p53 durch die schnelle Induktion von Apoptose determiniert wird (Lowe et al., 1993, Aldridge und Radford, 1998), während auf der anderen Seite in der Bronchialkarzinom-Zelllinie A-549 und in der Gliom-Zelllinie EA14-B die Inaktivierung von wt-p53 mit p53-Antisense-Konstrukten eine gesteigerte Apoptoseinduktion hervorruft (Sak et al., 1999). Ebenso führt der Verlust des wt-p53 Targetgens waf1/p21 in kolorektalen Tumor-Zelllinien zu einer erhöhten Apoptosefrequenz und einer Sensitivierung gegenüber Bestrahlung (Wouters et al., 1997). In 13 auf die Nacktmaus transplantierte WTS-Zelllinien konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer p53-Mutation

und einer erhöhten Strahlen- bzw. Chemotherapieresistenz hergestellt werden (Budach et al., 1998). Weitere Studien, die in unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien einen Zusammenhang zwischen dem p53-Genstatus und der Strahlensensitivität aufzeigen, sind nicht bekannt.

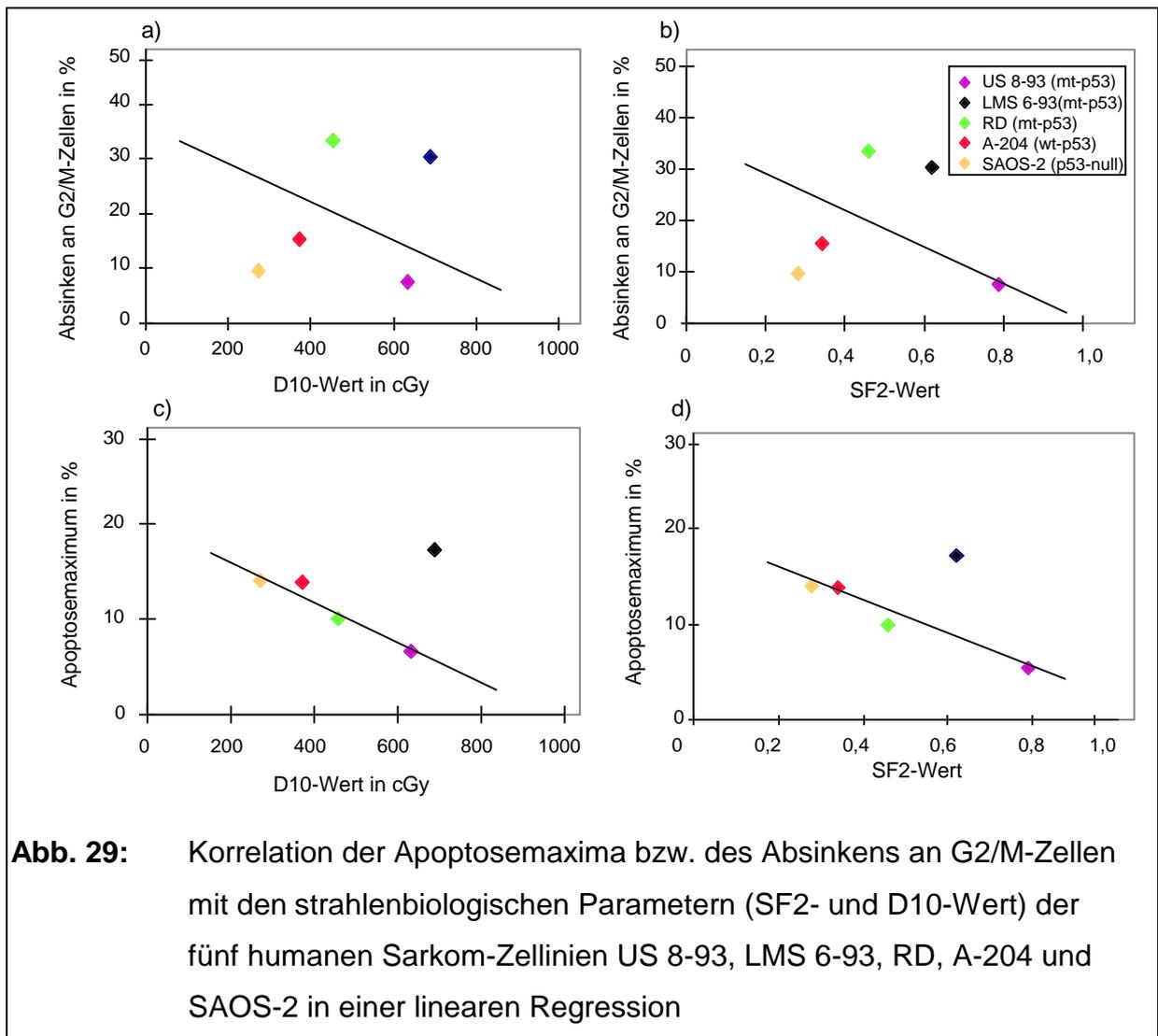
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in der vorliegenden Arbeit drei Sarkom-Zelllinien mit einem p53-Gendefekt (US 8-93, LSM 6-93 und RD) im Vergleich mit der wt-p53 Zelllinie (A-204) eine erhöhte Strahlenresistenz aufweisen. Dagegen zeigt das Beispiel der p53-null Zelllinie SAOS-2, daß p53-mutierte Zelllinien ebenfalls sensitiv gegenüber einer Bestrahlung sein können. Damit wird für Sarkom-Zelllinien der aus der Literatur bekannte Befund bestätigt, daß Tumorzellen nicht generell strahlenresistent sind, wenn sie einen p53-Gendefekt aufweisen (Bache et al., 1999). Insgesamt lassen sich die Unterschiede der Strahlensensitivität in den fünf humanen Sarkom-Zelllinien A-204, US 8-93, LSM 6-93, RD und SAOS-2 nicht allein auf den p53-Genstatus zurückführen. Um die Zusammenhänge zwischen dem p53-Genstatus und der Strahlensensitivität in den fünf humanen Sarkom-Zelllinien besser zu verstehen, wurde die Apoptoseinduktion, der Zellzyklus und die p53 vermittelte Genexpression nach Bestrahlung analysiert.

### **5.3.2 Korrelation von G2/M-Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion und Strahlensensitivität**

Betrachtet man die Zellzykluskontrolle und die Apoptoserate nach einer Bestrahlung, zeigt sich für alle fünf Sarkom-Zelllinien gemeinsam ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und eine geringe bzw. späte Induktion von Apoptose (Abb. 13). Zwischen den Zelllinien sind Unterschiede sowohl in der Stärke der Apoptoseinduktion als auch bei der Ausprägung des G2/M-Blocks (Intensität und Dauer) erkennbar. Dabei scheint eine inverse Korrelation zwischen der G2/M-Arretierung und der Apoptoseinduktion vorzuliegen (Abb. 13). Das heißt, mit dem Austritt der Zellen aus ihrer strahleninduzierten G2/M-Blockierung wird Apoptose induziert. So ist beispielsweise in der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) nach einer Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy ein lang andauernder G2/M-Block an ein niedriges Apoptosemaximum

(7,6 %) gekoppelt, während in der Zelllinie LMS 6-93 (mt-p53) die relativ rasche Aufhebung der G2/M-Blockade ein deutlich höheres Apoptosemaximum (18,2 %) hervorruft (Abb. 13). Untersuchungen zur Modulation des strahleninduzierten G2/M-Blocks weisen auf eine enge Kopplung zwischen dem Austritt der Zellen aus der G2/M-Arretierung und der Apoptoseinduktion hin (McKenna et al., 1991 und 1996, Palayoor et al., 1995, Guillouf et al., 1995, Bernard et al., 1996, Bracey et al., 1997). In diesem Zusammenhang wird in der Literatur diskutiert, daß in Zellen häufig erst Apoptose induziert wird, wenn der strahleninduzierte G2/M-Block überwunden ist (Umansky, 1991, Tauchi und Sawada, 1994, Yanagihara et al., 1995, Guo et al., 1997).

Ogleich in den fünf Sarkom-Zelllinien eine enge Kopplung zwischen dem Austritt der Zellen aus ihrer G2/M-Blockierung und der Induktion der Apoptose vorliegt, lassen sich keine generellen Zusammenhänge zur Strahlensensitivität der jeweiligen Zelllinie herstellen (Abb. 29). So korreliert zwar in der Zelllinie US 8-93 eine erhöhte Strahlenresistenz mit einem starken und lang andauernden G2M-Arrest, jedoch weist die andere strahlenresistente Zelllinie (LMS 6-93) nur einen kurzzeitigen G2/M-Arrest auf (Abb. 29 a und b). Zudem wird in der strahlensensiblen p53-null Zelllinie SAOS-2 ebenfalls ein starker und lang andauernder G2/M-Arrest nach einer Bestrahlung induziert (Abb 29 a und b). Vergleicht man die Apoptosemaxima der Sarkom-Zelllinien mit den strahlenbiologischen Parametern, lassen sich die deutlichen Unterschiede im klonogenen Überleben auch nicht mit der Apoptosefrequenz der jeweiligen Zelllinie nach einer Bestrahlung erklären (Abb. 29 c und d). Mit weniger als 20 % (7,6 bis 18,2 %) löst eine Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12,0 Gy in den untersuchten Sarkom-Zelllinien insgesamt nur ein niedriges Apoptosemaximum aus. Zusätzlich weist gerade die strahlenresistente Zelllinie LMS 6-93 mit 18,2 % die höchste Apoptosefrequenz auf. Deshalb läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen schlußfolgern, daß weder die Dauer des G2/M-Blocks ( $p=0,99$ ) noch das Ausmaß der Apoptoseinduktion ( $p=0,56$ ) in allen fünf Sarkom-Zelllinien statistisch signifikant mit den Parametern der Strahlensensitivität (SF2- und D10-Wert) korreliert. Es gibt jedoch Hinweise, daß in den vier Sarkom-Zelllinien US 8-93, RD, A-204 und SAOS-2 ein Zusammenhang (lineare Regression) zwischen einer niedrigen Apoptoserate und einer erhöhten Strahlenresistenz besteht ( $p=0,061$ ) (Abb 29).



In Tumoren korreliert die Induktion von Apoptose nicht generell mit der Strahlensensitivität. So konnte beispielsweise nur in der Hälfte der untersuchten Maustumore ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Apoptosefrequenz nach einer Bestrahlung und der vorherrschenden Strahlensensitivität hergestellt werden (Meyn et al., 1993a). Weiterhin führt in Rattenfibroblasten die Transfektion des Onkogens c-myc nach einer Bestrahlung zu einer gesteigerten Apoptoserate, die Strahlensensitivität ändert sich jedoch nicht (Aldridge et al., 1995). In Abhängigkeit vom Zelltyp dominieren neben der Apoptose auch weitere Formen von Zelltod. Deshalb würde das Bestimmen der „Gesamt-Zelltodrate“ neue Ansatzpunkte für prädiktive Untersuchungen liefern. Beispielsweise korreliert in drei Tumor-Zelllinien die Apoptosefrequenz mit der Strahlensensitivität besser, wenn die mikrokernhaltigen Zellen mit in die Apoptosefrequenz einbezogen werden (Abend et al., 1995). Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um zu

überprüfen, ob dieser Assay auch generell anwendbar ist. Zudem scheint auch der Zeitpunkt der Apoptoseinduktion für die Strahlensensitivität von Bedeutung zu sein. Beispielsweise sind hämatopoetische Zelllinien besonders strahlensensibel, wenn durch Bestrahlung „früh“ Apoptose induziert wird (Aldridge und Radford, 1998). Insgesamt läßt sich feststellen, daß die strahleninduzierte Apoptose ein wesentlicher Parameter zur Bestimmung der Strahlensensitivität ist. In Abhängigkeit vom Zell- bzw. Tumortyp besitzt diese jedoch eine unterschiedliche prognostische Relevanz. Während in Tumoren des hämatopoetischen Systems die vorherrschende Strahlenresistenz durch die schnelle Induktion von Apoptose determiniert wird, fehlt dieser Zusammenhang in anderen Tumoren häufig (Brown und Wouters, 1999).

In der Literatur wird eine Korrelation zwischen der Dauer des G2/M-Blocks und dem Zellüberleben nach einer Bestrahlung diskutiert (Mc Kenna et al., 1991, Su und Little, 1993, Jung et al., 1994), obgleich unsere Ergebnisse keinen Zusammenhang erkennen lassen. Da sowohl der G1/S-Übergang als auch der G2/M-Übergang auf DNS-Schäden kontrolliert wird, könnte mit einem verlängerten G2/M-Arrest die Möglichkeit einer „besseren“ Reparatur der durch Bestrahlung induzierten DNS-Schäden gegeben sein. Eine „bessere“ Reparatur sollte dann mit einem erhöhten Zellüberleben nach Bestrahlung bzw. an eine erhöhte Strahlenresistenz gekoppelt sein. Beispielsweise korreliert in embryonalen Ratten-Fibroblasten eine erhöhte Strahlenresistenz mit der Zunahme der Dauer des strahleninduzierten G2/M-Blocks (McKenna et al., 1991). Weiterhin zeigen Untersuchungen in humanen Tumor-Zelllinien, daß die Strahlenempfindlichkeit von der Dauer des strahleninduzierten G2/M-Blocks abhängig ist (Su und Little, 1993, Jung et al., 1994, Cohen-Jonathan et al., 1997). In anderen Untersuchungen korreliert eine durch Chemotherapeutika hervorgerufene Hemmung der Ausbildung eines strahleninduzierten G2/M-Blocks mit der Induktion von Apoptose und ist zumindest teilweise an eine Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung gekoppelt (Palayoor et al., 1995, Powell et al., 1995, Russel et al., 1995, Bernhard et al., 1996, McKenna et al., 1996, Yao et al., 1996, Bracey et al., 1997, Shinomiya et al. 1997). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigen weitere Studien (Hong et al., 1994, Schwartz et al., 1996a und b), daß eine Korrelation zwischen der Dauer des strahleninduzierten G2M-Zellzyklusblocks und der Strahlensensitivität nicht generell besteht. So weisen AT-Zellen eine erhöhte Strahlensensitivität auf, obgleich durch eine Bestrahlung ein

starker bzw. ein lang andauernder G2/M-Arrest induziert wird (Hong et al., 1994). Auch in Karzinom- und Lymphom-Zelllinien konnte keine Beziehung zwischen der Dauer des G2/M-Blocks nach einer Bestrahlung und der Strahlensensitivität hergestellt werden (Schwartz et al., 1996a und b). Diese Untersuchungen zeigen, daß die Dauer des G2/M-Blocks nach einer Bestrahlung mit der Anzahl an nicht reparierbaren DNS-Strangbrüchen korreliert (Nagasawa et al., 1994, Schwartz et al., 1994 und 1996a und b). Wenn man berücksichtigt, daß DNS-Strangbrüche zu einer erhöhten genetischen Instabilität führen können, läßt sich an dieser Stelle wieder die Verbindung von Bestrahlung und p53-Genstatus herstellen. Das TSG p53 kontrolliert nach strahleninduzierten DNS-Schäden den G2/M-Übergang entweder mit einem Zellzyklusarrest und der Aktivierung der DNS-Reparatur oder mit der Transition und der Induktion von Apoptose. Dagegen resultiert die Inaktivierung bzw. das Fehlen von wt-p53 im Verlust der G2/M-Zellzykluskontrolle und führt nach einer Bestrahlung zu einer erhöhten genetischen Instabilität (Parshad et al. 1993, Aloni-Grinstein et al. 1995, Kaufmann et al. 1995, Paules et al. 1995, Peled et al. 1996, Schwartz et al., 1997). Deshalb läßt sich schlußfolgern, daß das TSG p53 für den Erfolg einer Tumorbehandlung von entscheidender Bedeutung ist, da es die genomische Integrität und Stabilität gewährleistet.

### **5.3.3 Wertung der strahleninduzierten Genexpression in Abhängigkeit vom p53-Genstatus**

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Unterschiede im strahlenbiologischen Verhalten in Beziehung zur Expression von p53 bzw. von p53-Targetgenen stehen. Ausgehend vom heterozygoten p53-Genstatus (wt-p53/ mt-p53) ist neben der wt-p53 Zelllinie A-204 ebenso in den beiden selbst etablierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 eine wt-p53 vermittelte Strahlenantwort vorstellbar, da der gefundene Basenaustausch im p53-Gen in den beiden WTS-Zelllinien zu einem vorzeitigen Transkriptionsstopp führt bzw. für das zweite p53-Allel die p53-Wildtypsequenz nachgewiesen wurde (Taubert et al., 1997, Meye et al., 1998). In den beiden anderen Sarkom-Zelllinien RD und SAOS-2 ist keine wt-p53 vermittelte Strahlenantwort zu erwarten, da beide kein intaktes wt-p53 Allel aufweisen (siehe Tab. 1).

Mittels Westernblotanalyse konnte nachgewiesen werden, daß durch eine Bestrahlung nur in der wt-p53 Zelllinie A-204 die P53-Expression zunimmt. Mit der Zunahme des P53-Proteins wurden auch die beiden p53-Targetgene waf-1 und mdm-2 stärker exprimiert, was auf ein funktionell aktives P53 in dieser Zelllinie hinweist (Abb. 17). Dabei zeigt die flowcytometrische Analyse der P53-Expression, daß insbesondere die G2/M-Zellen nach einer Bestrahlung wt-p53 verstärkt exprimieren (Abb. 18). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß in der WTS-Zelllinie A-204 (wt-p53) die G2/M-Zellzykluskontrolle und die Induktion der Apoptose durch wt-p53 kontrolliert wird. Ebenso konnte in embryonalen Ratten-Fibroblasten gezeigt werden, daß nach einer Bestrahlung in Zellen mit P53-„Wildtyp-Konformation“ ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase induziert wird, während die „Mutanten-Konformation“ keinen G2/M-Block hervorbringt (Stewart et al., 1995). Auch in Fibroblasten führt die Inaktivierung von wt-p53 oder waf1/p21 zum Verlust des strahleninduzierten G2/M-Blocks (Bunz et al., 1998). Andererseits zeigen Untersuchungen in der Myelom-Zelllinie M1, daß durch wt-p53 der strahleninduzierte bzw. der Etoposid-induzierte G2/M-Arrest unterdrückt wird, was mit einer erhöhten Apoptosefrequenz korreliert (Guillouf et al., 1995 und 1998, Skladanowski und Larsen, 1997). So scheint wt-p53 den G2/M-Übergang in Abhängigkeit vom Zelltyp entweder mit einem Zellzyklusarrest oder der Induktion von Apoptose zu beeinflussen. Der Nachweis einer wt-p53 vermittelten G2/M-Kontrolle wird vor allem durch den Befund erschwert, daß Bestrahlung auch unabhängig von einer wt-p53 Antwort sowohl einen G2/M-Arrest als auch Apoptose induzieren kann (Strasser et al. 1994, Arita et al. 1997, Merrit et al. 1997). Dies bestätigen eigene Ergebnisse an den vier Sarkom-Zelllinien mit p53-Gendefekt. So zeigen Westernblot-Hybridisierungen, daß in diesen Zelllinien durch eine Bestrahlung weder die P53-Expression noch die Expression der beiden p53-Targetgene waf1/p21 und mdm-2 beeinflusst wird (Abb. 15). Ein weiterer Hinweis auf eine wt-p53 unabhängige Strahlenantwort ist der Befund, daß eine Bestrahlung in keiner Sarkom-Zelllinie eine Veränderung der Protein-Expression der beiden Apoptoseregulatorgene bcl-2 und bax hervorruft (Abb. 14). Auch in anderen Studien wird durch Bestrahlung in Tumorzellen ohne funktionsfähiges p53-Allel Apoptose induziert (Strasser et al., 1994, Bracey et al., 1997, Merrit et al., 1997, Strasser-Wozak et al., 1998). Jedoch muß ein p53-Gendefekt nicht immer an eine vollständige Inaktivierung des P53-Proteins gekoppelt

sein. Beispielsweise wird in HeLa-Zellen durch die Transfektion eines verkürzten p53-Konstruktes „verzögert“ Apoptose induziert, obgleich kein transkriptionsaktives P53-Protein vorhanden ist (Haupt et al., 1995). Als Ursache für die p53 vermittelte Apoptoseinduktion des verkürzten P53-Genprodukts werden Wechselwirkungen mit anderen Apoptoseregulatoren diskutiert (Haupt et al., 1995).

Für eine weitere Charakterisierung des G2/M-Übergangs wurden die beiden Proteine Cyklin-B und p34<sup>CDC2</sup> mittels Westernblotanalyse untersucht. Generell wird Cyklin-B und p34<sup>CDC2</sup> in den einzelnen Zellzyklusphasen unterschiedlich stark exprimiert (Pines und Hunter, 1989). In allen fünf Sarkom-Zelllinien wurde nach Bestrahlung entweder ein Anstieg der Cyklin-B- und/oder der p34<sup>CDC2</sup>-Expression beobachtet. Dieser Effekt korreliert in den untersuchten Sarkom-Zelllinien mit der Ausbildung eines strahleninduzierten G2/M-Blocks 24 h nach einer Bestrahlung wie erwartet, da bekannt ist, daß die beiden Zellzyklus-regulierenden Proteine insbesondere in der G2-Phase exprimiert werden. Der Übergang aus der G2-Phase in die Mitose wird durch die Aktivität des MPF reguliert (Nurse, 1990, Norbury und Nurse, 1992). In Abhängigkeit von DNS-Schäden erfolgt mit der Inaktivierung des MPF der Zellzyklusarrest in der G2-Phase. Dabei kann die Inaktivierung des MPF sowohl durch Phosphorylierungen von p34<sup>CDC2</sup> als auch über die Abnahme der Cyklin-B-Expression bzw. des -Kernexports erfolgen (Lock und Ross, 1990, Muschel et al., 1991, Norbury und Nurse, 1992). In unseren Untersuchungen konnten wir keine Abnahme der Cyklin-B-Expression detektieren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, daß mittels Westernblotanalyse nur der Gesamtgehalt der Cyklin-B und nicht die Cyklin-B-Expression während der G2/M-Phase bestimmt werden kann. Insgesamt erscheint aber die Regulation der Aktivität des MPF als ein wichtiger Mechanismus, um nach einer Bestrahlung sowohl abhängig als auch unabhängig von wt-p53 die G2/M-Phase zu kontrollieren. So wird in der Literatur diskutiert, daß auch p34<sup>CDC2</sup> nach einer Bestrahlung in die Induktion von Apoptose involviert ist (Shi et al., 1994, Delia et al., 1997). Weiterhin wird die Aktivität des MPF in der kolorektalen Karzinom-Zelllinie RKO in Abhängigkeit von der Expression des Reparaturproteins Gadd-45 negativ beeinflusst (Zhang et al., 1999). Zudem gibt es Hinweise, daß die Aktivität des MPF durch das TSG p53 kontrolliert wird. So reguliert beispielsweise wt-p53 die Aktivität des Cyklin-B Promotors negativ (Innocente et al., 1999). Die molekularen

Mechanismen, die jedoch in Verbindung mit einer p53 vermittelten G2/M-Zellzykluskontrolle bestehen, sind insgesamt nur unzureichend charakterisiert. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in den fünf untersuchten Sarkom-Zelllinien durch eine Bestrahlung ein G2/M-Arrest induziert wird. Der Befund, daß die G2/M-Zellzykluskontrolle zum einen mit einer erhöhten wt-p53 Expression verbunden ist (Zelllinie A-204), zum anderen auch ohne wt-p53 Expression erfolgen kann (Zelllinien US 8-93, LMS 6-93, RD und SAOS-2), weist auf eine Induktion von p53-abhängigen und p53-unabhängigen Mechanismen hin (Bache et al., 1999). Um die Bedeutung eines strahleninduzierten G2/M-Blocks näher zu charakterisieren, wurde an den beiden selbst etablierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 die Möglichkeit getestet, die strahleninduzierte G2/M-Blockierung durch eine Taxolbehandlung zu verstärken bzw. durch eine Koffeinbehandlung aufzuheben, um Veränderungen im strahlenbiologischen Verhalten zu induzieren.

#### **5.4 Studien zur Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung mit Taxol und Koffein in zwei WTS-Zelllinien mit mt-p53 (US 8-93 und LMS 6-93)**

##### **5.4.1 Kombination der Bestrahlung mit einer Taxolbehandlung**

Für eine Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase wurde Taxol (Paclitaxel) eingesetzt. Es wirkt antimittotisch über die Hemmung des Mitosespindelapparates, wodurch es zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase kommt (Schiff et al., 1979). Untersuchungen an den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 ohne Bestrahlung zeigen, daß bereits eine Behandlung mit niedrigen Taxolkonzentrationen (3 bis 30 nM) in beiden WTS-Zelllinien sowohl zu einer deutlichen Abnahme des Zellwachstums als auch zu einer starken Reduktion des klonogenen Zellüberlebens führt. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Sensitivität gegenüber einer Taxolbehandlung noch zu (Abb. 19). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß in beiden Zelllinien mit zunehmender Taxolkonzentration bzw. Inkubationsdauer ein stärkerer G2/M-Arrest ausgebildet wird (Abb. 20). Mittels DAPI-Färbung läßt sich

zeigen, daß der durch eine Taxolbehandlung induzierte G2/M-Arrest mit dem Auftreten von zahlreichen mitotischen Zellen verbunden ist. Nach der Taxolbehandlung ist in beiden WTS-Zelllinien eine Abnahme an mitotischen Zellen zu beobachten. Dabei korreliert, wie bei den Bestrahlungs- Experimenten, der Austritt der Zellen aus der G2/M-Arretierung mit einer Zunahme von apoptotischen Zellen. Ein Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte für Taxol mit den in der Literatur angegebenen Werten zeigt, daß die beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 sensitiv auf eine Taxolbehandlung reagieren. Während die  $IC_{50}$ -Werte der beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zwischen 2,5 und 30 nM liegen, weisen Taxol-resistente Zelllinien  $IC_{50}$ -Werte von ca. 1000 nM auf. So beträgt beispielsweise der  $IC_{50}$ -Wert der Taxol-resistenten Sarkom-Zelllinie GRU 1170 nM (Reinecke et al., 2000). In der Regel wird in zahlreichen Zelllinien ein starkes Ansprechen bei einer Taxolkonzentration zwischen 20 und 100 nM beobachtet (Liebmann et al., 1994). Zudem erscheint interessant, daß bei hohen Taxolkonzentrationen (10  $\mu$ M) die Sensitivität gegenüber Taxol wieder abnehmen kann. Dieser Effekt ist insbesondere auf eine Abnahme der Toxizität des Lösungsmittels „Cremophor-EL“ zurückzuführen (Liebmann et al., 1994). Eigene Erfahrungen bestätigen, daß das Lösungsmittel „Cremophor-EL“ in den beiden WTS-Zelllinien US 8-83 und LMS 6-93 eine erhöhte Toxizität hervorruft (Daten werden nicht gezeigt). Um Nebenwirkungen des Lösungsmittels weitestgehend auszuschließen, wurde deshalb Taxol in der vorliegenden Arbeit in DMSO gelöst.

Eigene Untersuchungen zeigen weiterhin, daß in den beiden Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 eine Taxolbehandlung mit subtoxischen Konzentrationen (5 bis 20 nM) zu keiner Strahlensensitivierung führt (Abb. 22 und 23). Dieses Resultat korreliert mit dem Befund, daß unter den gewählten Bedingungen kein G2/M-Block induziert wird bzw. die Zellen nach einem Taxol-induzierten G2/M-Arrest (auch ohne Bestrahlung) bereits durch Apoptose absterben. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde durch Taxol insbesondere dann eine Wirkungsverstärkung gegenüber einer Bestrahlung erzielt, wenn die alleinige Taxolbehandlung nur eine schwache Apoptoseinduktion auslöst (Kordoglu et al., 1999). Zudem resultiert eine Behandlung mit 10 nM Taxol in Zervixkarzinom-Zelllinien ebenfalls nicht in einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung, was mit einer erhöhten Strahlenresistenz der G1-Phase-Zellen in Verbindung gebracht wird (Geard et al., 1994). In der Literatur

wird eine Taxol induzierte Strahlensensitivierung mit einem G2/M-Zellzyklusarrest in Verbindung gebracht, da sich die G2/M-Zellen durch eine erhöhte Strahlensensitivität auszeichnen (Tishler et al., 1992). Dabei erfolgt eine Wirkungsverstärkung durch eine Taxolbehandlung zeit- und dosisabhängig (Stereon et al., 1993a, Tisher et al., 1992, Choy et al., 1993, Liebmann et al., 1994). Neuere Befunde lassen auch darauf schließen, daß die durch Taxol hervorgerufene Strahlensensitivierung nicht allein auf eine Anreicherung der Zellen in der G2/M-Phase zurückzuführen ist (Rübe et al., 1996). So führt die Inkubation mit 5 nM Taxol in der Ovarialkarzinom-Zelllinie BG-1 zu einer Strahlensensitivierung, obgleich kein G2/M-Block ausgebildet wurde (Stereon et al., 1993b). Zudem ist ein Taxol-induzierter G2/M-Arrest nicht immer auch an eine Strahlensensitivierung gekoppelt. Beispielsweise führt eine Taxolbehandlung (5,0 bis 1000 nM) in der Adenokarzinom-Zelllinie A-549 nicht zu einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung, obgleich ein G2/M-Arrest induziert wird (Liebmann et al., 1994). In zahlreichen Studien resultiert die Behandlung mit Taxol in vitro und in vivo in einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung, jedoch ergibt sich insgesamt kein einheitliches Bild. Während verschiedene klinische Studien in Patienten mit Kopf- und Halstumoren bzw. Lungen- und Bronchialkarzinomen ein Ansprechen gegenüber einer Kombinationstherapie aus Taxolbehandlung und Bestrahlung aufzeigen (Huizing et al. 1997, Rosenthal et al. 1997, Steinberg et al. 1997), konnte in Patienten mit WTS keine Verbesserung gegenüber bereits bestehenden Chemotherapiekonzepten erzielt werden (Gian et al., 1996, Casper et al., 1998, Sandler et al., 1998). Dabei scheint eine Taxolbehandlung in Abhängigkeit vom Tumortyp unterschiedlich anzusprechen (Milross et al., 1996). Weiterhin werden in Zusammenhang mit der Ausbildung einer Resistenz gegenüber Taxol die Expression des *mdr1*-Gens („Multi-Drug-Resistent“) und Veränderungen des Mikrotubuli-Gehaltes diskutiert (Cabral et al., 1981, Horwitz et al., 1986).

Mittels Westernblotanalyse konnten wir nachweisen, daß in keiner der beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 durch eine Taxolbehandlung die Expression von p53 bzw. den p53-Targetgenen *waf-1/p21*, *mdm-2* und *bax* beeinflusst wird. Deshalb läßt sich in den beiden Zelllinien eine wt-p53 unabhängige Wirkung von Taxol vermuten. Auch andere Studien belegen, daß Zelllinien mit einem p53-Defekt sensibel gegenüber einer Taxolbehandlung sind. Beispielsweise führt der Verlust der p53-Funktion in Tumorzelllinien zu einer Sensitivierung gegenüber Taxol, was mit einem

starken G2/M-Arrest und einer erhöhten Apoptoseinduktion verbunden ist (Wahl et al. 1996, Vikhanskaya et al., 1998). Dabei induziert Taxol ebenfalls unabhängig von wt-p53 Apoptose (Bhalla et al., 1993, Wahl et al., 1996, Roth et al., 1998, Zhang et al., 1998). Ein Mechanismus der durch Taxol induzierten Apoptose scheint über die Phosphorylierung des Apoptoseinhibitors Bcl-2 zu erfolgen (Blagosklonny et al., 1997, Roth et al., 1998), da phosphoryliertes Bcl-2 nicht mehr mit Bax dimerisieren kann (Haldar et al., 1998, Ibrado et al., 1997). Obgleich durch eine Taxolbehandlung die Expression von P53 und WAF-1/p21 zunehmen kann, ist deren Bedeutung jedoch noch unklar (Blagosklonny et al., 1995, Tishler et al., 1995, Wahl et al., 1996, Torres und Horwitz, 1998, Gururajanna et al., 1999). Weitere Studien zeigen, daß eine Taxolbehandlung in Tumoren bzw. Tumor-Zelllinien auch unabhängig vom p53-Genstatus wirkt (Vasey et al., 1996, Debernardis et al., 1997, O'Connor et al., 1997, Fan et al., 1998, Smith-Sørensen et al., 1998, Borbe et al., 1999, Gururajanna et al., 1999).

Insgesamt wird aus den Literaturbefunden und unseren Untersuchungen deutlich, daß der G2/M-Arrest, die Apoptoseinduktion und das klonogene Zellüberleben eng miteinander gekoppelt sind. So erscheint Taxol als ein geeigneter Kandidat, um in vitro und in vivo das Tumorwachstum zu kontrollieren. Der Befund, daß zahlreiche Tumore unabhängig von p53-Status auf eine Taxolbehandlung ansprechen, läßt dessen Bedeutung als „radiosensitizer“ und Chemotherapeutikum weiterhin steigen.

#### **5.4.2 Kombination der Bestrahlung mit einer Koffeinbehandlung**

Eine weitere Möglichkeit, den Zellzyklus in der G2/M-Phase zu beeinflussen, bietet Koffein, ein Methylxanthin, das den strahleninduzierten G2/M-Block verhindert bzw. die zytotoxischen Effekte von DNS schädigenden Agenzien erhöht (Musk und Steel, 1990). In den beiden humanen WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 wird der zytotoxische Effekt nach einer Bestrahlung durch Koffein potenziert. So führt die Inkubation mit Koffein in beiden WTS-Zelllinien mit ansteigender Konzentration (von 0,5 bis 5 mM) zu einer zunehmenden Wachstumsinhibierung und einer Abnahme der Platiereffizienz (Abb. 24). Dieser Befund korreliert mit einem Abfall an G2/M-Zellen

und einem Anstieg der Apoptoserate. Weiterhin verhindert Koffein in den beiden WTS-Zelllinien mit p53-Gendefekt die Ausbildung eines G2/M-Blocks nach einer Bestrahlung. Das Fehlen des strahleninduzierten G2/M-Blocks korreliert aber nicht mit der Induktion von Apoptose. Während in beiden WTS-Zelllinien sich der Anteil an G2/M-Zellen nach einer Bestrahlung mit 12,0 Gy durch Koffein um ca. 20 bis 32 % verringert, steigt die Apoptoserate 0 bis 48 h nach einer Bestrahlung in beiden Zelllinien um ca. 4 bis 6 % an (Abb. 25). In der Literatur korreliert ein durch Koffein verhinderter G2/M-Arrest nach Bestrahlung häufig, jedoch nicht generell mit der Induktion von Apoptose (Efferth et al., 1995, Palyoor, et al., 1995, Zhen und Vaughan, 1995, Bernhard et al. 1996, Shinomiya et al. 1997, Ribeiro et al., 1999). Mit unseren Untersuchungen bestätigt sich der aus den Bestrahlungs-Experimenten (ohne Koffeinbehandlung) gewonnene Befund, daß in WTS-Zelllinien die Apoptosefrequenz nur allmählich ansteigt (Abb. 7 und 13). Eine weitere Ursache für das Fehlen einer inversen Korrelation von G2/M-Block und Apoptoseinduktion könnte das Auslösen unterschiedlicher Effekte durch eine Kombination aus Koffeinbehandlung und Bestrahlung sein (Efferth et al., 1995, Russel et al., 1995, Zhen und Vaughan, 1995, Ribeiro et al., 1999). So wird beispielsweise in der Zelllinie A-549 erst nach einer Inkubationszeit von 96 h der maximale Verstärkungseffekt gegenüber einer Bestrahlung erzielt (Russel et al., 1995). Weiterhin verhindert Koffein in der wt-p53 Zelllinie TK6 die strahleninduzierte DNS-Fragmentation vollständig (Zhen und Vaughan, 1995).

Interessant ist der Befund, daß eine durch Koffein vermittelte Strahlensensitivierung insbesondere in Zelllinien mit einem p53-Defekt auftritt (Powell et al., 1995, Russell et al., 1995, Yao et al., 1996, Bracey et al., 1997). Weitere Studien zeigen ebenfalls, daß eine Radiosensitivierung durch eine Koffeinbehandlung auch unabhängig von der Inhibierung des strahleninduzierten G2/M-Blocks bzw. unabhängig vom p53-Status erfolgen kann (Berg et al., 1999, Tagaki et al., 1999, Ribeiro et al., 1999 Higuchi et al, 2000). Diese Ergebnisse belegen, daß durch Koffein eine Radiosensitivierung auch unabhängig vom p53-Genstatus möglich ist. In Übereinstimmung mit dieser Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Behandlung mit 1,0 mM Koffein in den beiden p53-mutierten Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 ebenfalls in einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung resultiert (Abb. 26).

Zwischen den beiden WTS-Zelllinien lassen sich jedoch Unterschiede in der Wirkungsverstärkung bei hohen Strahlendosen aufzeigen. Während eine Koffeinbehandlung in der Zelllinie US 8-93 bei hohen Strahlendosen eine starke Strahlensensibilisierung induziert, verändert sich der Verstärkungseffekt in der Zelllinie LMS 6-93 (gegenüber niedrigen Strahlendosen) nur geringfügig (Tab. 4). Daß dieser Befund auf Unterschiede in der G2/M-Zellzykluskontrolle bzw. in der DNS-Reparatur zurückgeführt werden kann, läßt sich wie folgt erklären. Durch eine Koffeinbehandlung wird in beiden WTS-Zelllinien der strahleninduzierte G2/M-Arrest vollständig verhindert (Abb. 25a). Während jedoch eine Bestrahlung (ohne Koffeinbehandlung) in der WTS-Zelllinie US 8-93 einen lang andauernden G2/M-Block auslöst, ist die strahleninduzierte G2/M-Arretierung in der WTS-Zelllinie LMS 6-93 bereits nach kurzer Zeit wieder aufgehoben (Abb. 13). Weiterhin zeigen Untersuchungen mit dem Comet-Assay, daß die Zelllinie US 8-93 im Vergleich mit der Zelllinie LMS 6-93 bei hohen Strahlendosen einen größeren Initialschaden aufweist, obgleich beide Zelllinien die strahleninduzierten DNS-Schäden innerhalb von 60 min weitestgehend reparieren (Pigorsch et al., unveröffentlicht). In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, daß eine Koffeinbehandlung die DNS-Reparatur hemmt (Smeets et al., 1994b, Link et al., 1995). Deshalb scheint eine Koffeinbehandlung die Strahlenwirkung insbesondere dann effizient zu verstärken, wenn durch Bestrahlung ein lang andauernder G2/M-Arrest bzw. ein großer DNS-Schaden induziert wird. Eine weitere Studie an zwei Rattentumor-Zelllinien zeigt ebenfalls, daß die Wirkungsverstärkung von Koffein gegenüber einer Bestrahlung besonders stark ist, wenn sowohl der strahleninduzierte G2/M-Block als auch die DNS-Reparatur effizient gehemmt werden (Akimoto et al., 1999). Auch andere Studien verdeutlichen, daß der in Tumor-Zelllinien (durch eine Bestrahlung) hervorgerufene Initial- bzw. Restschaden eine wichtige Komponenten der intrinsischen Strahlensensitivität ist. So korreliert in Tumor-Zelllinien eine erhöhte Strahlensensitivität mit einem hohen Initial- und Rest-Schaden an ss und ds DNS-Brüchen (Giaccia et al., 1992, Ruiz de Almodovar, et al., 1994, Zaffaroni et al., 1994). Weiterführende Untersuchungen zeigen zudem, daß Zellen mit einem p53-Defekt vor allem dann besonders strahlenresistent sind, wenn der durch eine Bestrahlung hervorgerufenen DNS-Schaden schnell repariert wird (Bristow et al., 1998).

Einige Studien konnten in Zelllinien mit wt-p53 nachweisen, daß die durch eine Bestrahlung hervorgerufene Protein-Expression von P53 und WAF-1/p21 nach einer Koffeinbehandlung gehemmt wird (Berg et al., 1999, Tagaki et al., 1999). Demgegenüber führt eine Koffeinbehandlung in zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (wt-p53, mt-p53) zu einer Zunahme der WAF-1/p21-Expression (Gururajanna et al., 1999). Eigene Expressionsstudien mittels Westernblotanalyse zeigen, daß eine Koffeinbehandlung weder in den beiden p53-mutierten Zelllinien LMS 6-93 und US 8-93 noch in der wt-p53 Zelllinie A-204 eine Veränderung der P53- bzw. WAF-1/p21-Expression bewirkt. Jedoch führt die Kombination aus Koffeinbehandlung und Bestrahlung in der Zelllinie A-204 (wt-p53) zu einer reduzierten MDM-2-Expression (Abb. 27). Diese Ergebnisse lassen ebenfalls darauf schließen, daß die durch eine Koffeinbehandlung hervorgerufene Strahlensensitivierung in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 unabhängig von der Aktivierung des TSG p53 erfolgt.

Die molekularen Mechanismen einer Koffeinbehandlung sind jedoch nicht vollständig geklärt. So weist die Zelllinie SAOS-2 (p53-null) eine erhöhte Apoptosefrequenz gegenüber einer Kombinationbehandlung aus Cisplatin und Koffein auf, wenn man sie mit wt-p53 transfiziert (Tsuchiya et al, 2000). Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Befund, daß Koffein eine protektive Wirkung gegenüber einer Ganzkörperbestrahlung besitzt. Es konnte nachgewiesen werden, daß mehr als 50 % der Mäuse die letale Strahlendosis von 7,5 Gy überleben, wenn man sie vorher mit Koffein behandelt (George et al., 1999). Weiterhin scheint Koffein essentiell für die Tumor-inhibierende Wirkung von schwarzen bzw. grünen Tee zu sein (Huang et al., 1997). In vivo Versuche zeigen, daß Koffein bei Patienten mit Melanomen, Glioblastomen und Pankreaskarzinomen die Wirkung einer konventionellen Chemotherapie nicht potenziert (Cohen et al., 1980, Kelsen et al., 1991). Demgegenüber wurden bei Patienten mit Sarkomen gute Ergebnisse erzielt (Tsuchiya et al., 1998 und 1999, Yamagishi et al., 1999).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß in den beiden strahlenresistenten WTS-Zelllinien US 8-83 und LMS 6-93 durch Koffein der strahleninduzierte G2/M-Block verhindert wird, was letztlich die Effektivität einer anschließenden Bestrahlung unabhängig von einer p53-Aktivierung steigert. Aus den Literaturbefunden und den vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, daß die strahleninduzierte G2/M-

Zellzyklusarretierung eine wesentliche Determinante der Strahlensensitivität ist. Die Bedeutung für eine Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung nimmt noch zu, wenn man berücksichtigt, daß eine Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung auch unabhängig von p53-Status möglich ist. Zudem lassen erste Untersuchungen darauf schließen, daß Koffein auch in vivo als Chemotherapeutikum von Bedeutung ist.

## **5.5 Wertung der Arbeitsstrategie und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf humane Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus strahlenbiologisch charakterisiert. Insgesamt wird deutlich, daß das TSG p53 ein wichtiger Modulator der Strahlensensitivität ist. In Abhängigkeit von der Art des p53-Defekts kann die Empfindlichkeit gegenüber einer Bestrahlung verschieden beeinflusst werden. Weiterhin ist für ein komplexes Verständnis einer p53 vermittelten Strahlenantwort mit der Induktion von Apoptose, der Zellzykluskontrolle und der DNS-Reparatur in Tumorzellen der Gen- und Expressionsstatus weiterer Onkogene und TSG zu berücksichtigen, da bekannt ist, daß für das Herausbilden von Malignomen mehrere Mutationen in Onkogenen und TSG verantwortlich sind. So sind beispielsweise in kolorektalen Tumoren vier bis fünf mutative Ereignisse nötig, um maligne Tumore auszubilden (Fearon und Vogelstein, 1990). Die Komplexität einer wt-p53 vermittelten Strahlenantwort wird vor allem noch dadurch gesteigert, daß das TSG p53 mit weiteren Zellzyklus-, Apoptose- und Reparatur-Proteinen in Wechselwirkung tritt. Deshalb werden künftig komplexe „Microarray-Analysen“ zum Genstatus, zur mRNA- und zur Protein-Expression eine effektive Möglichkeit darstellen, um prognostische Aussagen treffen zu können.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Induktion der Apoptose, der strahleninduzierte G2/M-Arrest und die DNS-Reparatur wichtige Parameter der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit sind. In Abhängigkeit von der Zelltypspezifität, vom p53-Status bzw. von der Art des p53-Gendefekts können die einzelnen Parameter für eine Bestrahlungstherapie eine unterschiedliche prognostische Aussagekraft besitzen (O'Connor, 1997, Brown und Wouters, 1999). Nach dem Modell von O'Connor wird durch das TSG p53 in Abhängigkeit vom Zelltyp entweder

die DNS-Reparatur aktiviert oder aber Apoptose induziert (siehe Abb. 28). Aus dem Befund, daß in Tumoren das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod gestört ist, lassen sich Arbeitsstrategien ableiten, entweder die DNS-Reparatur zu hemmen oder die Mechanismen der Apoptoseinduktion zu aktivieren. Beide Ansatzpunkte würden die Effektivität einer Bestrahlungsbehandlung erhöhen, da sie letztlich zur Verschiebung des Gleichgewichts von Zellüberleben und Zelltod führen. Eine wichtige Strategie für die Anwendung gentherapeutischer Ansätze in der Radioonkologie ist dabei die Wiederherstellung der wt-p53 vermittelten Apoptose in Lymphozyten und Thymozyten (Lowe et al., 1993 und 1994, Aldridge und Radford, 1998). Alternativ zu den klassischen Therapiekonzepten, resultiert auch die Inaktivierung von wt-p53 in den Zelllinien A-549 und EA14-B nach einer Bestrahlung in einer gesteigerten Apoptoseinduktion (Sak et al., 1999). Ebenso führt der Verlust von waf-1/p21 in kolorektalen Tumor-Zelllinien bzw. die Transfektion von mt-p53 (AS 123) in der p53-null Zelllinie SAOS-2 zu einer erhöhten Apoptosefrequenz und einer Sensitivierung gegenüber Bestrahlung (Wouters et al., 1997, Okaichi et al., 1999).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die gezielte Reparatur von Tumortyp-spezifischen Defekten durch die Gentransfektion. Aufbauend auf den Befunden, daß in WTS mutative Defekte des TSG p53 bzw. eine mdm-2-Gen Überexpression zur Inaktivierung der wt-p53 Funktion führen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein effektives Transfektionssystem für WTS-Zelllinien etabliert (Meye, 1999). Die Untersuchungen zur Wirkung von mdm2-Antisense- bzw. wt-p53-Konstrukten mittels liposomaler Transfektion zeigen, daß die Wiederherstellung der p53-Tumorsuppressor-Funktion eine weitere Möglichkeit ist, um das Tumorwachstum in Sarkom-Zelllinien zu kontrollieren. So wird durch die Transfektion mit wt-p53 zumindest in der p53-null Zelllinie SAOS-2 das Zellwachstum effizient gehemmt. Die liposomale Transfektion mit mdm2-Antisense führt in der mt-p53 Zelllinie US 8-93 zu einer signifikanten Inhibierung der Zellkoloniebildung (Meye, 1999, Meye et al, 2000). Erste Versuche zur Kombination von Bestrahlung und liposomaler Transfektion mit wt-p53- bzw. mdm2-Antisense-Konstrukten lassen in der p53-mutierten Zelllinie US 8-93 auf eine Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung schließen. Weiterhin konnte mittels Westernblotanalyse gezeigt werden, daß dieser Effekt nicht auf eine p53-strahleninduzierte Expression zurückzuführen ist (Grünbaum et al., unveröffentlicht). In weiteren Versuchen bleibt zu klären, worauf der Effekt der

Strahlensensitivierung in der Zelllinie US 8-93 zurückgeführt werden kann bzw. wie andere WTS-Zelllinien auf eine Kombination von Bestrahlung und Gentransfektion (mit wt-p53- bzw. mdm2-Antisense-Konstrukten) reagieren. Während diese Ansätze das Ziel haben, Tumorzellen gegenüber einer Bestrahlung zu sensitivieren, ist eine weitere Möglichkeit der Einsatz von Modulatoren, die das Normalgewebe gegenüber einer Strahlentherapie schützen. Beispielsweise scheint die wt-p53 Funktion für den Radioprotektor BBI („Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor“) notwendig zu sein, um Fibroblasten gegenüber einer Bestrahlung zu schützen (Dittmann et al., 1998). Weitere gentherapeutische Ansätze, wie der Einsatz von Suizidgenen oder von strahleninduzierbaren Promotoren werden künftig in Kombination mit der Strahlentherapie ihre Anwendung finden (Rodemann et al., 1999).

Auch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemotherapeutika Taxol und Koffein sind geeignete Kandidaten, um die Erfolge einer Bestrahlung zu verbessern. In zahlreichen Untersuchungen wirkt Taxol in Tumoren bzw. Tumor-Zelllinien unabhängig vom p53-Genstatus (Vasey et al., 1996, Debernardis et al., 1997, O'Connor et al., 1997, Fan et al., 1998, Smith-Sørensen et al., 1998, Borbe et al., 1999, Gururajanna et al., 1999). Durch eine Inaktivierung des TSG p53 in humanen Ovarialkarzinom-Zellen kann die Sensitivität gegenüber der Taxolbehandlung sogar noch erhöht werden (Vikhanskaya et al., 1998). Ebenso verursacht eine Transfektion von wt-p53 Konstrukten in der p53-null Zelllinie H358 die Abnahme der Sensitivität (um das 3-fache) gegenüber einer Taxolbehandlung (Ling et al., 2000). Wenn sich die Hypothese bestätigen läßt, daß wt-p53 eine protektive Wirkung gegenüber Taxol als Chemotherapeutikum aufweist, wäre insbesondere die Behandlung von p53-defekten Tumoren möglich, da das Normalgewebe aufgrund der wt-p53 Funktion gegenüber einer Taxolbehandlung geschützt ist. Jedoch ist die Bedeutung des TSG p53 gegenüber einer Taxolbehandlung nicht vollständig geklärt, da auch die Transfektion von wt-p53 Konstrukten in Tumor-Zelllinien mit defektem p53-Gen eine Sensitivierung gegenüber einer Taxolbehandlung induzieren kann (Quist et al., 1999). In eigenen Untersuchungen führt eine Taxolbehandlung in beiden mt-p53 Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 nicht zu einer Radiosensibilisierung. Dafür wird in den WTS-Zelllinien bereits durch eine Behandlung mit niedrigen Taxolkonzentrationen (5 bis 30 nM) das Tumorstadium effizient gehemmt bzw. in Abhängigkeit von einem G2/M-Zellzyklusarrest Apoptose induziert.

Auch Koffein ist ein geeigneter Kandidat, um Tumorzellen, die eine p53-abhängige Regulation der G1/S-Transition verloren haben, gegenüber einer Bestrahlung zu sensitivieren. Der Befund, daß die Inhibierung des strahleninduzierten G2/M-Blocks in den beiden p53-mutierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 zu einer Wirkungsverstärkung (um das 1,3 bis 4,6-fache) führt, verdeutlicht, daß der G2/M-Übergang eine wesentliche Determinante der Strahlensensitivität ist. Weiterhin zeigt das Beispiel einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Koffeinbehandlung, daß sich durch eine individuelle Therapieplanung die Effektivität einer Therapie weiter intensivieren läßt.

In weiteren Untersuchungen könnte sich die Analyse von WTS-Zelllinien mit wt-p53 bzw. hemizygoten p53-Mutationen gegenüber einer Taxol- bzw. Koffeinbehandlung und Bestrahlung anschließen. Gegenwärtig werden in der Arbeitsgruppe zwei WTS-Zelllinien mit einer hemizygoten p53-Mutation untersucht (Oelman, unveröffentlicht). Ebenfalls bleibt noch zu klären, inwieweit eine Koffeinbehandlung die DNS-Reparatur beeinflusst. Um die Rolle der DNS-Reparatur für die Strahlensensitivität von WTS-Zelllinien zu untersuchen, wäre der Einsatz von wt-p53- bzw. gadd 45- Antisense-Konstrukten in Kombination mit einer Bestrahlung möglich. Zudem stellt sich die Frage, ob die in vitro gefundenen Ergebnisse auch auf das Mausmodell übertragbar sind. Insgesamt zeigen die unterschiedlichen Ansätze, daß das komplexe Verstehen der Mechanismen einer zellulären Strahlenantwort in Abhängigkeit von der Zell- und Gewebespezifität, vom Tumortyp und den molekularen Defekten notwendig ist, um die einzelnen Therapieprinzipien optimal miteinander zu verknüpfen.

## 6 Zusammenfassung

Das TSG p53 ist ein wichtiger Modulator der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit, da es als Schalterprotein grundlegende physiologische Prozesse, wie die Kontrolle des Zellzyklus, die Apoptoseinduktion, die DNS-Reparatur, die Zelldifferenzierung und die genomische Stabilität, steuert und reguliert. In Abhängigkeit vom Zelltyp bzw. durch das komplexe Zusammenwirken mit weiteren Zellzyklus-, Apoptose- und Reparatur-Proteinen kann das TSG p53 die zelluläre Strahlenantwort unterschiedlich beeinflussen. Insbesondere in malignen Tumoren sind die Mechanismen einer p53-vermittelten Strahlenantwort nur schwer zu verstehen, da weitere Mutationen in Onkogenen und TSG die intrinsische Strahlenempfindlichkeit ebenfalls beeinflussen können. Da ca. 50 % aller Tumoren p53-Mutationen tragen, ist die Suche nach „Radiosensitizern“, die unabhängig von p53-Status wirken können, von besonderem Interesse. Als Untersuchungsmodell wurden in der vorliegenden Arbeit humane Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus gewählt, da es für Sarkome bisher keine ausreichenden Kriterien für die molekulare Diagnostik, die Prognose und eine effektive individualisierbare Therapie gibt.

Im ersten Teil wurde der Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in den beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) untersucht. Die beiden Zelllinien wurden mit Strahlendosen zwischen 0,4 und 24,0 Gy bestrahlt und ihre Antwort anhand der Charakterisierung des Zellwachstums, des Zellzyklusverlaufs und der Zelltodrate (Apoptose und Nekrose) untersucht. Für beide WTS-Zelllinien sind die strahlenbiologischen Effekte von der Zeit und der Strahlendosis abhängig. Während die Bestrahlung mit Strahlendosen von 0,4 und 2,0 Gy in beiden Zelllinien in einer Verzögerung des Zellwachstums und einer schwachen Abnahme der Zellvitalität resultiert, führt die Bestrahlung mit Strahlendosen von 6,0; 12,0 Gy oder 24,0 Gy zum Verlust des Zellwachstums. Damit verbunden ist in beiden Zelllinien sowohl eine stärkere Abnahme der Zellvitalität als auch die Ausbildung eines strahleninduzierten G2/M-Blocks. Mit dem Austritt der Zellen aus der G2/M-Arretierung konnte in beiden WTS-Zelllinien die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den beiden WTS-Zelllinien fanden wir sowohl bei der Ausprägung des G2/M-Blocks als auch im Zeitpunkt und im Ausmaß der Apoptoseinduktion. Insgesamt ist in der mt-p53 Zelllinie (US 8-93) ein mit

zunehmender Dosis stärkerer G2/M-Arrest an eine niedrigere Zelltodrate gekoppelt, während in der wt-p53 Zelllinie (A-204) der relativ schnelle Austritt aus der G2/M-Phase mit einer erhöhten Apoptoserate korreliert. Diese strahlenbiologischen Unterschiede der beiden Zelllinien lassen sich gut mit ihrem unterschiedlichen p53-Genstatus in Verbindung bringen (Bache et al., 1997). Weiterhin wurde die Analyse der Apoptose mit unterschiedlichen Nachweisverfahren, wie dem DNS-Leiter-Assay, dem TUNEL-Assay, der DAPI-Färbung und dem Annexin-V-Test, durchgeführt. Dabei konnte eine gute Korrelation zwischen „TUNEL-positiven“ Zellen und morphologischen Apoptosemerkmalen (DAPI-Analyse) für die beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und A-204 (wt-p53) nachgewiesen werden. Vergleichbare Apoptoseraten wurden mit dem Annexin-V-Test detektiert. Zusätzlich konnte in beiden WTS-Zelllinien gezeigt werden, daß mit dem DNS-Leiter-Assay die Induktion der Apoptose nach einer Bestrahlung qualitativ und semiquantitativ bestimmbar ist.

Im zweiten Arbeitsabschnitt wurde die strahlenbiologische Charakterisierung auf fünf humane Sarkom-Zelllinien ausgedehnt, um die Hypothese einer wt-p53 vermittelten Strahlenantwort in WTS zu überprüfen. Mit den Zelllinien LMS 6-93, SAOS-2 und RD wurden neben den beiden bereits untersuchten WTS-Zelllinien (US 8-93, A-204) drei weitere Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichen Veränderungen im p53-Gen analysiert. Drei von vier Zelllinien mit einer p53-Mutation (US 8-93, LSM 6-93 und RD) weisen gegenüber der wt-p53 Zelllinie A-204 eine erhöhte Strahlenresistenz auf. Demgegenüber wies die p53-null Zelllinie SAOS-2 eine hohe Strahlenempfindlichkeit auf. Gemeinsam konnte für alle fünf Sarkom-Zelllinien ein G2/M-Block und eine relativ geringe Apoptoserate (<20 %) nach einer Bestrahlung festgestellt werden. Unterschiede gab es jedoch bei der Ausprägung (Intensität und Dauer) des G2/M-Blocks, die indirekt mit der Apoptoserate korreliert. Das heißt, es existiert eine enge Kopplung zwischen dem Austritt der Zellen aus ihrer strahleninduzierten G2/M-Blockierung und der Induktion von Apoptose. In den fünf Sarkom-Zelllinien korreliert jedoch weder die Dauer des G2/M-Blocks noch das Ausmaß der Apoptoseinduktion statistisch signifikant mit den Parametern der Strahlensensitivität (SF2-Wert, D10-Wert). Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer niedrigen Apoptosefrequenz und einer erhöhten Strahlenresistenz gibt es jedoch in den vier Zelllinien US 8-93, RD, A-204 und SAOS-2 ( $p=0,061$ ). Mittels Westernblotanalyse konnte nachgewiesen werden, daß nur in der wtp53 Zelllinie A-204 eine Zunahme der

P53-Expression nach Bestrahlung zu verzeichnen ist. Weiterhin werden in dieser Zelllinie mit dem Anstieg von wt-p53 Protein ebenfalls die Proteine WAF-1/p21 und MDM-2 stärker exprimiert, was auf eine transkriptionsaktivierende Wirkung von wt-p53 hinweist. In allen fünf Sarkom-Zelllinien korreliert mit dem strahleninduzierten G2/M-Block ein Anstieg der Expression von Cyklin-B und/bzw. von p34<sup>Cdc2</sup>. Das Ergebnis, daß die Induktion von Apoptose bzw. die Ausbildung des G2/M-Arrest zum einen mit einer erhöhten wt-p53 Expression (Zelllinie A-204) verbunden ist, zum anderen aber auch ohne wt-p53 Expression (US 8-93, LMS 6-93, RD und SAOS-2) erfolgt, deutet auf die Induktion von p53-abhängigen und p53-unabhängigen Mechanismen hin (Bache et al., 1999).

Im dritten Arbeitsabschnitt wurde die Möglichkeit getestet, die strahleninduzierte G2/M-Blockierung in den beiden selbst etablierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 mittels Taxolbehandlung zu verstärken bzw. durch Koffeinbehandlung aufzuheben, um eine Strahlensensitivierung zu induzieren.

Die beiden p53-mutierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 sind sensitiv gegenüber einer Taxolbehandlung. Mit zunehmender Taxolkonzentration (1 bis 100 nM) arretieren die Zellen nach ca. 17 h zunehmend in der G2/M-Phase (bei 50 nM - 70 %). In den beiden Zelllinien resultiert die Behandlung mit Taxoldosen, die einen vollständigen G2/M-Arrest auslösen, in einer hohen Zytotoxizität. Dabei sind während der Taxolinkubation mitotische Zellen bzw. nach der Taxolinkubation apoptotische Zellen zu beobachten. In keiner der beiden WTS-Zelllinien führt jedoch eine Taxolbehandlung mit subtoxischen Konzentrationen zu einer Sensitivierung gegenüber Bestrahlung. Insgesamt erscheint Taxol als ein geeigneter Kandidat, um eine verbesserte Tumorkontrolle zu erzielen, da durch eine Taxolbehandlung mit niedrigen Konzentrationen (3 bis 30 nM) in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 die Zellproliferation effizient gehemmt bzw. in Abhängigkeit von einem G2/M-Zellzyklusarrest Apoptose induziert wird.

Eine Behandlung mit Koffein (0,5 bis 5 mM) führt in den beiden strahlenresistenten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 zu einer deutlichen Wachstumsinhibierung. Weiterhin verhindert eine Koffeinbehandlung das Auftreten eines G2/M-Blocks nach einer Bestrahlung. Obgleich in keiner der beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 das Fehlen des strahleninduzierten G2/M-Blocks mit dem Ausmaß der Induktion von Apoptose korreliert, führt eine Koffeinbehandlung in beiden Zelllinien zu

einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung (1,3 bis 4,6-fache). Insbesondere in der WTS-Zelllinie US 8-93 führen hohe Strahlendosen (8,0 bis 10,0 Gy) zu einer deutlichen Wirkungsverstärkung (um das 3,5 bis 4,6-fache). Dagegen ändert sich der Verstärkungseffekt in der Zelllinie LMS 6-93 in Abhängigkeit von der Strahlendosis nur geringfügig (um das 1,6 bis 2-fache). Es läßt sich die Hypothese aufstellen, daß dieser Effekt durch Unterschiede in der G2/M-Regulation bzw. in der DNS-Reparatur hervorgerufen wird. Kein Einfluß konnte auf die P53-Expression bzw. die Protein-Expression der p53-Targetgene waf-1/p21 und mdm-2 nachgewiesen werden, auch nicht in der wt-p53 Zelllinie (A-204). So erscheint der strahleninduzierte G2/M-Arrest insbesondere in Zelllinien mit defekten p53-Gen als eine wichtige Determinante der Strahlensensitivität, da dessen Verhinderung (durch eine Koffeinbehandlung) in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 die Effektivität einer anschließenden Bestrahlung erhöht. Die Bedeutung für eine Modulation eines strahleninduzierten G2/M-Arrests nimmt noch zu, wenn man bedenkt, daß eine Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung auch unabhängig vom p53-Status möglich ist.

## 7 Literatur

- Abend M, Rhein A, Gilbertz KP, Blakely WF, Van Beuningen D. Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int J Radiat Biol.* 67: 315-322, 1995.
- Abend M, Schmelz HU, Kraft K, Rhein AP, van Beuningen D, Sparwasser C. Intercomparison of apoptosis morphology with active DNA cleavage on single cells in vitro and on testis tumours. *J Pathol.* 185: 419-426, 1998a.
- Abend M, van Beuningen D. Significance of apoptotic processes in radiotherapy. I. *Strahlenther Onkol.* 174: 156-166, 1998b.
- Abend M, van Beuningen D. Significance of apoptotic processes in radiotherapy. II. *Strahlenther Onkol.* 174: 212-216, 1998c.
- Adams, GE. The clinical relevance of tumor hypoxia. *Eur J Cancer.* 26: 420-421, 1990.
- Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 8493-8497, 1995.
- Akimoto T, Mitsuhashi N, Matsumoto H, Sakurai H, Maebayashi K, Higuchi K, Nozaki M, Niibe H. Potentially lethal damage repair and its inhibitory effect of caffeine in two yolk sac tumor cell lines with different radiosensitivities. *Cancer Lett.* 147: 199-206, 1999.
- Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L, Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene.* 13: 7706-7717, 1999.
- Aldridge DR, Arends MJ, Radford IR. Increasing the susceptibility of the rat 208F fibroblast cell line to radiation-induced apoptosis does not alter its clonogenic survival dose-response. *Br J Cancer.* 71: 571-577, 1995.
- Aldridge DR, Radford IR. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res.* 1: 2817-2824, 1998.
- Aloni-Grinstein R, Schwartz D, Rotter V. Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression. *EMBO J.* 14: 1392-1401, 1995.
- Andreassen A, Oyjord T, Hovig E, Holm R, Florenes VA, Nesland JM, Myklebost O, Hoie J, Bruland OS, Borresen AL, Fodstad O. p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res.* 53: 468-471, 1993.
- Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: Mechanism and roles in pathology. *Int J Rev Exp Pathol.* 32: 223-254, 1991.
- Arita D, Kambe M, Ishioka C, Kanamaru R. Induction of p53 independent apoptosis associated with G2/M arrest following DNA damage in human colon cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res.* 88: 39-43, 1997.
- Bache M, Dunst J, Würfl P, Fröde D, Dietzel M, Meye A, Schmidt H, Rath F-W, Wohlrab W, Dralle H, Taubert H. Radiation induced G2/M block and apoptosis in two human sarcoma cell lines with different p53 gene status. *Int J Oncol.* 11: 993-997, 1997.
- Bache M, Dunst J, Würfl P, Fröde D, Meye A, Schmidt H, Rath F-W, Taubert H. G2/M checkpoint acts p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res.* 19: 1827-1832, 1999.

- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12: 461-468, 1993.
- Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet.* 11: 505-510, 1985.
- Berg AM, Schlenger L, Sinn B, Ketel B, Schröder G, Wolf G, Wurm RE, Stuschke M, Budach V. The relationship between p53 and G1 block in the radiation response. *Wolfsbergmeeting of Molecular Rad.Biol/Oncol. Poster.* 38, 1999.
- Bernhard EJ, Muschel RJ, Bakanauskas VJ, McKenna WG. Reducing the radiation-induced G2 delay causes HeLa cells to undergo apoptosis instead of mitotic death. *Int J Radiat Biol.* 69: 575-584, 1996.
- Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME, Huang Y. Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 7: 563-568, 1993.
- Biard DS, Martin M, Rhun YL, Duthu A, Lefaix JL, May E, May P. Concomitant p53 gene mutation and increased radiosensitivity in rat lung embryo epithelial cells during neoplastic development. *Cancer Res.* 54: 3361-3364, 1994.
- Blagosklonny MV, Schulte TW, Nguyen P, Mimnaugh EG, Trepel J, Neckers L. Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Res.* 55: 4623-4626, 1995.
- Blagosklonny MV, Giannakakou P, el-Deiry WS, Kingston DG, Higgs PI, Neckers L, Fojo T. Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res.* 57: 130-135, 1997.
- Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry.* 24: 123-130, 1996.
- Borbe R, Rieger J, Weller M Failure of taxol-based combination chemotherapy for malignant glioma cannot be overcome by G2/M checkpoint abrogators or altering the p53 status. *Cancer Chemother Pharmacol.* 44: 217-227, 1999.
- Boulikas T. Gene therapy of prostate cancer: p53, suicidal genes, and other targets. *Anticancer Res.* 17: 1471-1505, 1997.
- Bracey TS, Williams AC, Paraskeva C. Inhibition of Radiation-induced G2 Delay Potentiates Cell Death by Apoptosis and/or the Induction of Giant Cells in Colorectal Tumor Cells with Disrupted p53 Function. *Clin Cancer Res.* 3: 1371-1381, 1997.
- Brachman D, Beckett M, Graves D, Hara D, Vokes E, Weichselbaum R. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Res.* 53: 3667-3668, 1993.
- Bristow RG, Benchimol S, Hill RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology.* 40: 197-223, 1996.
- Bristow RG, Hu Q, Jang A, Chung S, Peacock J, Benchimol S, Hill R. Radioresistant MTP53-expressing rat embryo cell transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene.* 16: 1789-1802, 1998.
- Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer-Res.* 59: 1391-1399, 1999.
- Budach V, Dinges S, Budach W. Strahlentherapeutische Strategien für Sarkome im Erwachsenenalter. *Radiologe.* 62: 606-614, 1992.

- Budach W, Schiebe M, Schreck U, Belka C, Stüben G, Bamberg M . Fehlender Einfluß von p53-Mutationen auf die Strahlen und Chemosensitivität humaner Weichteilsarkome im experimentellen Modell. 4. Deutscher Kongreß für Radioonkologie, Strahlenbiologie und medizinische Physik. 59, 1998.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 282: 1497-1501, 1998.
- Busse PM, Bose SK, Jones RW, Tolmach LJ. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. *Radiat Res*. 76: 292-307, 1978.
- Cabral F, Abraham I, Gottesman MM. Isolation of a taxol-resistant Chinese hamster ovary cell mutant that has an alteration in alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 4388-4391, 1981.
- Casper ES, Waltzman RJ, Schwartz GK, Sugarman A, Pfister D, Ilson D, Woodruff J, Leung D, Bertino JR. A phase II trial of paclitaxel in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer Invest*. 16: 442-446, 1998.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 16: 395-419, 1998.
- Choy H, Rodriguez FF, Koester S, Hilsenbeck S, Von Hoff DD. Investigation of taxol as a potential radiation sensitizer. *Cancer*. 71: 3774-3778, 1993.
- Cirielli C, Riccioni T, Yang C, Pili R, Gloe T, Chang J, Inyaku K, Passaniti A, Caprogrossi MC. Adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 results in melanoma cell apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 63: 673-679, 1995.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 362: 849-852, 1993.
- Cohen MH, Schoenfeld D, Wolter J. Randomized trial of chlorpromazine, caffeine, and methyl-CCNU in disseminated melanoma. *Cancer Treat Rep*. 64: 151-153, 1980.
- Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J*. 286: 331-334, 1992.
- Cohen-Jonathan E, Toulas C, Monteil S, Couderc B, Maret A, Bard JJ, Prats H, Daly-Schveitzer N, Favre G. Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res*. 57: 1364-1370, 1997.
- Coindre JM, Terrier P, Bui NB, Bonichon F, Collin F, Le Doussal V, Mandard AM, Vilain MO, Jacquemier J, Duplay H, Sastre X, Barlier C, Henry-Amar M, Mace-Lesech J, Contesso G. Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J Clin Oncol*. 14: 869-877, 1996.
- Coleman CN. Modulating the Radiation Response. *Oncologist*. 1: 227-231, 1996.
- Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, Naccarato AG, Passoni A, Gardin G, Roncella M, Evangelista G, Bevilacqua G, Conte PF. Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumour regression and biological markers. *Eur J Cancer*. 34: 1701-1704, 1998.

- Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol.* 61: 451-453, 1992.
- Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva M, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen, J Brennan MF, Levine A. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 54: 794-799, 1994.
- Crompton NE, Hain J, Jaussi R, Burkart W. Staurosporin- and radiation-induced G2-phase cell cycle blocks are equally released by caffeine. *Radiat Res.* 135: 372-379, 1993.
- Cuende E, Ales-Martinez JE, Ding L, Gonzalez-Garcia M, Martinez C, Nunez G. Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J.* 12: 1555-1560, 1993.
- Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 21: 88-101, 1997.
- Dahlberg WK, Little JB, Fletcher JA, Suit HD, Okunieff P. Radiosensitivity in vitro of human soft tissue sarcoma cell lines and skin fibroblasts derived from the same patients. *Int J Radiat Biol.* 63: 191-198, 1993.
- Debernardis D, Sire EG, De Feudis P, Vikhanskaya F, Valenti M, Russo P, Parodi S, D'Incalci M, Brogginini M. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. *Cancer Res.* 57: 870-874, 1997.
- Delia D, Goi K, Mizutani S, Yamada T, Aiello A, Fontanella E, Lamorte G, Iwata S, Ishioka C, Krajewski S, Reed JC, Pierotti MA. Dissociation between cell cycle arrest and apoptosis can occur in Li-Fraumeni cells heterozygous for p53 gene mutations. *Oncogene.* 14: 2137-2147, 1997.
- DiBiase SJ, Guan J, Curran WJ Jr, Iliakis G. Repair of DNA double-strand breaks and radiosensitivity to killing in an isogenic group of p53 mutant cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 45: 743-751, 1999.
- DiLeonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8: 2540-2551, 1994.
- Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol.* 10: 5772-5781, 1990.
- Dittmann KH, Gueven N, Mayer C, Ohneseit P, Zell R, Begg AC, Rodemann HP. The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts. *Radiat Res.* 150: 648-655, 1998.
- Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, Castle VP. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res.* 54: 3253-3259, 1994.
- Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta.* 1155: 181-205, 1993.
- Efferth T, Fabry U, Glatte P, Osieka R. Expression of apoptosis-related oncoproteins and modulation of apoptosis by caffeine in human leukemic cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 121: 648-656, 1995.
- Ehmann UK, Gehring U, Tomkins GM. Caffeine, cyclic AMP and postreplication repair of mammalian cell DNA. *Biochim Biophys Acta.* 447: 133-138, 1976.

- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parson R, Trent GM, Lin D, Merker WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF-1 a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75: 817-825, 1993.
- Enzinger FM, Weiss SW. *Soft Tissue Tumors*. 3. Aufl. St. Louis Missouri, Mosby 1995.
- Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E. Apoptosis and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 825-834, 1995.
- Falkvoll KH. The occurrence of apoptosis, abnormal mitoses, cells dying in mitosis and micronuclei in a human melanoma xenograft exposed to single dosis irradiation. *Strahlentherapie und Onkologie*. 166: 487-492, 1990.
- Fan S, Cherney B, Reinhold W, Rucker K, O'Connor PM. Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment. *Clin Cancer Res*. 4: 1047-1054, 1998.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759-767, 1990.
- Fingert HJ, Chang JD, Pardee AB. Cytotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. *Cancer Res*. 46: 2463-2467, 1986.
- Freshney RI. *Culture of animals cells. A manual of basic Techniques*, 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1994.
- Fukunaga-Johnson N, Ryan JJ, Wicha M, Nunez G, Clarke MF. Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and -independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis*. 16: 1761-1767, 1995.
- Gallardo D, Drazan KE, McBride WH. Adenovirus-based transfer of wild-type p53 gene increases ovarian tumor radiosensitivity. *Cancer Research*. 56: 4891-4893, 1996.
- Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science*. 258: 302-304, 1992.
- Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 14: 831-838, 1988.
- George KC, Hebbar SA, Kale SP, Kesavan PC. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of gamma-irradiation. *J Radiol Prot*. 19: 171-176, 1999.
- Giaccia AJ, Schwartz J, Shieh J, Brown JM. The use of asymmetric-field inversion gel electrophoresis to predict tumor cell radiosensitivity. *Radiother Oncol*. 24: 231-238, 1992.
- Geard CR, Jones JM. Radiation and taxol effects on synchronized human cervical carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 29: 565-569, 1994.
- Giaccia AJ, Kastan, MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes and Development*. 12: 2973-2983, 1998.
- Gian VG, Johnson TJ, Marsh RW, Schuhmacher C, Lynch JW. A phase II trial of paclitaxel in the treatment of recurrent or metastatic soft tissue sarcomas or bone sarcomas. *J Exp Ther Oncol*. 1: 186-190, 1996.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 51: 1417-1423, 1973.

- Gorczyca W, Tuziak T, Kram A, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Detection of apoptosis-associated DNA strand breaks in fine-needle aspiration biopsies by in situ end labeling of fragmented DNA. *Cytometry*. 15: 169-175, 1994.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 379: 88-91, 1996.
- Guillouf C, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacci E, Hoffmann B, and Liebermann DA: p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. 10: 2263-2270, 1995.
- Guillouf C, Rosselli F, Sjin RT, Moustacchi E, Hoffman B, Liebermann DA. Role of a mutant p53 protein in apoptosis: characterization of a function independent of transcriptional trans-activation. *Int J Oncol*. 13: 107-114, 1998.
- Guo M, Chen C, Vidair C, Marino S, Dewey WC, Ling CC. Characterization of radiation-induced apoptosis in rodent cell lines. *Radiat Res*. 147: 295-303, 1997.
- Gururajanna B, Al-Katib AA, Li YW, Aranha O, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Molecular effects of taxol and caffeine on pancreatic cancer cells. *Int J Mol Med*. 4: 501-507, 1999.
- Hain J, Crompton NE, Burkart W, Jaussi R. Caffeine release of radiation-induced S and G2 phase arrest in V79 hamster cells: increase of histone messenger RNA levels and p34(cdc2) activation. *Cancer Res*. 53: 1507-1510, 1993.
- Haldar S, Basu A, Croce CM. Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res*. 58: 1609-1615, 1998.
- Hall EJ, Marchese M, Hei TK, Zaider M. Radiation response characteristics of human cells in vitro. *Radiat Res*. 114: 415-424, 1988.
- Hallahan DE. Radiation-Mediated Gene Expression in the Pathogenesis of the Clinical Radiation Response. *Semin Radiat Oncol*. 6: 250-267, 1996.
- Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y. Bax and Bcl-2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 124: 503-510, 1998.
- Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl J Med*. 329: 1318-1327, 1993.
- Harrison D. Counting apoptosis - why and how. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 49: 245-246, 1996.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Oren M. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev*. 9: 2170-2183, 1995.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 387: 296-299, 1997a.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Kazaz A, Vousden K, Oren M. p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia*. 11: 337-339, 1997b.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-dependent inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*. 1: 1-8, 1997.
- Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Protein, Nucleotide Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348: 334-336, 1990.
- Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 6961-6965, 1991.

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science*. 253: 49-53, 1991.
- Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 85: 532-540, 1995.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 420: 25-27, 1997.
- Hong JH, Gatti RA, Huo YK, Chiang CS, McBride WH. G2/M-phase arrest and release in ataxia telangiectasia and normal cells after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*. 140: 17-23, 1994.
- Horwitz SB, Lothstein L, Manfredi JJ, Mellado W, Parness J, Roy SN, Schiff PB, Sorbara L, Zeheb R. Taxol: mechanisms of action and resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 466: 733-744, 1986.
- Huang H, Li CY, Little JB. Abrogation of P53 function by transfection of HPV16 E6 gene does not enhance resistance of human tumour cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 70: 151-160, 1996.
- Huang MT, Xie JG, Wang ZY, Ho CT, Lou YR, Wang CX, Hard GC, Conney AH. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Cancer Res*. 57: 2623-2629, 1997.
- Higuchi K, Mitsuhashi N, Saitoh J, Maebayashi K, Sakurai H, Akimoto T, Niibe H. Caffeine enhanced radiosensitivity of rat tumor cells with a mutant-type p53 by inducing apoptosis in a p53-independent manner. *Cancer Lett* 152:157-162, 2000.
- Huizing MT, Giaccone G, van Warmerdam LJ, Rosing H, Bakker PJ, Vermorken JB, Postmus PE, van Zandwijk N, Koolen MG, ten Bokkel Huinink WW, van der Vijgh WJ, Bierhorst FJ, Lai A, Dalesio O, Pinedo HM, Veenhof CH, Beijnen JH. Pharmacokinetics of paclitaxel and carboplatin in a dose-escalating and dose-sequencing study in patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 15: 317-329, 1997.
- Ibrado AM, Liu L, Bhalla K. Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*. 57: 1109-1115, 1997.
- Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 2147-2152, 1999.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 320: 84-85, 1986.
- Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmüller L, Grosse F, Deppert W. Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol*. 19: 2155-2168, 1999.
- Jung M, Kern FG, Jorgensen TJ, McLeskey SW, Blair OC, Dritschilo A. Fibroblast growth factor-4 enhanced G2 arrest and cell survival following ionizing radiation. *Cancer Res*. 54: 5194-51947, 1994.
- Jung H. [Mammography and radiation risk]. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr*. 169: 336-343, 1998.
- Kastan MB, Onyekwere D, Sridansky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 51: 6304-6311, 1991.

- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 71: 587-597, 1992.
- Kastan MB, Kuerbitz SJ. Control of G1 arrest after DNA damage. *Environ. Health Perspect.* 101: 55-58, 1993.
- Katenkamp D, Stiller D. *Weichgewebstumoren*, 1. Aufl, Leipzig JA Barth. 11-20, 1990.
- Kaufmann WK, Levedakou EN, Grady HL, Paules RS, Stein GH. Attenuation of G2 checkpoint function precedes human cell immortalization. *Cancer Res.* 55: 7-11, 1995.
- Kelsen D, Hudis C, Niedzwiecki D, Dougherty J, Casper E, Botet J, Vinciguerra V, Rosenbluth R. A phase III comparison trial of streptozotocin, mitomycin, and 5-fluorouracil with cisplatin, cytosine arabinoside, and caffeine in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Cancer*. 68: 965-969, 1991.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-257, 1972.
- Kerr JFR, Harmon BV. Apoptosis: the molecular basis of cell death. *Cancer*. 73: 2013-2026, 1993.
- Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, Yoo GH, Lee DJ, Forastiere AA, Sidransky D. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 88: 1580-1586, 1996.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84: 1415-1420, 1994.
- Kurdoglu B, Cheong N, Guan J, Corn BW, Curran WJ Jr, Iliakis G. Apoptosis as a predictor of paclitaxel-induced radiosensitization in human tumor cell lines. *Clin Cancer Res.* 5: 2580-2587, 1999.
- Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*. 80: 879-886, 1992.
- Kroemer G. The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol.* 58: 211-296, 1995.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 387: 299-303, 1997.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 7491-7495, 1992.
- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 278: 261-263, 1979.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358: 15-16, 1992.
- Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 53: 2231-2234, 1993.
- Lee JM, Bernstein A. p53 mutations and increase radioresistance to ionizing radiation. *Proc Nat Acad Sci USA.* 90: 5742-5746, 1993.
- Lee S, Elonbaas B, Levine AJ, Griffith J. p53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion /deletion mismatches. *Cell*. 81: 1013-1020, 1995.

- Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203-214, 1991.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature.* 351: 453-456, 1991.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88: 323-331, 1997.
- Liebmann J, Cook JA, Fisher J, Teague D, Mitchell JB. In vitro studies of Taxol as a radiation sensitizer in human tumor cells *J Natl Canc Inst.* 86: 441-446, 1994.
- Lindl T, Bauer J. *Zell und Gewebekultur*, 3. Auflage, G. Fischer Verlag Stuttgart-New York, 1994.
- Ling YH, Zou Y, Perez-Soler R. Induction of senescence-like phenotype and loss of paclitaxel sensitivity after wild-type p53 gene transfection of p53-null human non-small cell lung cancer H358 cells. *Anticancer Res.* 20: 693-702, 2000.
- Link CJ Jr, Evans MK, Cook JA, Muldoon R, Stevnsner T, Bohr VA. Caffeine inhibits gene specific repair of UV-induced DNA damage in hamster cells and in human xeroderma pigmentosum group C cells. *Carcinogenesis.* 16: 1149-1155, 1995.
- Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 17: 43-52, 1979.
- Liu TJ, El-Naggar AK, McDonnell TJ, Steck KD, Wang M, Taylor DL, Clayman GL. Apoptosis induction mediated by wildtype p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 55: 3117-3122, 1995.
- Lock RB, Ross WE. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 50: 3761-3766, 1990.
- Lotem J, Sachs L. Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Diff.* 4: 41-47, 1993.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 362: 847-849, 1993.
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 266: 807-810, 1994.
- Maity A, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 37: 639-653, 1997.
- Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in non-transformed mouse cells. *Mol Cell Biol.* 4: 1689-1694, 1984.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182: 1545-1556, 1995.
- Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 7716-7719, 1987.
- McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC Jr, Gardner MB. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer.* 24: 520-526, 1969.

- McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 130-134, 1986.
- McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res.* 54: 3718-3722, 1994.
- McKenna WG, Iliakis G, Weiss MC, Bernhard EJ, Muschel RJ. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res.* 125: 283-287, 1991.
- McKenna WG, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A, Muschel RJ. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts: influence of H-ras on G2 delay. *Oncogene.* 12: 237-245, 1996.
- Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 6166-6170, 1990.
- Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelia from p53-null mice: evidence for delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene.* 14: 2759-2766, 1997.
- Meye A, Bache M, Hinze R, Schmidt H, Würfl P, Holzhausen H-J, Rath F-W, Taubert H. Molecular characterization and liposomal transfection of a p53-mutated cell line established from a poorly differentiated leiomyosarcoma. *Int J Oncol.* 13: 241-248, 1998.
- Meye A. Molekulare Charakterisierung (p53, p16INK4A, mdm2) humaner Weichteilsarkome und Etablierung von nichtviralen DNA-Transfektions- und Therapiestrategien in vitro. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, MLU Halle-Wittenberg, 1999.
- Meye A, Würfl P, Bache M, Bartel F, Grünbaum U, Mansa-ard J, Schmidt H, Taubert H. Colony formation of soft tissue sarcoma cells is inhibited by lipid-mediated antisense oligodeoxynucleotides targeting the human mdm2 oncogene. *Cancer Lett.* 149: 181-188, 2000.
- Meyn RE, Stephens LC, Kian Ang K, Hunter NR, Brock WA, Milas L, Peters LJ. Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumors of different histologies. *Int J Radiat Biol.* 64: 583-591, 1993a.
- Meyn RE, Stephens LC, Voehringer DW, Story MD, Mirkovic N, Milas L. Biochemical modulation of radiation-induced apoptosis in murine lymphoma cells. *Radiat Res.* 136: 327-334, 1993b.
- Michalovitz D, Halevy O, Oren M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by temperature-sensitive mutant of p53. *Cell.* 62: 671-680, 1990.
- Milas L, Hunter NR, Mason KA, Milross CG, Saito Y, Peters LJ. Role of reoxygenation in induction of enhancement of tumor radioresponse by paclitaxel. *Cancer Res.* 55: 3564-3568, 1995a.
- Milas L, Hunter N, Mason KA, Milross C, Peters LJ. Tumor reoxygenation as a mechanism of taxol-induced enhancement of tumor radioresponse. *Acta Oncol.* 34: 409-412, 1995b.
- Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature.* 319: 783-784, 1986.
- Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L. Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst.* 88: 1308-1314, 1996.

- Miyakoshi J, Yamagishi N, Ohtsu S, Takebe H. Changes in radiation sensitivity of human osteosarcoma cells after p53 introduction. *Jpn J Cancer Res.* 86: 711-713, 1995.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of human bax gene. *Cell.* 80: 293-299, 1995.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation. *Cell.* 69: 1237-1245, 1992.
- Muschel RJ, Zhang HB, Iliakis G, McKenna WG. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res.* 51: 5113-5117, 1991.
- Musk SR, Steel GG. Override of the radiation induced mitotic block in human tumour cells by methylxanthines and its relationship to the potentiation of cytotoxicity. *Int J Radiat Biol.* 57: 1105-1112, 1990.
- Nagasawa H, Keng P, Harley R, Dahlberg W, Little JB. Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 66: 373-379, 1994.
- Nakayama T, Toguchida J, Wadayama B, Kanoe H, Kotoura Y, Sasaki MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. *Int J Cancer.* 64: 342-346, 1995.
- Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Ann Rev Biochem.* 61: 441-470, 1992.
- Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 344: 503-508, 1990.
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679-3684, 1993.
- O'Connor PM, Jackman J, Jondle D, Bhatia K, Magrath I, Kohn KW. Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res.* 53: 4776-4780, 1993.
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I. Characterization of the p53 tumorsuppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57: 4285-4300, 1997.
- O'Connor PM. Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv.* 29: 151-182, 1997.
- Okaichi K, Wang LH, Ihara M, Okumura Y. Sensitivity to ionizing radiation in Saos-2 cells transfected with mutant p53 genes depends on the mutation position. *J Radiat Res.* 39: 111-118, 1998.
- Okaichi K, Wang LH, Sasaki J, Saya H, Tada M, Okumura Y. A point mutation of human p53, which was not detected as a mutation by a yeast functional assay, led to apoptosis but not p21Waf1/Cip1/Sdi1 expression in response to ionizing radiation in a human osteosarcoma cell line, Saos-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 45: 975-980, 1999.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 358: 80-83, 1992.

- Palayoor ST, Humm JL, Atcher RW, Hines JJ, Macklis RM. G2M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to 212Bi alpha particle irradiation. *Nucl Med Biol.* 20: 795-805, 1993.
- Palayoor ST, Macklis RM, Bump EA, Coleman CN. Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat Res.* 141: 235-243, 1995.
- Parshad R, Price FM, Pirolo KF, Chang EH, Sanford KK. Cytogenetic response to G2-phase X irradiation in relation to DNA repair and radiosensitivity in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Radiat Res.* 136: 236-240, 1993.
- Paules RS, Levedakou EN, Wilson SJ, Innes CL, Rhodes N, Tlsty TD, Galloway DA, Donehower LA, Tainsky MA, Kaufmann WK. Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes. *Cancer Res.* 55: 1763-1773, 1995.
- Peled A, Schwartz D, Elkind NB, Wolkowicz R, Li R, Rotter V. The role of p53 in the induction of polyploidy of myelomonocytic leukemic M1/2 cells. *Oncogene.* 13: 1677-1685, 1996.
- Pines J, Hunter T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell.* 58: 833-846, 1989.
- Pollock RE, Lang A, El-Naggar AK, Radinsky R, Hung MC. Enhanced MDM2 oncoprotein expression in soft tissue sarcoma: several possible regulatory mechanisms. *Sarcoma.* 1: 23-29, 1997.
- Powell SN, DeFrank JS, Connell P, Eogan M, Preffer F, Dombkowski D, Tang W, Friend S. Differential sensitivity of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay. *Cancer Res.* 55: 1643-1648, 1995.
- Pulkkinen JO, Pekkola-Heino K, Grenman R. Paclitaxel and irradiation induce apoptosis in squamous cell carcinoma cell lines in an additive way. *Anticancer Res.* 16: 2923-2929, 1996.
- Quist S, Wang-Gohrke S, Köhler T, Möbus V, Kreienberg R, Runnebaum IB. Cooperative growth inhibition of ovarian cancer cells with p53 mutations by adenoviral p53 and paclitaxel/carboplatin (Poster). *J Cancer Res Clin Oncol.* 125: 81, 1999.
- Rakozy C, Grignon DJ, Sarkar FH, Sakr WA, Littrup P, Forman J. Expression of bcl-2, p53, and p21 in benign and malignant prostatic tissue before and after radiation therapy. *Mod Pathol.* 11: 892-899, 1998.
- Reed JC, Kitada S, Takayama S, Miyashita T. Regulation of chemoresistance by the bcl-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Ann Oncol.* 5: 61-65, 1994.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol.* 11: 68-75, 1999.
- Reinecke P, Knopf C, Schmitz M, Schneider EM, Gabbert HE, Gerharz CD. Growth inhibitory effects of paclitaxel on human epithelioid sarcoma in vitro: heterogeneity of response and the multidrug resistance phenotype. *Cancer.* 88: 1614-1622, 2000.
- Ribeiro JC, Barnetson AR, Jackson P, Ow K, Links M, Russell PJ. Caffeine-increased radiosensitivity is not dependent on a loss of G2/M arrest or apoptosis in bladder cancer cell lines. *Int J Radiat Biol.* 75: 481-492, 1999.
- Rodemann, HP Meyer, R, Kandolf, R. Strahleninduzierte Genterapie. *Der Onkologe.* 5: 910-914, 1999.

- Rosenthal DI, Sinard RJ, Okani O, Corak J, Kavanaugh D, Kamen B, Vuitch FM, Gazdar AF, Griener J, Frenkel EP, Carbone DP. Seven-week continuous-infusion paclitaxel with concurrent radiotherapy for locally advanced head and neck squamous cell cancer: a phase I study. *Semin Oncol.* 24: 19-71, 1997.
- Roth JA, Nguyen DD, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KMW, Putnam JB, Schea R, Shing DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han C-I, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukophadhay T, Cai D. Retrovirus-mediated Wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Med.* 2: 985-991, 1996.
- Roth W, Wagenknecht B, Grimm C, Dichgans J, Weller M. Taxol-mediated augmentation of CD95 ligand-induced apoptosis of human malignant glioma cells: association with bcl-2 phosphorylation but neither activation of p53 nor G2/M cell cycle arrest. *Br J Cancer.* 77: 404-411, 1998.
- Rowley R. Reduction of radiation induced G2 arrest by caffeine. *Radiation Res.* 129: 224-227, 1992.
- Rube C, Hampel G, Schuck A, Willich N. [Combined effect of Paclitaxel and ionizing radiation. Experimental data of in-vitro and in-vivo models]. *Strahlenther Onkol.* 172: 2-5, 1996.
- Ruiz de Almodovar JM, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ. A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol.* 65: 641-649, 1994.
- Ruka W, Taghian A, Gioioso D, Fletcher JA, Preffer F, Suit HD. Comparison between the in vitro intrinsic radiation sensitivity of human soft tissue sarcoma and breast cancer cell lines. *J Surg Oncol.* 61: 290-294, 1996.
- Russell KJ, Wiens LW, Demers GW, Galloway DA, Plon SE, Groudine M. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitivation of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res.* 55: 1639-1642, 1995.
- Ryan JJ, Danish R, Gottlieb CA, Clarke MF. Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol.* 13: 711-719, 1993.
- Sak A, Stuschke M, Wurm R, Wolf G, Sinn B, Ketel B, Berg A, Budach V. Strahlen-induzierte Apoptose und Einfluß von AS-ODN gegen p53 3. Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology. Poster, 1999.
- Sandler A, Fox S, Meyers T, Rougraff B. Paclitaxel (Taxol) plus doxorubicin plus filgrastim in advanced sarcoma: a phase II study. *Am J Clin Oncol.* 21: 241-245, 1998.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 277: 665-667, 1979.
- Schütte J, Stuschke M, Seeber S. Weichteilsarkome. In: *Therapiekonzepte Onkologie*, 2. Auflage Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1995.
- Schwartz JL. The role of constitutive and inducible processes in the response of human squamous cell carcinoma cell lines to ionizing radiation. *Radiat Res.* 138: 37-39, 1994.
- Schwartz JL, Cowan J, Grdina DJ, Weichselbaum RR. Attenuation of G2-phase cell cycle checkpoint control is associated with increased frequencies of unrejoined chromosome breaks in human tumor cells. *Radiat Res.* 146: 139-143, 1996a.

- Schwartz JL, Mustafi R, Beckett MA, Weichselbaum RR. DNA double-strand break rejoining rates, inherent radiation sensitivity and human tumour response to radiotherapy. *Br J Cancer*. 74: 37-42, 1996b.
- Schwartz D, Almog N, Peled A, Goldfinger N, Rotter V. Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the gamma-irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene*. 15: 2597-2607, 1997.
- Servomaa K, Kiuru A, Grenman R, Pekkola-Heino K, Pulkkinen JO, Rytomaa T. P53 mutations with increased sensitivity to ionizing radiation in human head and neck cancer cell lines. *Cell Proliferation*. 29: 219-230, 1996.
- Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science*. 263: 1143-1145, 1994.
- Shinomiya N, Takemura T, Iwamoto K, Rokutanda M. Caffeine induces S-phase apoptosis in cis-diamminedichloroplatinum-treated cells, whereas cis-diamminedichloroplatinum induces a block in G2/M. *Cytometry*. 27: 365-373, 1997.
- Shiu MH, Hilaris BS, Harrison LB, Brennan MF. Brachytherapy and function-saving resection of soft tissue sarcoma arising in the limb. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 21: 1485-1492, 1991.
- Siles E, Villalobos M, Valenzuela MT, Nunez MI, Gordon A, McMillan TJ, Pedraza V, Ruiz de Almodovar JM. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br J Cancer*. 73: 581-588, 1996.
- Sinclair WK. Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat Res*. 33: 620-643, 1968.
- Skladanowski A, Larsen AK. Expression of wild-type p53 increases etoposide cytotoxicity in M1 myeloid leukemia cells by facilitated G2 to M Transition: Implications for gene therapy. *Cancer Res*. 57: 818-823, 1997.
- Slater JD, McNeese MD, Peters LJ. Radiation therapy for unresectable soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 12: 1729-1734, 1986.
- Slichenmyer WJ, Nelson WG, Slebos RJ, Kastan MB. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res*. 55: 4164-4168, 1993.
- Smeets MF, Mooren EH, Begg AC. The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother Oncol*. 33: 217-227, 1994a.
- Smeets MF, Mooren EH, Abdel-Wahab AH, Bartelink H, Begg AC. Differential repair of radiation-induced DNA-damage in cells of squamous cell carcinoma and the effect of caffeine and cysteamine on the induction and repair of DNA double strand breaks. *Radiation Res*. 140: 153-160, 1994b.
- Smith-Sørensen B, Kaern J, Holm R, Dorum A, Trope C, Borresen-Dale AL. Therapy effect of either paclitaxel or cyclophosphamide combination treatment in patients with epithelial ovarian cancer and relation to TP53 gene status. *Br J Cancer*. 78: 375-381, 1998.
- Soldatenkov VA, Prasad S, Notario V, Dritschilo A. Radiation-induced apoptosis of Ewing's sarcoma cells: DNA fragmentation and poly (ADP-ribose) polymerase. *Cancer Res*. 55: 4240-4242, 1995.
- Stapper NJ, Stuschke M, Sak A, Stüben G: Radiation-induced apoptosis in human sarcoma and glioma cell lines. *Int J Cancer*. 62: 58-62, 1995.
- Steinberg L, Hassan M, Olmsted L, Sharan V, Stepnick D, Hoppel C, Mugharbil A, Subramanyan S, McGloin B, Mackay W, Strauss M. A phase I trial of radiotherapy

and simultaneous 24-hour paclitaxel in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinomas. *Seminars Oncol.* 24: 19-56, 1997.

- Stephens LC, Kian A, Schultheiss TE, Milas L, Meyn RE. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res.* 127: 308-316, 1991.
- Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, Milas L, Meyn RE. Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res.* 135: 75-80, 1993.
- Steren A, Sevin BU, Perras J, Angioli R, Nguyen H, Guerra L, Koechli O, Averette HE. Taxol sensitizes human ovarian cancer cells to radiation. *Gynecol Oncol.* 48: 252-258, 1993a.
- Steren A, Sevin BU, Perras J, Ramos R, Angioli R, Nguyen H, Koechli O, Averette HE. Taxol as a radiation sensitizer: a flow cytometric study. *Gynecol Oncol.* 50: 89-93, 1993b.
- Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene.* 10: 109-115, 1995.
- Strasser A, Harris AW, Jacks T, Cory S. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell.* 79: 329-339, 1994.
- Strasser A, Huang DC, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 1333: 151-178, 1997.
- Strasser-Wozak EM, Hartmann BL, Geley S, Sgonc R, Bock G, AJ Santos, Hattmannstorfer R, Wolf H, Pavelka M, Kofler R. Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic leukemia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression. *Cell Death Differ.* 5: 687-693, 1998.
- Stratton MR, Moss S, Warren W, Patterson H, Clark J, Fisher C, Fletcher CD, Ball A, Thomas M, Gusterson BA, Cooper CS. Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene.* 5: 1297-1301, 1990.
- Su LN, Little JB. Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfected with activated ras oncogene and/or simian virus 40 T-antigen. *Radiat Res.* 133: 73-79, 1993.
- Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, Gebhardt MC, Harmon DC, Rosenberg A, Tepper JE, Rosenthal D. Treatment of the patient stage M0 soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol.* 6: 854-862, 1988.
- Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB Jr, Richli WR, Savin M, Waugh MK. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 91: 763-771, 1999.
- Takagi M, Shigeta T, Asada M, Iwata S, Nakazawa S, Kanke Y, Ishimoto K, Mizutani S. DNA damage-associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. *Leukemia.* 13: 70-77, 1999.
- Taubert H, Würfl P, Meye A, Berger D, Thamm B, Neumann K, Hinze R, Schmidt H, Rath F-W. Molecular and immunohistochemical p53 status in liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *Cancer.* 76: 1187-1196, 1995.

- Taubert H, Meye A, Würfl P. Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res.* 56: 4134-4136, 1996.
- Taubert H, Schmidt H, Würfl P, Hinze R, Meye A, Bache M, Berger D, Holzhausen H-J, Rath F-W. Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivative clones. *Int J Oncol.* 11: 521-526, 1997.
- Taubert H, Meye A, Würfl P. Sarcomas and p53 mutations. *Mol Med* 4: 365-372, 1998a.
- Taubert H, Würfl P, Bache M, Meye A, Berger D, Holzhausen H-J, Hinze R, Schmidt H, Rath, F-W. The p53 gene in soft tissue sarcomas: prognostic value of DNA sequencing versus immunohistochemistry. *Anticancer Res.* 18: 183-188, 1998b.
- Taubert H. Molekularpathologische Untersuchungen von Tumorsuppressor- und Onkogenen in Weichteilsarkomen des Erwachsenen. Habilitationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, MLU Halle-Wittenberg, 1999.
- Tauchi H, Sawada S. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukaemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure. *Int J Radiat Biol.* 65: 449-455, 1994.
- Tepper JE, Suit HD. Radiation therapy alone for sarcoma of soft tissue. *Cancer.* 56: 475-479, 1985.
- Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Kostaki O, Derdas SP, Georgoulas V, Dargemont C, Georgatos SD. Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus. *Cancer Res.* 59: 4625-4633, 1999.
- Tishler RB, Geard CR, Hall EJ. Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res.* 52: 3495-3497, 1992.
- Tishler RB, Lamppu DM, Park S, Price BD. Microtubule-active drugs taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active p53. *Cancer Res.* 55: 6021-6025, 1995.
- Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res.* 58: 3620-3626, 1998.
- Tsuchiya H, Tomita K, Yamamoto N, Mori Y, Asada N. Caffeine-potentiated chemotherapy and conservative surgery for high-grade soft-tissue sarcoma. *Anticancer Res.* 18: 3651-3656, 1998.
- Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada N, Yamamoto N. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy. *Clin Orthop.* 358: 27-35, 1999.
- Tsuchiya H, Mori Y, Ueda Y, Okada G, Tomita K. Sensitization and caffeine potentiation of cisplatin cytotoxicity resulting from introduction of wild-type p53 gene in human osteosarcoma. *Anticancer Res.* 20: 235-242, 2000.
- Umansky SR. Apoptotic process in the radiation-induced death of lymphocytes. In: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 193-208, 1991.
- van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 24: 131-139, 1996.
- Vasey PA, Jones NA, Jenkins S, Dive C, Brown R. Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Mol Pharmacol.* 50: 1536-1540, 1996.
- Vaux DL, Aguila HL, Weissman IL. Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int Immunol.* 4: 821-824, 1992.

- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184: 39-51, 1995.
- Vidair CA, Chen CH, Ling CC, Dewey WC. Apoptosis induced by X-irradiation of rec-myc cells is postmitotic and not predicted by the time after irradiation or behavior of sister cells. *Cancer Res*. 56: 4116-4118, 1996.
- Vikhanskaya F, Vignati S, Beccaglia P, Ottoboni C, Russo P, D'Incalci M, Brogini M. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp Cell Res*. 241: 96-101, 1998.
- Villuendas R, Piris MA, Orradre JL, Mollejo M, Rodriguez R, Morente M. Different bcl-2 protein expression in high-grade B-cell lymphomas derived from lymph node or mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*. 139: 989-993, 1991.
- Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Kotoura Y, Yamamuro T. P53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer*. 68: 1134-1139, 1993.
- Wahl A F, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FYF, Foster SA, Demers GW, Galloway DA. Loss of normal p53 function confers sensitization to taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature Medicine*. 2: 72-79, 1996.
- Wall ME, Wani MC. Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 55: 753-760, 1995.
- Weichselbaum RR, Beckett MA, Simon MA, McCauley C, Haraf D, Awan A, Samuels B, Nachman J, Dritschilo A. In vitro radiobiological parameters of human sarcoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 15: 937-942, 1988.
- Weichselbaum RR, Rotmensch J, Ahmed-Swan S, Beckett MA. Radiobiological characterization of 53 human tumor cell lines. *Int J Radiat Biol*. 56: 553-560, 1989.
- Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*. 49: 3713-3721, 1989.
- Williams AC, Miller JC, Collard TJ, Bracey TS, Cosulich S, Paraskeva C. Mutant p53 is not fully dominant over endogenous wild type p53 in a colorectal adenoma cell line as demonstrated by induction of MDM2 protein and retention of a p53 dependent G1 arrest after gamma irradiation. *Oncogene*. 11: 141-149, 1995.
- Winters ZE, Ongkeko WM, Harris AL, Norbury CJ. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene*. 17: 673-684, 1998.
- Withers HR. The four Rs of radiotherapy. In: Lett JT, Adler H. Hrsg. *Advances in radiation biology*. 5th edn. New York: Academic Press: 241-271, 1975.
- Wouters BG, Giaccia AJ, Denko NC, Brown JM. Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res*. 57: 4703-4706, 1997.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*. 7: 1126-1132, 1993.
- Würfl P, Taubert H, Bache M, Kroll J, Meye A, Berger D, Siermann A, Holzhausen HJ, Hinze R, Schmidt H, Rath F-W. Frequent occurrence of p53 mutations in rhabdomyosarcoma and leiomyosarcoma, but not in fibrosarcoma and malignant neural tumors. *Int J Cancer*. 69: 317-323, 1996.
- Würfl P, Meye A, Berger D, Bache M, Lautenschläger C, Schmidt H, Kalthoff H, Rath FW, Taubert H. Prognostic relevance of C-terminal Mdm2 detection is

- enhanced by p53 positivity in soft tissue sarcomas. *Diagn Mol Pathol*. 6: 249-254, 1997a.
- Würfl P, Taubert H, Meye A, Berger D, Lautenschläger C, Holzhausen H-J, Schmidt H, Kalthoff H, Rath F-W, Dralle H. Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft tissue sarcomas: a multivariate analysis of five antibodies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 123: 502-508, 1997b.
  - Würfl P, Meye A, Schmidt H, Lautenschläger C, Kalthoff H, Rath F-W, Taubert H. High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene*. 16: 1183-1185, 1998a.
  - Würfl P. Evaluierung von Prognosefaktoren für Weichteilsarkome des Erwachsenen. Habilitationsschrift, Universität Leipzig, 1998b.
  - Wyllie AH. Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture): molecular regulation of cell death. *Br J cancer*. 67: 205-208, 1993.
  - Xia F, Wang YH, Tsang NM, Yandell DW, Kelsey KT, Liber HL. Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res*. 55: 12-15, 1995.
  - Yamagishi S, Fujimori H, Iwase T. Caffeine-assisted chemotherapy for colonic leiomyosarcoma. *Am J Gastroenterol*. 94: 1111-1113, 1999.
  - Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, Seito T. Radiation-induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumour cells; correlation between mitotic death and apoptosis. *Int J Radiat Biol*. 67: 677-685, 1995.
  - Yao SL, Akhtar AJ, McKenna KA, Bedi GC, Sidransky D, Malbry M, Ravi R, Collector MI, Jones RJ, Sharkis SJ, Fuchs EJ, Bedi A. Selective radiosensitivation of p53-deficient cells by caffeine-mediated activation of p34 cdc2 kinase. *Nature Med*. 2: 1140-1143, 1996.
  - Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ: Heterodimerization with Bax is required for Bcl-2 to repress cell death. *Curr-Top-Microbiol-Immunol*. 194: 331-338, 1995.
  - Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 352: 345-347, 1991.
  - Yonish-Rouach E. The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia*. 52: 1001-1007, 1996.
  - Yu Y, Li CY, Little JB. Abrogation of p53 function by HPV16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells. *Oncogene*. 14: 1661-1667, 1997.
  - Zaffaroni N, Orlandi L, Villa R, Bearzatto A, Rofstad EK, Silvestrini R. DNA double-strand break repair and radiation response in human tumour primary cultures. *Int J Radiat Biol*. 66: 279-288, 1994.
  - Zaffaroni N, Benini E, Gornati D, Bearzatto A, Silvestrini R. Lack of a correlation between p53 protein expression and radiation response in human tumor primary cultures. *Stem Cells*. 13: 77-85, 1995.
  - Zhang CC, Yang JM, White E, Murphy M, Levine A, Hait WN. The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells. *Oncogene*. 16: 1617-1624, 1998.
  - Zhang W, Bae I, Krishnaraju K, Azam N, Fan W, Smith K, Hoffman B, Liebermann DA. CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene*. 18: 4899-4907, 1999.

- Zhen W, Vaughan. AT Effect of caffeine on radiation-induced apoptosis in TK6 cells. *Radiat Res.* 141: 170-175, 1995.
- Zölzer F, Hillebrandt S, Streffer C. Radiation induced G1-block and p53 status in six human cell lines. *Radioth. Oncol.* 37: 20-28, 1995.

## Thesen

- Für Weichteilsarkome (WTS) gibt es bisher keine ausreichenden Kriterien für die molekulare Diagnostik, für eine individualisierbare effektive Therapie und die Prognose. Insbesondere der Einfluß von p53-Mutationen auf die Strahlentherapie ist für WTS bisher nur schlecht charakterisiert. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch für WTS, daß mutative Defekte des TSG p53 eine tumorbiologische Relevanz besitzen.
- Aus postoperativem Tumormaterial gelang das Etablieren von zwei WTS-Zelllinien (US 8-93 und LMS 6-93) mit einer heterozygoten p53-Mutation. In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden WTS-Zelllinien strahlenbiologisch charakterisiert. Zusätzlich wurden drei weitere humane ATCC-Sarkom-Zelllinien (A-204, RD und Saos-2) mit unterschiedlichem p53-Genstatus in (wt, mt, null) in diese Untersuchungen einbezogen.
- Mit der strahlenbiologischen Charakterisierung der fünf humanen Sarkom-Zelllinien soll der Einfluß des p53-Genstatus in humanen WTS-Zelllinien auf die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen untersucht werden. Dabei wird analysiert, ob sich Zusammenhänge zwischen Strahlensensitivität, G2/M-Zellzyklusarretierung, Apoptoseinduktion und p53-Genexpression aufzeigen lassen bzw. inwieweit eine Modulation der strahleninduzierten G2/M-Arretierung durch eine Koffein- bzw. Taxolbehandlung in den beiden selbst etablierten WTS-Zelllinien US-8-93 (mt-p53) und LMS 6-93 (mt-p53) zu einer erhöhten Strahlensensitivität führt.
- Im ersten Teil wurde der Einfluß der Strahlendosis auf das strahlenbiologische Verhalten in den beiden WTS-Zelllinien A-204 (wt-p53) und US 8-93 (mt-p53) untersucht. Die beiden Zelllinien wurden mit Strahlendosen zwischen 0,4 und 24,0 Gy bestrahlt und ihre Antwort anhand der Charakterisierung des Zellwachstums, des Zellzyklusverlaufes und der Zelltodrate (Apoptose und Nekrose) untersucht. Weiterhin wurde die Analyse der Apoptose mit unterschiedlichen Nachweisverfahren, wie dem DNS-Leiter-Assay, dem TUNEL-Assay, der DAPI-Färbung und dem Annexin-V-Test, durchgeführt.
- Für beide WTS-Zelllinien sind die strahlenbiologischen Effekte von der Zeit und der Strahlendosis abhängig. Während die Bestrahlung mit Strahlendosen von 0,4 und 2,0 Gy in beiden Zelllinien in einer Verzögerung des Zellwachstums und einer

schwachen Abnahme der Zellvitalität resultiert, führt die Bestrahlung mit Strahlendosen von 6,0; 12,0 Gy oder 24,0 Gy zum Verlust des Zellwachstums. Damit verbunden ist in beiden Zelllinien sowohl eine stärkere Abnahme der Zellvitalität als auch die Ausbildung eines strahleninduzierten G2/M-Arrests. Mit dem Austritt der Zellen aus der G2/M-Arretierung konnte in beiden WTS-Zelllinien die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden.

- Unterschiede zwischen den beiden WTS-Zelllinien zeigten sich sowohl bei der Ausprägung des G2/M-Blocks als auch im Zeitpunkt und im Ausmaß der Apoptoseinduktion. Insgesamt ist in der mt-p53 Zelllinie (US 8-93) ein mit zunehmender Dosis stärkerer G2/M-Arrest an eine niedrigere Zelltodrate gekoppelt, während in der wt-p53 Zelllinie (A-204) eine schwache Ausprägung des G2/M-Blocks mit einer erhöhten Apoptoserate korreliert. Die strahlenbiologischen Unterschiede der beiden Zelllinien lassen sich gut mit ihrem unterschiedlichen p53-Genstatus in Verbindung bringen.
- Eine gute Korrelation zwischen TUNEL-positiven Zellen und morphologischen Apoptosemerkmalen (DAPI-Analyse) konnte für die beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und A-204 (wt-p53) nachgewiesen werden. Ebenso wurde mit dem Annexin-V-Test vergleichbare Apoptoseraten detektiert.
- In beiden WTS-Zelllinien US 8-93 (mt-p53) und A-204 (wt-p53) konnte gezeigt werden, daß mit dem DNS-Leiter-Assay die Induktion der Apoptose nach einer Bestrahlung qualitativ und semiquantitativ bestimmbar ist.
- Im zweiten Arbeitsabschnitt wurde die strahlenbiologische Charakterisierung auf fünf humane Sarkom-Zelllinien ausgedehnt, um die Hypothese einer wt-p53 vermittelten Strahlenantwort in WTS zu überprüfen. Mit den Zelllinien LMS 6-93, SAOS-2 und RD wurden neben den beiden bereits untersuchten WTS-Zelllinien (US 8-93, A-204) drei weitere Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichen Veränderungen im p53-Gen analysiert. Zudem wurde für alle fünf Zelllinien die Strahlensensitivität mittels Zellkoloniebildungstest bestimmt und die strahleninduzierte Genexpression des TSG p53, von p53-Targetgenen (waf-1, mdm-2, bax) und weiteren Zellzyklus- bzw. Apoptose-regulierenden Proteinen (bcl-2, Cyklin-B und p34/<sup>CDC2</sup>) mittels Westernblotanalyse untersucht.
- Drei von vier Zelllinien mit einer p53-Mutation (US 8-93, LSM 6-93 und RD) weisen gegenüber der wt-p53 Zelllinie A-204 eine erhöhte Strahlenresistenz auf. Dagegen war die p53-null Zelllinie SAOS-2 sensitiv gegenüber einer Bestrahlung.

- Gemeinsam für alle untersuchten Sarkom-Zelllinien war ein G2/M-Block und eine relativ geringe Apoptoserate (<20 %) nach Bestrahlung. Unterschiede gab es jedoch bei der Ausprägung (Intensität und Dauer) des G2/M-Blocks, die indirekt mit der Apoptoserate korrelierte. Das heißt es existiert eine enge Kopplung zwischen dem Austritt der Zellen aus ihrer strahleninduzierten G2/M-Blockierung und der Induktion von Apoptose.
- In den fünf Sarkom-Zelllinien korreliert weder die Dauer des G2/M-Arrests noch das Ausmaß der Apoptoseinduktion statistisch signifikant mit den Parametern der Strahlensensitivität (SF2-Wert, D10-Wert). Ein Zusammenhang zwischen einer Apoptosefrequenz und der Strahlensensitivität liegt jedoch in den vier Sarkom-Zelllinien US 8-93, RD, A-204 und SAOS-2 vor ( $p=0,061$ ).
- Mittels Westernblotanalyse konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß nur in der wt-p53 Zelllinie A-204 eine Zunahme der P53-Expression nach Bestrahlung zu verzeichnen ist. Zudem erfolgt mit dem Anstieg von wt-p53 Protein ebenso eine Zunahme der Proteinexpression von waf-1/p21 und mdm-2, was auf eine transkriptionsaktivierende Wirkung von wt-p53 hinweist. In den vier Sarkom-Zelllinien mit p53-Gendefekt wird durch eine Bestrahlung weder die P53-Expression noch die Expression der beiden p53-Targetgene waf1/p21 und mdm-2 beeinflusst. Ein weiterer Hinweis für eine wt-p53 unabhängige Strahlenantwort ist der Befund, daß in keiner der fünf Sarkom-Zelllinien die Induktion der Apoptose durch die transkriptionelle Regulation von bcl-2 und bax erfolgt.
- In allen fünf Sarkom-Zelllinien korreliert mit dem strahleninduzierten G2/M-Block ein Anstieg der Expression von Cyklin-B und/oder von p34<sup>CDC2</sup>.
- Das Ergebnis, daß die Induktion von Apoptose bzw. die Ausbildung des G2/M-Arrest zum einen mit einer erhöhten wt-p53 Expression (Zelllinie A-204) verbunden ist, aber zum anderen auch ohne wt-p53 Expression (US 8-93, LMS 6-93, RD und SAOS-2) erfolgt, deutet auf die Induktion von p53-abhängigen und p53-unabhängigen Mechanismen hin.

- Im dritten Arbeitsabschnitt wurde die Möglichkeit getestet die strahleninduzierte G2/M-Blockierung in zwei WTS-Zelllinien mit mt-p53 (US 8-93 und LMS 6-93) mittels Taxolbehandlung zu verstärken bzw. durch Koffeinbehandlung aufzuheben, um Veränderungen im strahlenbiologischen Verhalten zu induzieren.
- Die beiden p53-mutierten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 sind sensitiv gegenüber einer Taxolbehandlung. Mit zunehmender Taxolkonzentration (1,0 bis 100 nM) arretieren die Zellen nach ca. 17 h zunehmend in der G2/M-Phase (bei 50 nM 70 bis 80 %). In beiden Zelllinien resultiert die Behandlung mit Taxoldosen, die einen vollständigen G2/M-Arrest auslösen, in einer hohen Zytotoxizität. Dabei sind während der Taxolinkubation mitotische Zellen bzw. nach der Taxolinkubation apoptotische Zellen zu beobachten.
- In keiner der beiden WTS-Zelllinien führt jedoch eine Taxolbehandlung mit subtoxischen Konzentrationen zu einer Sensitivierung gegenüber Bestrahlung.
- Insgesamt erscheint Taxol als ein geeigneter Kandidat, um eine verbesserte Tumorkontrolle zu erzielen, da durch eine Taxolbehandlung mit niedrigen Konzentrationen (3,0 bis 30,0 nM) in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 die Zellproliferation effizient gehemmt bzw. in Abhängigkeit von einem G2/M-Zellzyklusarrest Apoptose induziert wird.
- Eine zunehmende Koffeinkonzentration von 0,5 bis 5,0 mM führt in den beiden strahlenresistenten WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 zu einer deutlichen Wachstumsinhibierung. Weiterhin verhindert eine Koffeinbehandlung das Auftreten eines G2/M-Arrests nach Bestrahlung.
- Obgleich in keiner von beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 das Fehlen des strahleninduzierten G2/M-Blocks mit der Induktion von Apoptose korreliert, führt eine Koffeinbehandlung in beiden Zelllinien zu einer Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung (1,36 bis 4,61-fache).
- Insbesondere in der WTS-Zelllinie US 8-93 führen hohe Strahlendosen (8,0 bis 10,0 Gy) zu einer deutlichen Strahlensensitivierung (ca. 3,0 bis 4,6-fache). Dagegen ändert sich der Verstärkungseffekt in der Zelllinie LMS 6-93 in Abhängigkeit von der Strahlendosis nur geringfügig (ca. 1,6 bis 2,0-fache). Dieser Effekt scheint durch Unterschiede in der G2/M-Regulation bzw. in der DNS-Reparatur hervorgerufen zu werden.

- Mittels Westernblotanalyse konnte nachgewiesen werden, daß eine Koffeinbehandlung weder die P53-Expression noch die Protein-Expression der beiden p53-Targetgene waf-1/p21 und mdm2 beeinflusst, auch nicht in der wt-p53 Zelllinie (A-204). Diese Ergebnisse belegen, daß durch Koffein eine Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung unabhängig von einer wt-p53 Aktivierung erfolgt.
- Der strahleninduzierte G2/M-Arrest erscheint insbesondere in Zelllinien mit defekten p53-Gen als eine wichtige Determinante der Strahlensensitivität, da die Verhinderung (durch eine Koffeinbehandlung) in den beiden WTS-Zelllinien US 8-93 und LMS 6-93 die Effektivität einer anschließenden Bestrahlung erhöht.
- Insgesamt läßt sich feststellen, daß der p53-Genstatus, die G2/M-Arretierung und die Induktion von Apoptose nach einer Bestrahlung wesentliche Faktoren der Strahlensensitivität sind. Insbesondere durch den geeigneten Einsatz von Chemotherapeutika kann eine Kontrolle des lokalen Tumorwachstums bzw. eine Strahlensensitivierung in WTS-Zelllinien mit einem p53-Gendefekt erfolgen. Deshalb sind Koffein und Taxol geeignete Kandidaten, um Tumorzellen, welche die p53-abhängige Regulation der G1/S-Transition verloren haben, gegenüber einer Bestrahlung zu sensitiveren.

## Publikationsliste

### Originalpublikationen, chronologisch geordnet

- Würfl P, Taubert H, Bache M, Kroll J, Meye A, Berger D, Siermann A, Holzhausen H-J, Rath F-W (1996) Frequent occurrence of p53 mutations in rhabdomyosarcoma, but not in fibrosarcoma and malignant neural tumors. *Int J Cancer* 69: 317-23.
- Bache M, Würfl P, Dietzel M, Meye A, Fröde D, Schmidt H, Rath F-W, Wohlrab W, Dralle H, Dunst J, Taubert H (1997) Two human sarcoma cell lines with different p53 gene status in their response on radiation. *Int J Oncol* 11: 993-7.
- Taubert H, Schmidt H, Würfl P, Hinze R, Meye A, Bache M, Berger D, Holzhausen H-J, Rath F-W (1997). Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivative clones. *Int J Oncol* 11: 521-6.
- Würfl P, Meye A, Berger D, Bache M, Lautenschläger C, Schmidt H, Kalthoff H, Dralle H, Rath F-W, Taubert H (1997) Prognostic relevance of C-terminal MDM2 detection is enhanced by positivity in soft tissue sarcomas. *Diagn Mol Pathol* 6: 249-254.
- Meye A, Würfl P, Hinze R, Bache M, Berger D, Schmidt H, Rath F-W Taubert H (1998) No p16INK4A/CDKN2/MTS1 mutations independently of p53 status in soft tissue sarcomas. *J Pathol* 184: 14-7.
- Schmidt H, Körber S, Hinze R, Taubert H, Meye A, Würfl P, Bache M, Holzhausen H-J, Dralle H, Rath F-W (1998) Detection of numerical chromosomal changes in 20 malignant fibrous histiocytoma by FISH. *Int J Oncol* 12: 395-402.
- Taubert H, Würfl P, Bache M, Meye A, Berger D, Holzhausen H-J, Hinze R, Schmidt H, Rath F-W (1998) The p53 gene in soft tissue sarcomas: prognostic value of DNA sequencing versus immunohistochemistry. *Anticancer Res* 18:183-188.
- Taubert H, Berger D, Hinze R, Meye A, Bache M, Würfl P, Schmidt H, Rath F-W, Hogendoorn PCW (1998) How is the mutational status for tumor suppressors p53 and p16INK4A in MFH of the bone? *Cancer Letters* 123: 147-51.
- Würfl P, Meye A, Berger D, Lautenschläger C, Bache M, Holzhausen H-J, Schmidt H, Dralle H, Rath F-W, Taubert H (1998) Significance of Rb and Mdm2 expression as prognostic markers for soft tissue sarcoma. *Langenbecks Arch Chirug* 383: 99-103.
- Meye A, Bache M, Hinze R, Schmidt H, Würfl P, Holzhausen H-J, Rath F-W, Taubert H (1998) Molecular characterization and liposomal transfection of a p53-mutated cell line established from a poorly differentiated leiomyosarcoma. *Int J Oncol* 13: 241-8.
- Taubert H, Meye A, Bache M, Hinze R, Holzhausen H-J, Schmidt H, Würfl P (1998). p53 status in Radiation-induced soft tissue sarcomas. *Strahlenther Onkol* 174: 427-30.
- Bache M, Dunst J, Würfl P, Fröde D, Meye A, Schmidt H, Rath F-W, Taubert H (1999) G2/M checkpoint acts p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res* 19 :1827-1832
- Schmidt H, Würfl P, Taubert H, Meye A, Bache M, Holzhausen H-J, Hinze R (1999) Genomic imbalances of 7p and 17q in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors have a clinical relevance. *Genes Chrom Cancer* 25: 205-11.

- Würfl P, Meye A, Lautenschläger C, Schmidt H, Bache M, Kalthoff H, Schönfelder M, Rath F-W, Taubert H (1999) Clinical Relevance of pRb and p53 Co-Overexpression in Soft Tissue Sarcomas. Cancer Lett 139: 159-165.
- Taubert H, Koehler T, Meye A, Bartel F, Lautenschlager C, Borchert S, Bache M, Schmidt H, Würfl P. (2000) mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma. Mol Med. 6:50-59.
- Meye A, Würfl P, Bache M, Bartel F, Grünbaum U, Mansa-ard J, Schmidt H, Taubert H. (2000) Colony formation of soft tissue sarcoma cells is inhibited by lipid-mediated antisense oligodeoxynucleotides targeting the human mdm2 oncogene. Cancer Lett. 149:181-188.

#### Buchbeiträge, chronologisch geordnet

- Bache M, Taubert H, Würfl P, Meye A, Schmidt H, Rath F-W, Dunst J Strahlenbiologische Untersuchungen an fünf humanen Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status. Verh Dtsch Ges Pathol 82: 373-7, 1998.
- Taubert H, Würfl P, Meye A, Bache M, Kroll J, Lautenschlager C, Thamm B, Holzhausen HJ, Hinze R, Schmidt H, Berger D, Rath FW. [Frequency, distribution and prognostic relevance of p53 mutations in soft tissue sarcomas]. Verh Dtsch Ges Pathol. 82:340-4, 1998.
- Meye A, Würfl P, Lohn M, Lasch J, Bache M, Hinze R, Holzhausen HJ, Schmidt H, Rath FW, Taubert H. [Liposomal DNA transfection of human sarcoma cells with p53 alterations].Verh Dtsch Ges Pathol. 82:220-5, 1998.

#### Vorträge

- Bache M, Taubert H, Würfl P, Meye A, Schmidt H, Rath F-W, Dunst J (1998) p53 and radiosensitivity in five human sarcoma cell lines. 2. Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Ermatingen Schweiz, 21.6.1998
- Bache M, Taubert H, Würfl P, Meye A, Schmidt H, Berger D, Rath F.-W., Dunst J (1999) P53, mdm2 and waf1 expression after irradiation is dependent from the p53 gene status in human sarcoma cell lines. Essen, 04. 02.1999

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig, ohne fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen zitierten Literatur und Hilfsmittel verfaßt wurde. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen der von mir benutzten Werke wurden als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertationsschrift wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle/S., 01.Juli 2000

---

Matthias Bache

## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Jürgen Dunst (Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der MLU Halle-Wittenberg) und Herrn Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Rath (Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg) für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung der vorliegenden Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Helge Taubert (Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg) für die fachliche Betreuung meiner Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Hannelore Schmidt (Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg), Herrn PD Dr. Peter Würll (Chirurgische Klinik 1 der Universität Leipzig) und Herrn Dr. Axel Meye (Institut für Urologie der TU Dresden) danke ich für zahlreiche Anregungen und die konstruktive Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Weichteilsarkome für das angenehme Arbeitsklima und die zahlreichen fachlichen Diskussionen. Besonders möchte ich Frau Ute Rolle, Frau Claudia Vogel und Frau Monika Wolf für die umfassende Unterstützung meiner Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Uta Schramm, Herrn Dr. rer. nat. Dirk Fröde und Herrn Thomas Klapperstück aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie der MLU Halle-Wittenberg (Direktor Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Wohlrab) für die Unterstützung bei den flowcytometrischen Messungen bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie und des Institutes für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg für ihre Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Frau Uta Michel, Frau Uta Nauendorf, Frau Steffi Pigorsch, Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Gerlach und Herrn Axel Kiesler danken.

Neben der Teilnahme auf zahlreichen wissenschaftlichen Tagungen waren für mich die Arbeitsaufenthalte zum Erlernen von Methoden der Strahlenbiologie und Zellkultivierung ganz wesentlich. Für zahlreiche Anregungen und die fachliche Unterstützung möchte ich Frau PD Dr. Anna Wobus (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben), Herrn PD Dr. Gerhard Unteregger (Institut für Molekularbiologie, Zweibrücken), Herrn Dr. Michael Abend (Institut für Radiobiologie, München), Herrn Dr. Thomas Jung (GSF, München) und Dr. Claus Botzler (Institut für Klinische Hämatologie, Großhadern) danken.

Diese Arbeit wird seit April 1998 durch das Land Sachsen-Anhalt im Rahmen des Projektes „Tumorbiologie“ (FKZ: 2789A/0087H) gefördert.

## Tabellarischer Lebenslauf

Name : Matthias Bache  
Geburtsdatum : 05. August 1968  
Geburtsort : Wolfen  
Staatsangehörigkeit : BR Deutschland  
Familienstand : ledig

<u>Daten</u>	<u>Tätigkeit</u>	<u>Einrichtung</u>	<u>Anmerkungen</u>
09/75 - 08/85	Schulbesuch	Wilhelm-Pieck-Oberschule, Wolfen	Abschluß: 10. Klasse
09/85 - 08/87	Schulbesuch	Erweiterte Oberschule, Bernard Koenen Wolfen	Abschluß: 12. Klasse Hochschulreife
09/87 -10/87	Honorartätigkeit	ORWO Wolfen	Substrierer
11/87 - 01/90	Wehrdienst	Dienststellen:Weißkeißel, Neubrandenburg, Leipzig	
02/90 - 08/90	Honorartätigkeit	Krankenhaus Wolfen	Pflegerische Hilfskraft
09/90 - 09/95	Studium	MLU Halle-Wittenberg	Abschluß: Diplom
seit 09/1995	Beruf	Klinik für Strahlentherapie der MLU Halle-Wittenberg	Wissenschaftlicher Mitarbeiter

## Wissenschaftlicher Werdegang

09/90 - 09/95 Studium der Biochemie  
Diplomarbeit: Molekularbiologische Untersuchungen von p53 und N-ras  
an Weichteilsarkomen mit neurogenen Differenzierungsmerkmalen

09/95 Diplom für Biochemie

seit 09/95 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Strahlentherapie der  
MLU Halle-Wittenberg

09/95 Kurs: „Quantitative und qualitative Analyse der Apoptose“  
bei Dr. G. Unteregger, Institut für Molekularbiologie, Zweibrücken

04/96 Arbeitsaufenthalt bei Dr. T. Jung, GSF, München und Dr. M. Abend,  
Institut für Radiobiologie, München

09/96 Kurs: „Grundlagen der Säuger-Zellbiologie und der tierischen Zell-  
und Gewebekultur“ bei Dr. A. Wobus, Institut für Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung Gatersleben

- 11/96           Arbeitsaufenthalt bei Dr. G. Multhoff, Institut für Klinische Hämatologie  
Großhadern,
- 19.06.1997     Forschungsförderungspreis der MLU Halle-Wittenberg mit der  
Arbeitsgruppe „Weichteilsarkome“
- 20.9.1997      1. Posterpreis  
                  2. Tagung der Sektion für Chirurgische Forschung und der  
Arbeitsgemeinschaft für Molekulare Diagnostik und Therapie in der  
Chirurgie, Dresden  
Bache M, Taubert H, Würfl P, Fröde D, Meye A, Schmidt H, Rath F-W  
and Dunst J. Radiation induced G2/M block and apoptosis in two  
human sarcoma cell lines with different p53 gene status.
- seit 04/1998   Untersuchungen werden durch das Land Sachsen-Anhalt im Rahmen  
des Projektes „Tumorbiologie“ (FKZ: 2789A/0087H) gefördert.
- 09.11.1999     Hanns-Langendorffpreis-Preis für Strahlenbiologie  
                  5. Deutscher Kongreß für Radioonkologie, Strahlenbiologie und  
medizinische Physik in Karlsruhe  
Bache M, Dunst J, Würfl P, Meye M, Berger D, Schmidt H, Rath F-W  
und Taubert H: Modulation des G2/M-Arrestes in zwei humanen WTS-  
Zelllinien mit p53-Defekt.

Halle/S., 01. Juli 2000

---

Matthias Bache