

Effekte einer Neutronenexposition auf gesunde humane Brustzellen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Monique Zwar

geb. am 07.03.1987 in Ribnitz-Damgarten

aus Ahrenshagen-Daskow

Rostock, Dezember 2020

Gutachter:

Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schröder, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abt. Genetik

Prof. Dr. rer. nat. Fritz-Olaf Lehmann, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abt. Tierphysiologie

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Die vorliegende Arbeit wurde im Strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt und im Rahmen des EU-Projektes ANDANTE angefertigt. Das ANDANTE-Projekt mit dem Thema “Multidisciplinary evaluation of the cancer risk from neutrons relative to photons using stem cells and the induction of second malignant neoplasms following pediatric radiation therapy” wurde durch das Förderprogramm Euratom-FP7 (FK: 295970) finanziert und lief vom 01.01.2012 bis zum 31.12.2015. Ziel dieses Projektes war es, die biologische Wirksamkeit von Neutronen im Vergleich zu Photonen zur Beurteilung des Krebsrisikos und zum Zweck des Strahlenschutzes zu untersuchen.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

D. Juerß*, M. Zwar*, U. Giesen, R. Nolte, S. Kriesen, G. Baiocco, M. Puchalska, M.-J. van Goethem, K. Manda & G. Hildebrandt: Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells. *Radiation Oncology* (2017) 12(1):159. DOI 10.1186/s13014-017-0895-8.

(* equally contributors)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	10
1 Einleitung	12
1.1 Strahlentherapie in der Krebsbehandlung	13
1.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung auf humane Zellen	14
1.3 Photonen vs. Protonen – Chancen und Risiken	16
1.4 Sekundäre Neutronen als Risikofaktor der Protonentherapie	19
1.5 Humane Mammaepithelzellen als Modellsystem für die strahleninduzierte Karzinogenese	22
1.6 Zielstellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Zellkultivierung	26
2.2 Bestrahlungs-Setup	27
2.2.1 Photonenstrahlung	28
2.2.2 Neutronenstrahlung	30
2.3 Ablauf der Experimente	36
2.4 Validierung der humanen Mammaepithelzellen als Modellsystem	37
2.4.1 Sphärenassay	37
2.4.2 Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie	38
2.5 Biologische Wirksamkeit	39
2.5.1 Zellvitalität	39
2.5.2 Koloniebildungstest	40
2.5.3 γ H2AX-Assay zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen	41
2.6 Analyse von Genom, Transkriptom und Proteom	42

2.6.1	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) zur Analyse von Tumorsuppressorgenen	42
2.6.2	RT ² Profiler PCR-Array zur Analyse onkologisch relevanter Signalwege	44
2.6.3	Mikro-RNA-Analyse	44
2.6.4	Proteomanalyse	46
2.7	Materialien	48
3	Ergebnisse	54
3.1	Validierung der MCF10A-Zellen als Modellsystem	54
3.1.1	Sphärenbildung	55
3.1.2	Analyse von Oberflächenmarkern/Stammzellmarkern	58
3.2	Biologische Wirksamkeit der Neutronenstrahlung	61
3.2.1	Vitalität von Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung	61
3.2.2	Überlebensfraktionen	63
3.2.3	DNA-Doppelstrangbrüche	65
3.3	Analyse von Genom, Transkriptom und Proteom	67
3.3.1	Genomanalyse I – Expression von Tumorsuppressorgenen	67
3.3.2	Genomanalyse II – Untersuchung onkologisch-relevanter Signalwege	71
3.3.3	Transkriptomanalyse – Betrachtung regulierter Mikro-RNA	73
3.3.4	Proteomanalyse – Betrachtung regulierter Proteine	78
4	Diskussion	83
4.1	MCF10A – humane gesunde Brustgewebszellen als Modellsystem für eine strahleninduzierte Karzinogenese	83
4.2	Die biologische Wirksamkeit einer Neutronenexposition im Vergleich zur Photonenstrahlung	85
4.3	Beeinflussung der Genexpression sowie des Transkriptoms und Proteoms infolge von Neutronenstrahlungen	88
4.3.1	Verringerte Expression von Tumorsuppressorgenen	88

4.3.2	Beeinträchtigung der Zellzyklus-Signalwege.....	91
4.3.3	Regulierte Mikro-RNAs und Proteomveränderungen als Folge einer Neutronenexposition.....	94
5	Ausblick.....	97
	Literaturverzeichnis	I
	Anhang	A1
	Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 der Promotionsordnung	A6

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Hydrolyse von Wasser	15
Abbildung 2 – Eindringtiefe (Reichweite) von Photonen- und Protonenstrahlen.....	18
Abbildung 3 – Skizzierung einer therapeutischen Protonenbehandlung mit entstehender Neutronenstreustrahlung beim Erwachsenen und beim Kind	19
Abbildung 4 – Dosisverteilung von Photonen, Protonen und Neutronen	20
Abbildung 5 – Empfohlene Brustepithelzellhierarchie	23
Abbildung 6 – Zelllinie MCF10A als adhärente Kultur und als Sphären.....	24
Abbildung 7 – Bestrahlungsaufbau	28
Abbildung 8 – Photonenbestrahlung am Röntgentherapiegerät	29
Abbildung 9 – Bestrahlungsanlage in der PTB, Braunschweig	30
Abbildung 10 – Versuchsaufbau für die Neutronenexposition am KVI-CART	35
Abbildung 11 – Zeitliche Abfolge der Experimente und Bestrahlung	36
Abbildung 12 – Analyse der Oberflächenmarker anhand von durchflusszyto- metrischen Histogrammen.....	39
Abbildung 13 – Absolute Anzahl an gebildeten Sphären der MCF10A-Zellen 2-8 Tage nach Exposition mit mittleren Strahlendosen von 0,39 Gy bis 0,76 Gy	55
Abbildung 14 – Absolute Anzahl an gebildeten Sphären der MCF10A-Zellen 2-8 Tage nach Exposition mit höheren Strahlendosen von 0,82 Gy bis 1,52 Gy	57
Abbildung 15 – Fluoreszenzintensität EpCAM-exprimierender MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten	59
Abbildung 16 – Fluoreszenzintensität MUC-1-exprimierender MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten	60
Abbildung 17 – Vitalität der MCF10A-Zellen 24 Stunden nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten	62
Abbildung 18 – Klonogenes Überleben der MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten.	63
Abbildung 19 – DNA-Doppelstrangbrüche der MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten	65
Abbildung 20 – Expression des Gens <i>CDKN1B</i> 72 Stunden nach Bestrahlung	68
Abbildung 21 – Expression des Gens <i>TP53</i> 72 Stunden nach Bestrahlung	69
Abbildung 22 – Expression des Gens <i>RB1</i> 72 Stunden nach Bestrahlung.	70

Abbildung 23 – Regulation von Genen für tumorrelevante Signalwege als Ergebnis der Analyse der mit 0,56 MeV Neutronen bestrahlten Zellen	72
Abbildung 24 – Venn-Diagramme für miRNA	75
Abbildung 25 – HeatMap der 165 regulierten und sicher detektierten miRNA 48 Stunden nach Bestrahlung mit 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy	77
Abbildung 26 – HeatMap der 33 regulierten und sicher detektierten miRNA sieben Tage nach Bestrahlung mit 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy	78
Abbildung 27 – Proteinregulationen nach einer Bestrahlungsdosis von 0,43 Gy der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen	81
Abbildung 28 – Proteinregulationen nach einer Bestrahlungsdosis von 0,90 Gy der 0,565 MeV monoenergetischen Neutronen	82
Abbildung 29 – Zellzyklus mit Tumorsuppressoren	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Übersicht der Orte der Bestrahlung und der verwendeten Aufbauten ...	28
Tabelle 2 – Applizierte Dosen monoenergetischer Neutronen	32
Tabelle 3 – Aus den durchgeführten Bestrahlungen mit monoenergetischen Neutronen resultierende Durchschnittsdosen.....	33
Tabelle 4 – Parameter der Bestrahlungen am KVI-CART	35
Tabelle 5 – Ablauf des Programms zur Polymerase-Kettenreaktion	43
Tabelle 6 – Zellkulturmedium und Zusätze	48
Tabelle 7 – Chemikalien und Lösungen	48
Tabelle 8 – Kits und Assays	50
Tabelle 9 – Antikörper	51
Tabelle 10 – Verbrauchsmaterialien	51
Tabelle 11 – Geräte und Software	52
Tabelle 12 – α -Werte der LQ-Funktionen für die Überlebensfraktion und DNA-Doppelstrangbrüche nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten...	66
Tabelle 13 – Anzahl regulierter miRNA	74
Tabelle 14 – Anzahl regulierter Proteine	79
Tabelle 15 – RT ² -Profiler-Array zur Analyse tumorrelevanter Gene.....	A1
Tabelle 16 – Functional Gene Grouping des RT ² Profiler PCR Arrays <i>Human</i> <i>Cancer PathwayFinder</i>	A3

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	cyclic DNA (zyklische DNA; → DNA)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA damage and repair (DNA-Schäden und Reparatur; → DNA)
DFZ	Durchflusszytometrie
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (Modifiziertes Eagle Medium nach Dulbecco)
DMEM/F12	1:1 Dulbecco's modified eagle medium + Ham's F12
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline nach Dulbecco)
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
γH2AX	phosphorylierte Form (γ) des Protein X der Histonfamilie H2A
Gy	Gray (Einheit der Energiedosis)
IMRT	intensitätsmodulierte Radiotherapie
HDR	high dose rate (Hochdosisrate)
hEGF	Human epidermal growth factor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochdruck-Flüssig-chromatografie)
ICC	Immuncytochemie
ICRP	International Commision on Radiological Protection (Internationale Strahlenschutzkommission)
ICRU	International Commision on Radiation Units and Measurements (Internationale Kommission für Strahlungseinheiten und Messungen)
IR	ionising radiation (ionisierende Strahlung)

KBT	Koloniebildungstest
KERMA	kinetic energy released in matter (Bewegungsenergie in Materie)
KVI-CART	Kernfysisch Versneller Instituut - Center for Advanced Radiation Technology
LC-ESI-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Electrospray-Ionisation-Tandemmassenspektrometrie
LDR	low dose rate (Niedrigdosisrate)
LET	linearer Energietransfer
LQ-Modell	linear-quadratisches Modell
MCF10A	Zelllinie 10A der Michigan Cancer Foundation
MCP96	niedrigschmelzende Metalllegierung, Schmelzpunkt 96 °C
MeV	Megaelektronenvolt (10^6 eV, Einheit der Energie in der Kernphysik)
miR, miRNA	Mikro-RNA (→ RNA)
MV	Mega-Volt (Einheit der Spannung)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid-Hydrid
NCRP	National Council on Radiation Protection and Measurements (Nationales Konzil für Strahlenschutz und Messungen)
NHEJ	non-homologous end-joining (nichthomologe Endverknüpfung)
PBS	phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PHITS	Particle and Heavy Ion Transport code System (Monte-Carlo-Strahlentransportmodell für Partikel und schwere Ionen)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
PTW	Physikalisch-Technische Werkstätten
qRT-PCR	quantitative Real Time-PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
RBE	relative biological effectiveness (relative biologische Wirksamkeit)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPTC	Rinecker Proton Therapy Center
RT-qPCR	reverse Transkriptase-quantitative PCR

SF	surviving fraction (Überlebensfraktion)
SOBP	spread out bragg peak (Erweiterung/Ausdehnung des Bragg-Peaks)
STR	short tandem repeats (kurze Tandemwiederholungen in der DNA)
TSG	Tumorsuppressorgen/Tumorsuppressorgene
WST	water soluble tetrazolium (wasserlösliches Tetrazolium)

Zusammenfassung

Aufgrund der steigenden Zahl von Langzeitüberlebenden nach erfolgreicher Tumorthherapie, richtet sich der klinische Fokus in den letzten Jahren vermehrt auf die Spätfolgen der Therapie, so auch nach einer Strahlenbehandlung mit Protonen. Während einer Protonentherapie kommt es vermehrt zur Exposition gesunden Gewebes außerhalb des Zielgebietes mit sekundären Neutronen, die als sogenannte Streustrahlung auftritt. Das Risiko für die Entwicklung neuer Tumoren als Spätfolge (sekundäre maligne Neoplasien) könnte dadurch erhöht sein. Häufig betroffen ist das Brustgewebe. Bisher sind die tatsächlichen radiobiologischen Effekte dieser Neutronen auf gesundes Gewebe nicht ausreichend charakterisiert und sollten deshalb in dieser Arbeit näher betrachtet werden.

Als Modellsystem wurden MCF10A-Zellen, gesunde humane Mammaepithelzellen, genutzt und deren Strahlenantwort nach Exposition mit Neutronen mit der Reaktion nach Photonenbestrahlung verglichen. Dazu wurden die Zellen mit Neutronen verschiedener Energiespektren sowie Röntgenstrahlen (Photonen) mit Dosen von bis zu 2 Gy bestrahlt. Die biologischen Effekte von Neutronen mit einer breiten Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV), monoenergetischen Neutronen ($E_n = 1,2$ MeV; 0,56 MeV) und dem gemischten Feld von Gamma- und Sekundärneutronen ($\langle E_n \rangle = 70,5$ MeV), erzeugt durch die Streuung eines 190 MeV Protonenstrahls im Wasserphantom, wurden analysiert. Das klonogene Überleben und die DNA-Reparaturkapazität der Zellen wurden bestimmt und die relativen biologischen Wirksamkeiten der verschiedenen Strahlenarten verglichen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Strahlung auf die Kapazität der Sphärenformation der Zellen beobachtet und das Vorhandensein von Oberflächenmarkern bestimmt, um die Antwort der potentiellen Stammzellfraktion innerhalb der MCF10A-Zellpopulation zu untersuchen. Ein erster Einblick in die Auswirkungen von Strahlung auf das Genom, Transkriptom und Proteom der untersuchten Zellen konnte mittels massenspektrometrischer Methoden und PCR-Analysen gewonnen werden.

Neutronenstrahlung sowie auch die zum Vergleich betrachtete Röntgenstrahlung verursachten eine dosisabhängige Reduktion des Überlebens (nach Bestrahlungen mit Dosen bis zu 2 Gy). Monoenergetische Neutronen mit einer Energie von $E_n = 0,56$ MeV hatten eine höhere Wirksamkeit auf das Überleben der Zellen als

Neutronen mit höheren Energien ($E_n = 1,2 \text{ MeV}$, $\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$) und das sekundäre Neutronenfeld (+35% γ -Strahlung). Ähnliche Effekte wurden für die DNA-Reparaturkapazität nach Exposition mit Neutronen im Vergleich zur Röntgenstrahlung beobachtet. Beide experimentellen Endpunkte lieferten vergleichbare Werte für die relative biologische Wirksamkeit. Signifikante Änderungen in der Sphärenbildung waren nach der Behandlung mit den verschiedenen Strahlungsqualitäten erkennbar. Die Expression der untersuchten Tumorsuppressorgene war infolge der monoenergetischen Neutronenstrahlung mit 1,2 MeV und 0,56 MeV sowie infolge der Bestrahlung mit einem gemischten Neutronen-Gammafeld teilweise signifikant reduziert. Sowohl die Analyse weiterer Gene tumorrelevanter Signalwege mittels PCR-Array als auch die Untersuchungen der miRNA und regulierter Proteine zeigte eine deutliche Beeinflussung in den Signalwegen und Prozessen des Stoffwechsels und des Zellzyklus.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass monoenergetische Neutronen mit einer Energie um 1 MeV, im Vergleich zu Röntgenstrahlen, eine stärkere strahlenbiologische Wirkung auf normale menschliche MCF10A-Brustzellen haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind für weitere Untersuchungen der strahleninduzierten Karzinogenese von hoher Relevanz und für eine bessere Risikobewertung nach sekundärer Neutronenexposition im Bereich der konventionellen und Protonen-Strahlentherapie sehr wichtig.

1 Einleitung

Die erhöhte Inzidenz einer Karzinogenese – einer Neuentstehung von Krebs – als Spätfolge einer Strahlentherapie rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus und wird in vielen Studien diskutiert (Hall, 2006; Suit *et al.*, 2007; Brenner and Hall, 2008; Schellong *et al.*, 2014). Grund dafür, ist vor allem die steigende Anzahl von Langzeitüberlebenden nach erfolgreicher Behandlung der Krebserkrankung. Zu dieser positiven Entwicklung haben auch Weiter- und Neuentwicklungen in der Strahlentherapie ihren Anteil beigetragen. Als Strahlen- oder Radiotherapie wird die medizinische Anwendung von ionisierender Strahlung zur Behandlung oder Heilung von gut- und bösartigen Erkrankungen bezeichnet. Das Risiko einer sekundären malignen Neoplasie infolge einer Strahlentherapie ist u.a. für die Neuentstehung von Brustkrebs nach der Bestrahlung eines Hodgkin-Lymphoms beschrieben (Schellong *et al.*, 2014). Bei den zur Krebsbehandlung eingesetzten Strahlentherapien handelt es sich größtenteils um herkömmliche Radiotherapien mit Photonen (Röntgenstrahlung), aber auch der Einsatz von Gammastrahlung oder Teilchenstrahlung durch Neutronen, Protonen und Elektronen ist möglich. Die Häufigkeit des Einsatzes von Protonen zur Tumorbekämpfung ist zunehmend, da die Protonentherapie im Vergleich zur herkömmlichen Photonentherapie klinisch relevante Vorteile aufweist. Durch die besonderen physikalischen Eigenschaften des Protonenstrahls ist eine bessere Dosisanpassung an das Zielvolumen möglich, wodurch umliegendes Normalgewebe geschont und die Ganzkörperdosis reduziert wird. Dies geht mit geringeren Nebenwirkungen und Komplikationen im Vergleich zur Photonentherapie einher (Newhauser & Durante, 2011; Paganetti *et al.*, 2012). Jedoch ist die Frage, ob die zusätzliche Ganzkörperdosis sekundärer Neutronen, die während einer Protonenbestrahlung durch Wechselwirkungen mit der Materie entstehen, langfristig betrachtet klinisch relevant sind, noch weitgehend ungeklärt. Diese durch Streuungseffekte entstandenen Neutronen können gesundes Gewebe außerhalb der Zielregionen treffen und sind möglicherweise biologisch hoch wirksam. Bislang ist das Potential dieser Neutronenexposition karzinogene Effekte auszulösen kaum untersucht worden und vor allem für das häufig betroffene gesunde Brustgewebe nicht charakterisiert.

Im Folgenden werden das Einsatzgebiet der Strahlentherapie und die Wirkung von ionisierender Strahlung sowie das verwendete Modellsystem der humanen Brustzellen erläutert.

1.1 Strahlentherapie in der Krebsbehandlung

Nahezu jeder Zweite heute geborene Mensch wird während seines Lebens die Diagnose Krebs erhalten (Howlader *et al.*, 2012). Die Hälfte aller Krebspatienten bekommt im Rahmen ihrer Therapie eine Strahlenbehandlung. Medikamentöse Behandlungsoptionen sind die Hormon-, Antikörper- oder Chemotherapie, die allein oder ergänzend zu einer Radiotherapie eingesetzt werden können.

Für die Bekämpfung einer Tumorerkrankung ist die Strahlentherapie ein wichtiger Baustein. Anders als die medikamentöse Chemotherapie, die systemisch (im gesamten Körper) wirkt, ist die Strahlentherapie eine lokale Behandlung, die den Tumor innerhalb des Bestrahlungsfeldes zerstören soll. Sie kann in Kombination mit einer Chemotherapie (= Radiochemotherapie) oder als alleinige Behandlungsoption und je nach Tumorentität und Beschaffenheit vor oder nach einer tumorentfernenden Operation angewandt werden. Ziel ist es, den Tumor mittels ionisierender Strahlung in seiner Größe zu reduzieren oder komplett zu beseitigen. Die Strahlenbehandlungen werden überwiegend von außen (perkutan, durch die Haut) durchgeführt. Aber auch nuklearmedizinische Behandlungen von innen mit umschlossenen (z. B. Brachytherapie) und offenen Nukliden sind je nach Tumorentität durchführbar.

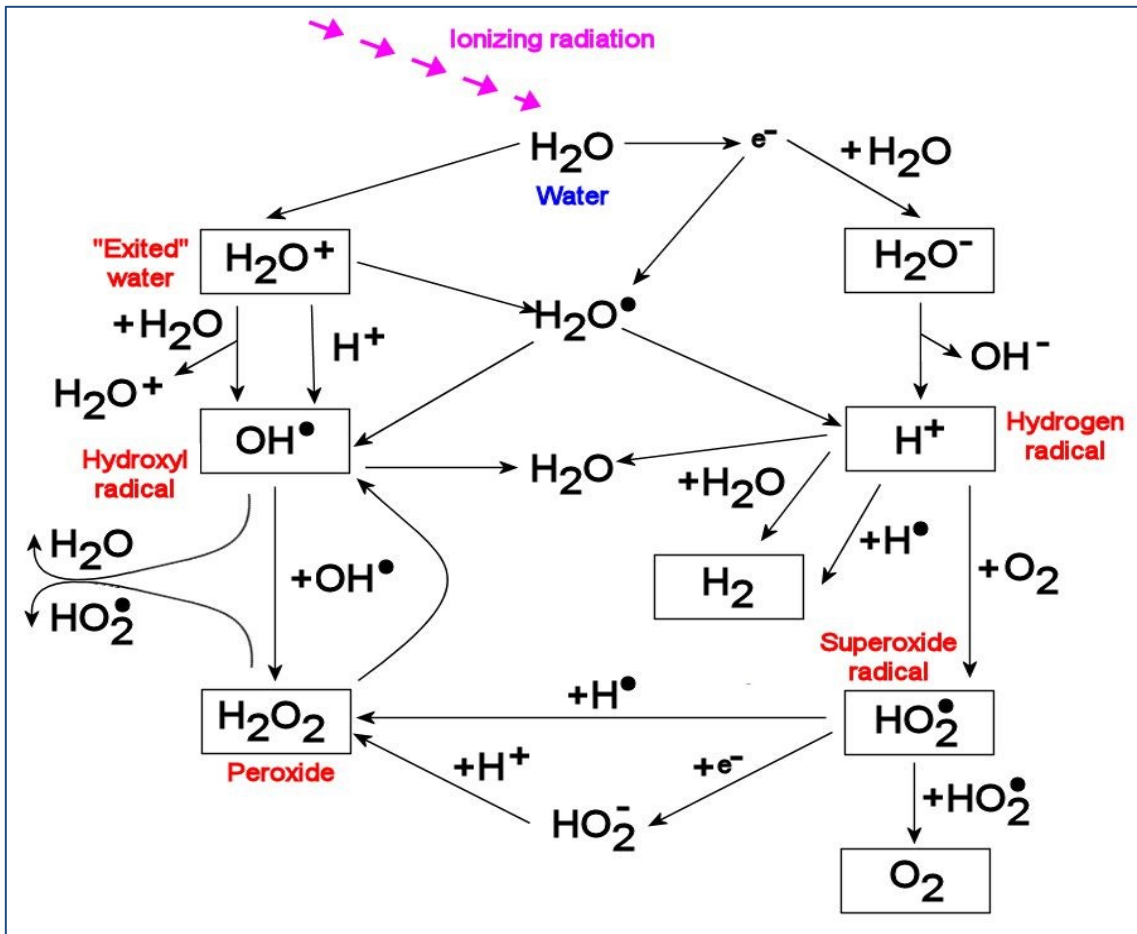
Die konventionelle perkutane Strahlentherapie mit beschleunigten Photonen unter Verwendung eines Linearbeschleunigers ist die häufigste Form in der medizinischen Anwendung. Technische Fortschritte und Entwicklungen in der Strahlentherapie verbessern die Heilungschancen und vermindern das Risiko therapeutischer Spätfolgen. Als Weiterentwicklung der „flachen“ und dreidimensionalen Strahlentherapie kann mit Hilfe der intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) das Strahlenfeld zielgenau an Tumorform- und -größe angepasst werden. Daneben können mit stereotaktischer Bestrahlung (z. B. Cyberknife) sogar Lageveränderungen durch Atembewegungen automatisch ausgeglichen werden. Durch die ständige Veränderung der Einstrahlrichtung wird der Tumor gezielt bestrahlt, umliegendes gesundes Gewebe wird zunehmend geschont.

Die Ionentherapie verwendet Protonen oder andere schwere Ionen, die ihre Energie präzise im Zielvolumen freigeben. Die Ionen werden beim Durchdringen des gesunden Gewebes bis zum Tumor abgebremst und geben ihre Energie bei geringeren Geschwindigkeiten ab. Dabei kann durch Variation der Anfangsenergie die Eindringtiefe bestimmt werden. Da hier die Strahlenenergie erst im Zielgewebe abgegeben wird, kann das umliegende gesunde Gewebe weitestgehend geschont werden.

Da die zytotoxische Strahlenwirkung unspezifisch auf alle Zelltypen wirkt, sind auch gesunde Zellen von den Auswirkungen betroffen. Jedoch ist in gesunden Zellen die Reparaturfähigkeit besser ausgeprägt als in Tumorzellen. So sollen sich die gesunden Zellen regenerieren und Tumorzellen absterben. Akute Nebenwirkungen der Strahlentherapie mit beschleunigten Photonen als auch mit Ionen treten allgemein nur im Bestrahlungsfeld auf, da diese Therapieform lokal begrenzt ist, und sind meist nur vorübergehend. Je nach Strahlendosis, -qualität und Empfindlichkeit des bestrahlten Organismus und der betroffenen Organe können akute Nebenwirkungen aber auch langfristige Spätfolgen auftreten (Hammer, 1983; Molls & Röper, 2006; Schiebe, Hoffmann & Bamberg, 2006).

1.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung auf humane Zellen

Die zytotoxische Wirkung von ionisierender Strahlung wird durch das Aufbrechen von chemischen Verbindungen durch Ionisationsprozesse hervorgerufen. Geladene Teilchen mit ausreichend kinetischer Energie sind in der Lage Elektronen aus dem Atomkern "herauszuschlagen" (Ionisation). Trifft ionisierende Strahlung (z. B. Photonen, Protonen) auf humane Zellen, so sind meist die Wassermoleküle der Angriffspunkt. Aus dem Wasserstoffatom wird ein Elektron abgespalten. Folglich entstehen hochreaktive Radikale (OH^\bullet , H^\bullet), Ionen (H^+ , O^- , H_2O^+ , e^-) und Peroxide (H_2O_2). Dieser Prozess wird als Radiolyse des Wassers bezeichnet (Abbildung 1) und ist für die meisten Schäden an der DNA verantwortlich. Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy Röntgenstrahlung werden pro Zelle 1000-2000 Basenveränderungen, 500-1000 Einzelstrangbrüche, 800-1600 Veränderungen der Zuckermoleküle, 150 DNA-Protein-Quervernetzungen und 50 Doppelstrangbrüche verursacht. DNA-Reparaturmechanismen, wie die homologe Rekombination und das non-homologe



unterschiedliche Ursachen haben. Angewandt auf die Entstehung eines Mammakarzinoms können verschiedene Faktoren einzeln oder in Kombination ein Tumor-initiierendes Ereignis, eine Mutation, auslösen. Dies können intrinsische Risikofaktoren sein – ein genetischer Defekt z. B., wie eine Mutation des BRCA-Gens, hormonelle Unregelmäßigkeiten oder Adipositas – aber auch extrinsische Faktoren, wie Strahlungsexpositionen und verschiedene Umwelteinflüsse. Mutationen des Erbguts können aber auch spontan, ohne einen erkennbaren Auslöser, auftreten. Betrifft die irreversible Veränderung den Zellzyklus, z. B. ein sogenanntes Tumorsuppressorgen, und wird nicht mittels Zellreparaturmechanismen oder Apoptose beseitigt, kann es durch den stetigen Wachstumsreiz und die Zellproliferation zu einer Hyperplasie (atypische Zellvermehrung, Geschwulst) kommen. Dieser Schritt wird als Promotion bezeichnet. Die Zelle gibt den Defekt durch Zellproliferation weiter und durch das anhaltende Wachstum entsteht eine Karzinomvorstufe. Erwerben die wuchernden Zellen der Krebsvorstufe bestimmte Krebszellcharakteristika, Eigenschaften, die sie von nicht entarteten Zellen unterscheiden, kann ein bösartiges und sogar metastasierendes Mammakarzinom entstehen (Progression). Zu diesen Eigenschaften, den sogenannten „*Hallmarks of cancer*“ (Kennzeichen des Krebs) gehören nach Hanahan und Weinberg, 2011, die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, das Vermeiden von Apoptose, das Potential zur unbegrenzten Zellteilung, die Fähigkeit zur kontinuierlichen Angiogenese und die Eigenschaft in zellfremde Gewebe einzudringen und zu metastasieren. Das Eintreten dieser Eigenschaften, die zur malignen Transformation führen, ist nicht obligatorisch und in ihrer Reihenfolge nicht festgelegt.

1.3 Photonen vs. Protonen – Chancen und Risiken

Von ionisierender Strahlung wird immer dann gesprochen, wenn eine Strahlungsart in der Lage ist, Elektronen aus einem Atom oder Molekül herauszuschlagen und somit Ionen oder geladene Molekülreste zu erzeugen (Ionisation). Setzt ionisierende Strahlung Energie im Gewebe frei, so werden Ionisationsvorgänge in Gang gesetzt. Die Reichweite (Eindringtiefe) der Strahlung ist abhängig von ihrer Art und Anfangsenergie, sowie von dem zu durchdringenden Medium.

Als physikalische Größe für die Wirkung von ionisierender Strahlung auf biologisches Material wird der Begriff des linearen Energietransfers (LET) verwendet, der die Anzahl der Ionisationsprozesse pro Wegstrecke beschreibt. Protonen werden zu den niedrig-LET Strahlen gezählt. Die Eindringtiefe von Protonen hängt im Wesentlichen von der Anfangsenergie der Teilchen ab. Beabsichtigt man in tiefere Gewebe des Körpers vorzudringen, sind Anfangsenergien von 190-250 MeV notwendig. Für geringere Eindringtiefen, z. B. bei der Bestrahlung eines Augentumors, deutlich geringere Anfangsenergien von etwa 60-90 MeV. Protonen, aber auch Schwerionen, geben ihre Energie an das Gewebe zunächst nur gering und erst bei fast vollständiger Abbremsung durch das Gewebe nahezu komplett ab. Somit haben Protonen mit einer Anfangsenergie von z. B. 190 MeV zunächst. Bei höheren Eindringtiefen werden die Protonen nach und nach abgebremst und geben ihre Energie dann schlagartig ab. Es findet eine Vielzahl von Ionisationsprozessen an einem durch die zuvor gewählte Anfangsenergie definierten Ort statt. Die Protonenstrahlung ist demnach je nach gewählter Anfangsenergie zunächst dünn und später dicht ionisierend.

Bei der Photonenstrahlung (Röntgen, γ -Strahlung) handelt es sich um ungeladene elektromagnetische Wellen, die wenig Interaktion mit Materie eingehen. Photonen sind dünn ionisierend. Sie lösen wenige Ionisationsprozesse je zurückgelegter Wegstrecke aus und haben somit einen niedrigen LET. Photonenstrahlung hat ein hohes Vermögen Materie zu durchdringen, wobei die Intensität/Energie exponentiell mit der Eindringtiefe abnimmt. Dieser Vorgang des Energieverlusts pro Wegstrecke bzw. des Bremsvermögens des Mediums kann in sogenannten Bragg-Kurven skizziert werden (Abbildung 2).

Teilchenstrahlungen (wie z. B. Protonen) haben beim Eintritt in das Gewebe ein zunächst geringes Stoßbremsvermögen, das zu einem geringen LET und einem flachen Dosisverlauf führt. In der Tiefe, kurz vor Ende der Eindringtiefe (Reichweite) erreicht der Protonenstrahl durch den Anstieg des Stoßbremsvermögens ein Maximum an Energieverlust, ein sogenanntes Dosisplateau. Dieser Maximalwert wird als Bragg-Peak bezeichnet und kann in der Strahlentherapie genutzt werden.

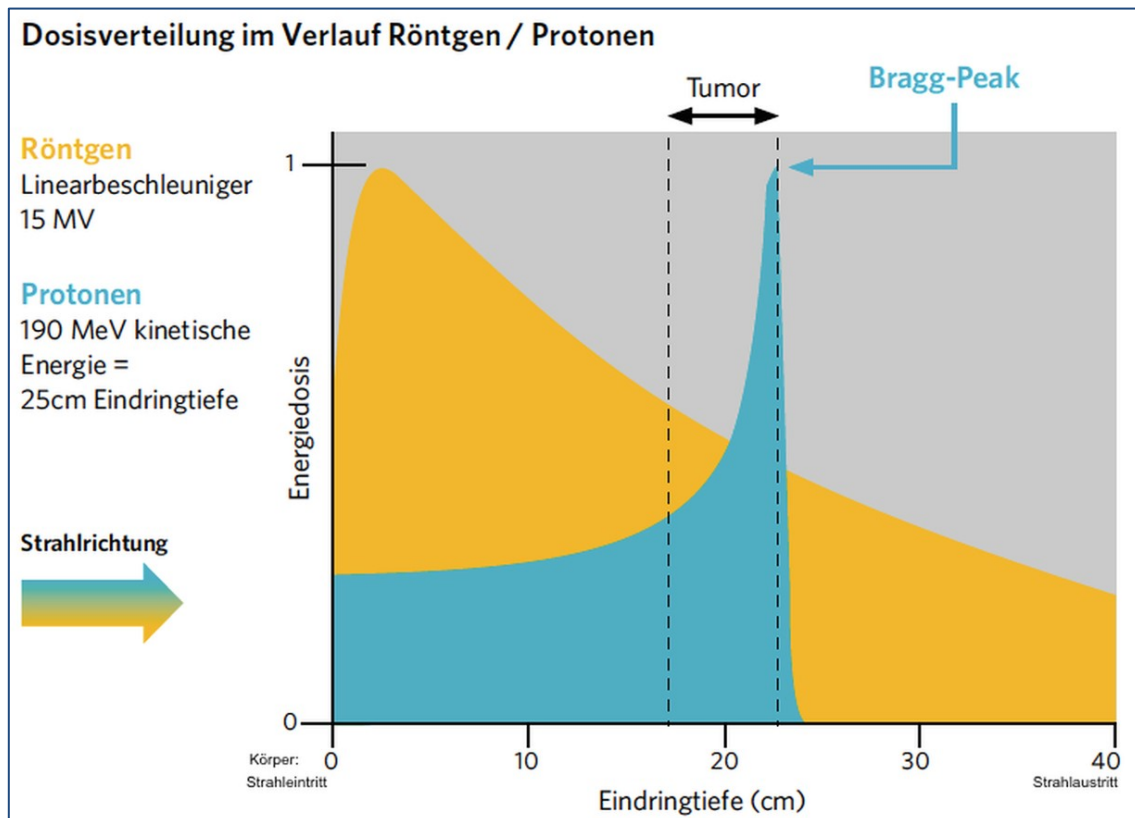


Abbildung 2 – Eindringtiefe (Reichweite) von Photonen- und Protonenstrahlen in Abhängigkeit der Dosis. Dargestellt ist die Strahlrichtung von Photonen (Röntgen; erzeugt mit einem Linearbeschleuniger mit einer Energie von 15 MV) und Protonen mit einer kinetischen Energie von 190 MeV von links nach rechts. Die y-Achse stellt die Eintrittsebene in den Körper dar. Der zu bestrahlende Tumor befindet sich im Mittel bei etwa 20 cm Eindringtiefe. Die Protonenstrahlung erreicht ihr Maximum direkt im Tumor und fällt anschließend scharf ab. Die Photonenstrahlung hat ihre maximale Wirkung noch vor dem Zielort und fällt dann exponentiell ab (nach: <https://www.rptc.de/de/protonentherapie/bestrahlung-mit-protonen/eigenschaften-von-protonenstrahlen.html>).

Photonen weisen eine ungünstige Tiefen-Dosis-Verteilung auf. Durchtritt ein Photonenstrahl (Röntgenstrahl) eine Barriere/einen Körper, so wird die Energie schlagartig abgegeben. Der Dosispeak entsteht bei Eintritt in das Gewebe. Anschließend fällt die Energie exponentiell ab, sodass bei unmoduliertem Photonenstrahl das vor dem Tumor liegende Gewebe („upstream“) mehr Dosis verabreicht bekommt als der Tumor selbst. Auch das Gewebe hinter dem Tumor („downstream“) wird mit ionisierender Strahlung exponiert. Für das den Tumor umgebende gesunde Gewebe ist die Verwendung von Protonen eine weitaus schonendere Methode der Strahlentherapie, da der Bragg-Peak anhand der Anfangsenergie so definiert werden kann, dass das Maximum im Tumor eintritt. Ungünstig ist hierbei, dass der Dosispeak oft zu scharf abgegrenzt ist, um die reale Größe des Tumors vollständig einzunehmen. Um eine optimale dreidimensionale Tumorbestrahlung zu gewährleisten, werden Streu- und Kollimatorvorrichtungen und andere Modifikatoren eingesetzt (Abbildung 3), die ein homogenes Strahlungsfeld

erzeugen und den Bragg-Peak auf Tumorgröße anpassen (spread out bragg peak, SOPB).

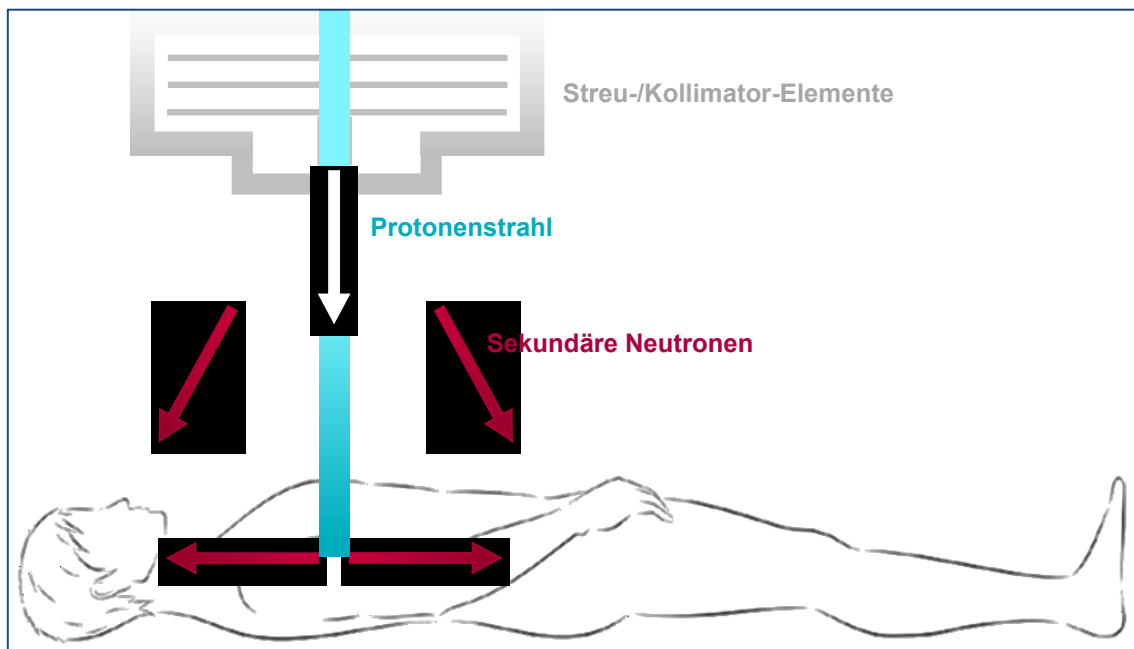


Abbildung 3 – Skizzierung einer therapeutischen Protonenbehandlung mit entstehender Neutronenstreustrahlung beim Erwachsenen und beim Kind (eigene Abbildung).

Aufgrund dieser Anwendung treten zusätzlich zu den Wechselwirkungen der Protonen mit den Atomen des bestrahlten Körpers, sowie Brems- und Streueffekten, weitere Wechselwirkungen zwischen den Protonen und den verwendeten Aufbauarten auf, bei denen vermehrt nukleare Fragmente erzeugt werden. Dies führt zwangsläufig zu einer zusätzlichen Exposition des bestrahlten Körpers mit Sekundärteilchen. 64% der Energie wird auf geladene Sekundärteilchen übertragen (davon ca. 90% auf weitere Protonen), 20% auf Neutronen und 16% auf Gammas. Die klinische Signifikanz dieser ungewollten Teilchenstrahlung, vor allem der Neutronenstrahlung wird kontrovers betrachtet, da ihre biologische Wirksamkeit nicht eindeutig charakterisiert ist (Brenner & Hall, 2008).

1.4 Sekundäre Neutronen als Risikofaktor der Protonentherapie

Da Neutronen elektrisch neutral sind, gehen sie keine Wechselwirkungen mit Elektronen ein und wirken somit selbst nicht ionisierend. Vielmehr lösen sie Kernreaktionen aus, bei denen die Neutronen am Atomkern gestreut werden können oder auch von diesen absorbiert werden. Als Folge können ionisierende γ -Strahlen

entstehen oder wiederum Protonen angestoßen werden, was zu einer Kettenreaktion führt. Während Photonen und Protonen überwiegend kurzzeitig und lokal wirken, kann die Wirkung der niedrigdosierte sekundären Neutronen sehr langfristig sein und den gesamten Körper des Patienten betreffen; vor allem Kinder sind stark von dieser Streustrahlung betroffen (Abbildung 3, Abbildung 4).

Da die klinische Bedeutung einer Ganzkörper-Neutronenexposition unklar ist, ist es wichtig, das Potential einer sekundären Karzinogenese durch sekundäre Neutronen zu beurteilen und idealerweise zu minimieren. Anhand von Computersimulationen wurden in den letzten Jahren mögliche Risiken dargestellt und Vermutungen zu deren Ursachen getroffen.

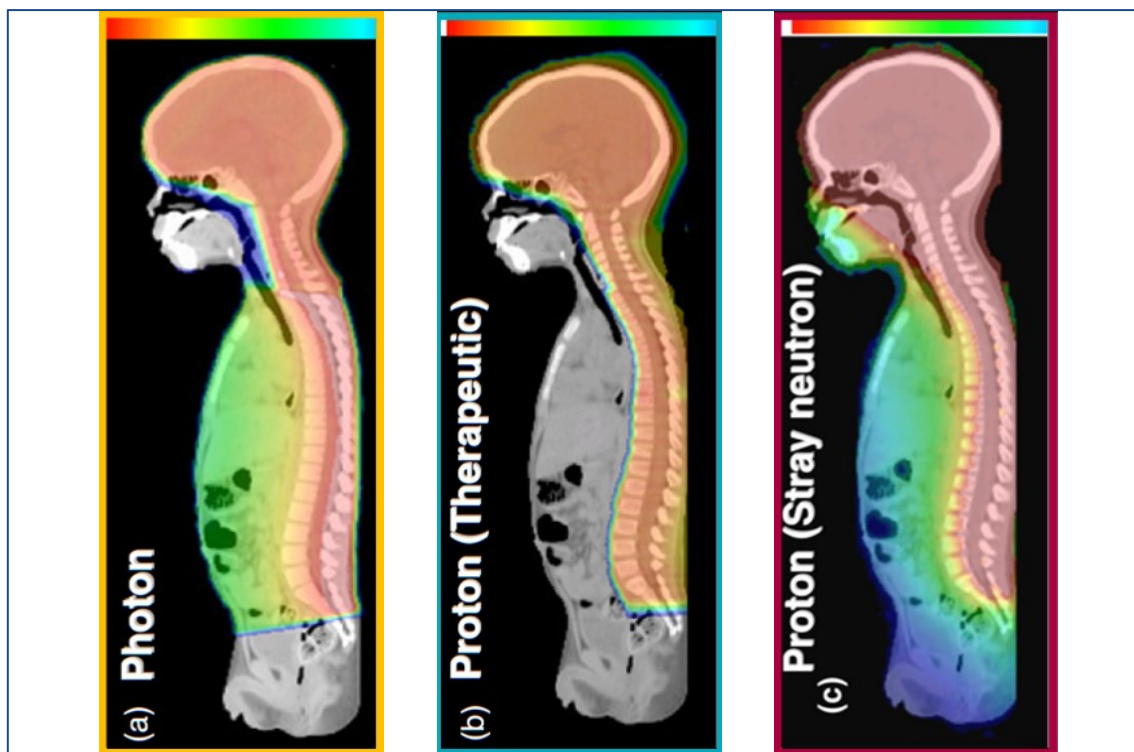


Abbildung 4 – Dosisverteilung von Photonen, Protonen und Neutronen, modulierte nach (Zhang *et al.*, 2013).

Brenner & Hall (2008) postulierten, nachdem sie vielfältige Computersimulation auf Basis der Datenbank der Atombombenüberlebenden (*Atomic bomb survivor database*, Nagasaki University, Japan) durchführten, folgende Gründe für ein erhöhtes Risiko sekundärer maligner Neoplasien bei Kindern:

1. Das Alter zum Zeitpunkt der Strahlenexposition ist ausschlaggebend.

Die Zahlen dieser Datenbank sprechen für sich: Das zusätzliche Lebenszeit-Risiko für eine Krebserkrankung ist bei unter Zehnjährigen um 15 %/Sv erhöht bei über Sechzigjährigen nur um 1 %/Sv. Denn Kinder und Jugendliche weisen eine deutlich höhere Anzahl von Stammzellen in unterschiedlichen Körperregionen auf, die im jungen Alter vor allem für Wachstumsprozesse benötigt werden. Stammzellen sind anfälliger für mutagene Veränderungen und können möglicherweise diese Defekte weitergeben.

2. Die genetische Empfindlichkeit bei Kindern ist höher als bei Erwachsenen.

Bei vielen Fällen von Krebs im Kindesalter handelt es sich bei dem Initiationsereignis um eine Keimbahn-assoziierte Mutation. Diese Mutation kann eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber strahleninduziertem Krebs beinhalten.

3. Die betroffene Körperregion ist bei Kindern ausgeprägter als bei Erwachsenen.

Ein objektiver und logischer Grund für die höhere Empfindlichkeit von Kindern gegenüber einer Neutronenexposition, ist die Körpergröße. Bei einer Protonentherapie werden mehr Körperregion der Streustrahlung ausgesetzt, da sich fast der gesamte Körper im Streubereich befinden kann.

Die von Hall und Brenner aufgestellten Thesen gelten möglicherweise für Neutronen mit einer breiten Energieverteilung, wie sie bei der Detonation von Atombomben entstehen. Die bei einer Protonentherapie entstehenden Neutronen sind jedoch monoenergetisch und haben eine höhere relative biologische Wirksamkeit (*relative biological effectiveness*, RBE). Der RBE-Wert der Protonen wird anhand des mittleren LET im Bereich des Zielvolumens, also des *spread out* Bragg-Peak (SOBP) definiert. Für den klinischen Bereich wird die relative biologische Wirksamkeit mit $RBE = 1,1$ beschrieben (im Verhältnis zur Referenzstrahlung, hier Photonenstrahlung, mit $RBE = 1,0$; Gerweck & Kozin, 1999; Paganetti *et al.*, 2002). Eine höhere RBE geht mit einem größeren Risiko von Nebeneffekten einher, zu denen auch sekundäre maligne Neoplasien zählen. Dicht ionisierende Strahlungen (mit hohem LET-Wert) erzeugen komplexere Strahlenschäden und haben eine höhere biologische Wirksamkeit, weshalb sie in der Strahlenbiologie mit einem höheren Wichtungsfaktor versehen werden. Die Strahlungs-Wichtungsfaktoren w_R nach ICRP-Empfehlung von 2007 (ICRP, 2007) spiegeln das kontroverse Bild der Neutronen wieder. Während Photonen und Protonen jeweils einen eindeutigen Strahlungs-Wichtungsfaktor von 1 bzw. 2

besitzen, so gibt es für Neutronen eine energieabhängige Berechnung, die je nach Neutronenenergie Wichtungsfaktoren zwischen 2,5 bis über 20 ergibt. Da das Potenzial dieser Streustrahlung und das Risiko für sekundäre Neoplasien bisher nicht charakterisiert ist, sollte in dieser Arbeit die Wirkung von Neutronen analysiert und mit der Wirkung einer Photonenstrahlung verglichen werden. Laut NCRP-Bericht von 2011 müssen Patienten überwacht und auf mögliche Risiken für Zweitkrebs untersucht werden, dazu habe der zunehmende Einsatz von Strahlentherapie und die signifikante Verbesserung des langfristigen Überlebens von Patienten geführt (NCRP, 2011). Das Risiko für eine sekundäre Krebserkrankung hängt von der dem Tumor entsprechenden hohen Strahlendosis im Zielgebiet der Bestrahlung ab, sowie von der Niedrigdosis in der Peripherie des Bestrahlungsfeldes. Trotz der nahezu optimalen Tiefen-Dosis-Verteilung während der Protonen-Strahlentherapie ist das Risiko für eine sekundäre maligne Neoplasie weiterhin umstritten, da die Exposition für die Risikobewertung möglicherweise nicht unerheblich ist, insbesondere bei jüngeren Patienten.

1.5 Humane Mammaepithelzellen als Modellsystem für die strahleninduzierte Karzinogenese

Hintergrund zur Initiation dieses Forschungsvorhabens war es, das vermutete Risiko der sekundären Karzinogenese infolge einer pädiatrischen Strahlentherapie näher zu charakterisieren. Dieses Risiko ist, laut vorheriger Studien, nicht nur abhängig vom Alter des Patienten, sondern auch von der Empfindlichkeit des Gewebes. Verschiedene Studien betrachten vor allem die Brust als Ausgangspunkt langfristiger Nebeneffekte und sehen im Brustgewebe das höchste Risiko für eine strahleninduzierte sekundäre Neoplasie (Hall, 2006; Brenner & Hall, 2008; Eidemüller *et al.*, 2011; Schellong *et al.*, 2014). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen eines humanen gesunden Brustepithels als Modellsystem verwendet.

Die normale (gesunde) weibliche Brustdrüse verändert sich während der Pubertät sehr stark und bildet eine zweischichtige Struktur aus luminalen Zellen, umgeben von einer äußeren Schicht aus myoepithelialen Zellen. Wachstums- und Rückbildungsprozesse finden nicht nur während jedes Ovarialzyklus statt, sondern vor allem während der Pubertät und während und nach einer Schwangerschaft (Russo & Russo, 2004). Diese zelluläre Dynamik lies die Existenz einer Population undifferenzierter

Bruststammzellen mit der Eigenschaft zur Selbsterneuerung (*self renewal*) in normalem Brustgewebe vermuten. Viele Studien bestätigten dies, so dass diese Annahme heute als gesichert angesehen werden kann (Smith and Chepko, 2001; Smith and Medina, 2008; Stingl, 2009; Badve and Nakshatri, 2012). Auch bei der Beurteilung des sekundären Karzinogenese-Risikos infolge einer Strahlentherapie wird dieser Zelltyp betrachtet. Bereits 2009 vermutete John Stingl, dass normale Stamm- und Vorläuferzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Replikation haben, Angriffspunkte für maligne Veränderungen sein können, so auch für strahleninduzierte Mutationen. Diese Zellen können als Krebsstammzellen fungieren aber auch das Wachstum von Tumoren fördern (Stingl, 2009). Bestätigt wird dies durch vielfältige Studien, die bereits zuvor den gleichen Antigen-Phänotyp bei Stammzellen und Krebsstammzellen nachweisen konnten (Bonnet & Dick, 1997) und zeigten, dass sich Stammzellen und Krebsstammzellen der gleichen Signalwege bedienen (Visvader, 2009, 2011). Besonders die starke Heterogenität von gesundem Brustgewebe als auch von Brusttumoren erschwert die genaue Identifikation und Charakterisierung von Tumor-initiierenden Zellen und Brustkrebsstammzellen.

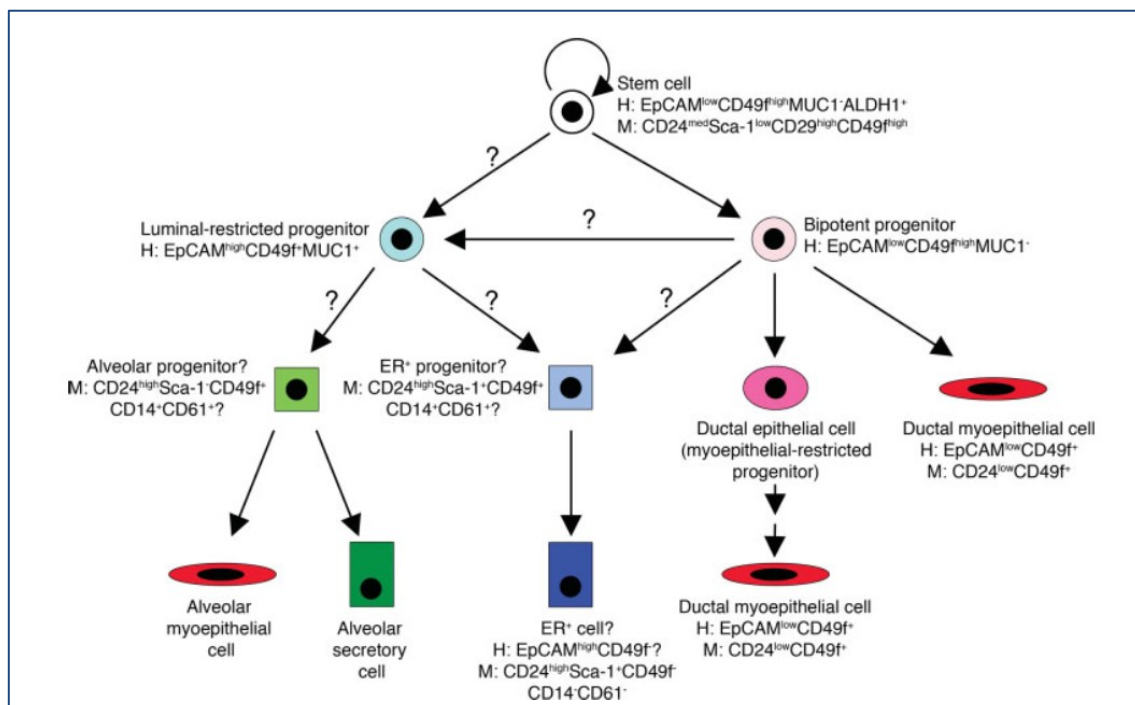


Abbildung 5 – Empfohlene Brustepithelzellhierarchie, die sowohl für die menschlichen (H) als auch für die murine (M) Brustdrüse gilt (Stingl, 2009).

Die Arbeitsgruppen um Stingl und Villadsen waren maßgeblich an einer systematischen Gliederung der Stamm- und Vorläuferzellen im Brustgewebe und der

Zuordnung definierter Marker beteiligt (Abbildung 5; Stingl *et al.*, 1998, 2001; Villadsen *et al.*, 2007; Eirew *et al.*, 2008; Raouf *et al.*, 2008; Stingl, 2009). Auffallend in der Hierarchie ist, dass mit Hilfe der Marker EpCAM und MUC-1 eine Unterscheidung zwischen Stammzellen bzw. bipotenter Vorläuferzellen, die sich noch in beide, die luminal und die (myo-)epitheliale Richtung entwickeln können, und luminal-eingegrenzten Vorläuferzellen möglich ist. Stamm- und bipotente Zellen sind charakterisiert durch EpCAM^{low} und MUC1⁻. Die luminalen Vorläuferzellen weisen die Oberflächeneigenschaften EpCAM^{high} und MUC1⁺ auf. Sowohl EpCAM als auch MUC1 sind auch als Onkoproteine bekannt und in epithelialen Krebsarten überexprimiert (Shtutman *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2007; Nath & Mukherjee, 2014). Eine EpCAM-Expression wird auch mit einer schlechten Prognose bei manchen Brustkrebsarten verbunden (Spizzo *et al.*, 2004). Die Untersuchung des Verlaufs der Antigen-Expression soll Aufschluss über den Stammzell- bzw. Karzinogenese-Grad geben. Um diese zu ermöglichen sollen auch Stammzell-ähnliche Zellen untersucht werden. Deshalb wurde die Zelllinie MCF10A verwendet (Abbildung 6), der die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die in der Ausbildung von Sphären und deren Vermehrung erkennbar ist, nachgesagt wird. Die Arbeitsgruppe um Gabriela Dontu wies die Stammzell-Subpopulation in MCF10A u.a. unter Verwendung eines Sphärenassays nach (Dontu *et al.*, 2003).

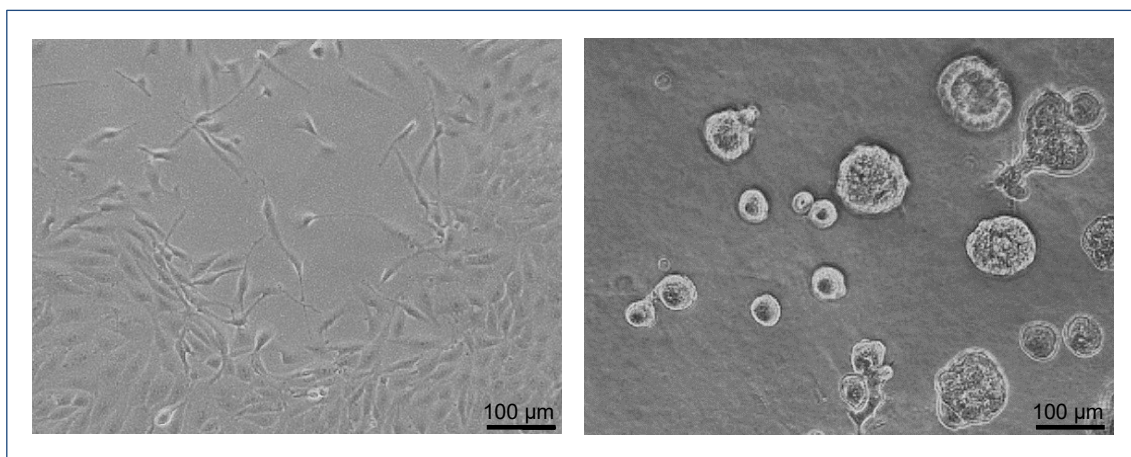


Abbildung 6 – Zelllinie MCF10A als adhärenz Kultur (links) und als Sphären (rechts).

Aufgrund der Häufigkeit sekundärer maligner Neoplasien in der Brust und der Stammzeleigenschaft der humanen Mammaepithelzelllinie MCF10A soll diese in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem für strahleninduzierte Veränderungen dienen.

1.6 Zielstellung

Der medizinische und technische Fortschritt im Bereich der Strahlentherapie führte in den letzten Jahrzehnten zu einem vermehrten Einsatz strahlentherapeutischer Verfahren und zu besseren Überlebensraten von Krebspatienten. Durch die steigende Anzahl Langzeitüberlebender nach einer Strahlentherapie rückte aber auch die Diskussion über mögliche Spätfolgen dieser Therapieform in den Fokus. Eine erhöhte Inzidenz von Brustkrebs ist u.a. bei Frauen beschrieben, die im Kindes- oder Jugendalter eine Strahlenbehandlung mit Protonen erhalten haben. Durch Atom- und Molekülinteraktionen der Protonen mit den Therapiegeräten und dem zu bestrahlenden Körper der Patienten selbst, entstehen sekundäre Neutronen, die umfassende periphere Bereiche des Zielgebietes exponieren können. Das von den Neutronen ausgehende Risiko ist weitestgehend unklar und die biologische Wirksamkeit bisher nicht ausreichend charakterisiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Wirkung dieser sekundären Neutronen zu untersuchen und diese im Vergleich zu konventioneller Photonenstrahlung einzuordnen. Anhand von gesunden humanen Mammaepithelzellen der Linie MCF10A sollte die Wirkung von Photonen und Neutronen auf genetischer und phänotypischer Ebene verglichen werden. Dadurch wurden Rückschlüsse auf strahleninduzierte Karzinogeneseprozesse, die durch strahlentherapeutische Verfahren ausgelöst werden könnten, erwartet. Zur Betrachtung von Dosis- und Energie-abhängigen Einflüssen sollten verschiedene Strahlenqualitäten von Neutronen verwendet werden. Hierzu waren verschiedene Methoden geplant, die akute und langfristige Folgen der Strahlung analysieren. Mit Hilfe eines Koloniebildungstests und eines γ H2AX-Assays sollten das klonogene Überleben und die DNA-Reparaturkapazität der Zellen bestimmt und damit die relativen biologischen Wirksamkeiten der verschiedenen Strahlenarten miteinander verglichen werden. Ein Sphärenassay war für die Untersuchung der Sphärenbildungskapazität der Zellen geplant und das Vorhandensein von Oberflächenmarkern sollte mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Durch den Einsatz von massenspektrometrischen Verfahren in Kombination mit PCR-Analysen wurden erste Einblicke in die Auswirkungen von Strahlung auf das Genom, Transkriptom und Proteom erwartet.

2 Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen von Neutronenstrahlung auf eine humane Normalgewebszelllinie der Brust auf Zellebene sowie im Genom, Transkriptom und Proteom. Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche zur Darstellung sofortiger und langfristiger Auswirkungen von Strahlung wurden Zellen der Linie MCF10A verwendet. Der zeitliche Ablauf der Experimente ist in Abbildung 11 (siehe Kap. 2.3 Ablauf der Experimente) skizziert. Die für die Durchführung verwendeten Materialien sind in Kap. 2.7 Materialien tabellarisch aufgelistet.

2.1 Zellkultivierung

Die humane Zelllinie MCF10A (ATCC® CRL-10317™) wurde 1984 aus dem Drüsengewebe einer 36-jährigen Frau (kaukasisch) mit fibrozystischen Veränderungen der Brust isoliert. Die humanen Mammazellen sind als nicht-kanzerogene Epithelzelllinie charakterisiert und wurden adhärent als Monolayer bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Basis des Kulturmediums bildete Dulbecco's modified eagle medium/F-12 (DMEM/F12, komplette Zusammensetzung des Kulturmediums siehe Tabelle 6). Die Passagierung der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage. Hierbei wurden die adhärenenten Zellen zunächst vorsichtig mit DPBS gespült und anschließend durch Zugabe von 0,05 % Trypsin/EDTA von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Die Enzymreaktion wurde nach zehn bis 15 Minuten durch Zugabe des Kulturmediums gestoppt. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelte die Zellen. Die Suspension wurde bei 250 x g (fünf Minuten, Raumtemperatur) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen mit dem Zellzählgerät wurde eine definierte Zellzahl in ein entsprechendes Zellkulturgefäß eingesät.

Die Zelllinie MCF10A wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Kevin Prise (Queen's University Belfast, Irland) und wurde mittels STR-Typisierung authentifiziert.

2.2 Bestrahlungs-Setup

Um eine homogene Bestrahlung der MCF10A-Zellen über die gesamte Bestrahlungsdauer zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst trypsiniert, vereinzelt und in Suspension gebracht. Ein kontinuierlich kreisender Aufbau von Bestrahlungscontainern in einem Rotor verhinderte eine Zellaggregation und das Adhären der Zellen an das Bestrahlungsgefäß. Das erste Setup bestand aus sieben zylindrischen Containern (Innenraum: 1 ml Volumen, 3 mm Höhe, 20 mm Durchmesser, Abbildung 7 A) und einer dafür angefertigten Ringhalterung, beides hergestellt aus dem thermoplastischen Kunststoff Polymethylmethacrylat (PMMA), sowie einem hölzernen motorisierten Rotor (Abbildung 7 B), der die Zellen über die gesamte Bestrahlungsdauer in einer langsamen Rotationsbewegung hielt. Sechs der sieben Bestrahlungscontainer waren ringförmig angeordnet und somit parallel zueinander. Ein siebter leerer Container in der Mitte fixierte die anderen Behälter im Ring. Das Füllvolumen der PMMA-Container betrug 1 ml. Dieser rotierende parallele Aufbau wurde für die Bestrahlung der Zellen mit Photonen (Röntgenstrahlen) in Rostock, mit Neutronen der breiten Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) in der PTB in Braunschweig und für die Exposition mit sekundären Neutronen am KVI-CART in Groningen verwendet (siehe Tabelle 1). Hier waren die Bestrahlungsfelder breit genug, um gleichzeitig eine adäquate und gleichförmige Bestrahlung mehrerer Container mit der gleichen Dosis durchzuführen. Für die Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen (0,56 MeV; 1,2 MeV) wurde, aufgrund des schmalen Bestrahlungsfeldes ein abgewandelter Rotor mit den gleichen Containern verwendet (Abbildung 7 C). Auf dieser ebenfalls hölzernen und motorisierten Apparatur wurden drei Container hintereinander in Reihe mit einem Abstand von 5 cm, 7 cm und 10 cm von der Neutronenquelle platziert. Dies erlaubte eine gleichzeitige Bestrahlung von drei Zellgefäßen mit unterschiedlicher Dosis entsprechend der Distanz zur Strahlenquelle.

Tabelle 1 – Übersicht der Orte der Bestrahlung und der verwendeten Aufbauten je Strahlenart

Strahlenart	Ort	Aufbau
Photonen	Rostock	parallel (Abb. 7B)
Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV	Braunschweig	parallel
0,56 MeV monoenergetische Neutronen	Braunschweig	in Reihe (Abb. 7C)
1,2 MeV monoenergetische Neutronen	Braunschweig	in Reihe
Sekundäre Neutronen ($+\gamma$)	Groningen	parallel

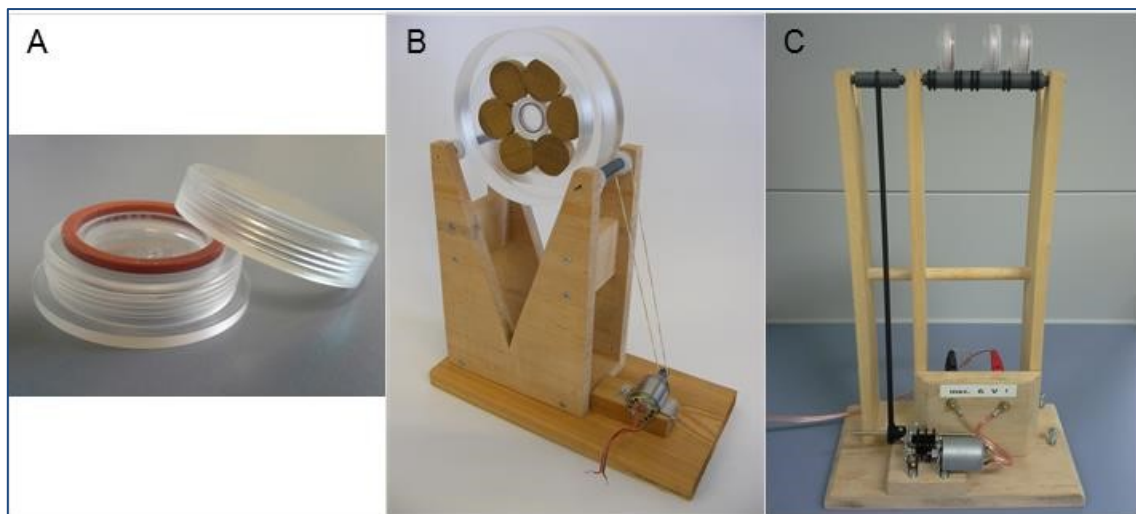


Abbildung 7 – Bestrahlungsaufbau. **A** PMMA-Container zur Bestrahlung von Zellsuspensionen, **B** Motorisierter Rotor mit PMMA-Ringhalterung zur gleichzeitigen Bestrahlung von sechs parallel angeordneten Containern (hölzerne Dummies), **C** Motorisierter Rotor zur Bestrahlung von drei in Reihe stehenden Containern.

Scheinbestrahlte (0 Gy) Zellsuspensionen wurden als Negativkontrolle verwendet. Abgesehen von der Strahlenexposition erhielten diese Ansätze die gleiche Behandlung (Vereinzelung, Überführen in Container, Rotation), wie die bestrahlten Zellen. Nach der Bestrahlung/Scheinbestrahlung wurden die Suspensionszellen in die entsprechenden Zellkulturgefäße eingesät.

2.2.1 Photonenstrahlung

Als Referenzstrahlung wurde eine Photonenexposition (Röntgenstrahlung) mit 220 kV und zwei unterschiedlichen Dosisleistungen mit dem *XStrahl 200* Röntgentherapiegerät bei Raumtemperatur durchgeführt (Abbildung 8 A, B). Die Dosisleistung für die Hochdosisrate (high dose rate, HDR) betrug 0,37 Gy/min und wurde mit einem Filter aus 1 mm Aluminium, 0,25 mm Kupfer und 0,45 mm Zinn sowie

einem Röhrenstrom von 10 mA appliziert. Die Niedrigdosisrate (low dose rate, LDR) betrug 0,02 Gy/min und wurde mit gleichem Filter aber vermindertem Röhrenstrom von 2 mA appliziert. Die Zellsuspensionen wurden Strahlendosen von 0,1 Gy; 0,25 Gy; 0,5 Gy; 1 Gy und 2 Gy für HDR und 1 Gy für LDR ausgesetzt. Für die HDR-Bestrahlung wurde die Ringhalterung auf dem Rotor unmittelbar vor dem Applikator mit einem Austrittsfenster von 10 x 10 cm platziert (Abbildung 8 A). Für die LDR-Bestrahlung wurde ein Abstand von 40 cm zum gleichen Applikator gewählt. Die durch die Entfernung entstandene Streuung wurde mit einem MCP96-Schild abgeschirmt, um eine zusätzliche Bestrahlung der Ringhalterung und des Rotors zu vermeiden. Die Abschirmung war ca. 12-14 mm dick und hatte ein Fenster von 10 x 10 cm (Abbildung 8 B). MCP96 (*mining and chemical products*) ist eine Legierung bestehend aus 40 % Blei, 40 % Bismut und 20 % Zinn. Zur Bestimmung der absoluten Dosis wurden Messungen mit einer 0,3 cm³ Ionisationskammer (PTW Typ 31013), eingebettet in eine 8 mm PMMA-Platte mit einem Dosimeter vom Typ UNIDOS®, durchgeführt. Die Dosimetrie basierte auf dem Deutschen Standard DIN 6809-5 und wurde von Mitarbeitern der Abteilung Medizinphysik der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie durchgeführt. Die relative Unsicherheit betrug $\pm 3\%$. Die Photonenbestrahlungen wurden durch Dajana Juerß (Universitätsmedizin Rostock) im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt und deren Ergebnisse dienten in dieser Arbeit als Referenz für die Neutronenexpositionen.

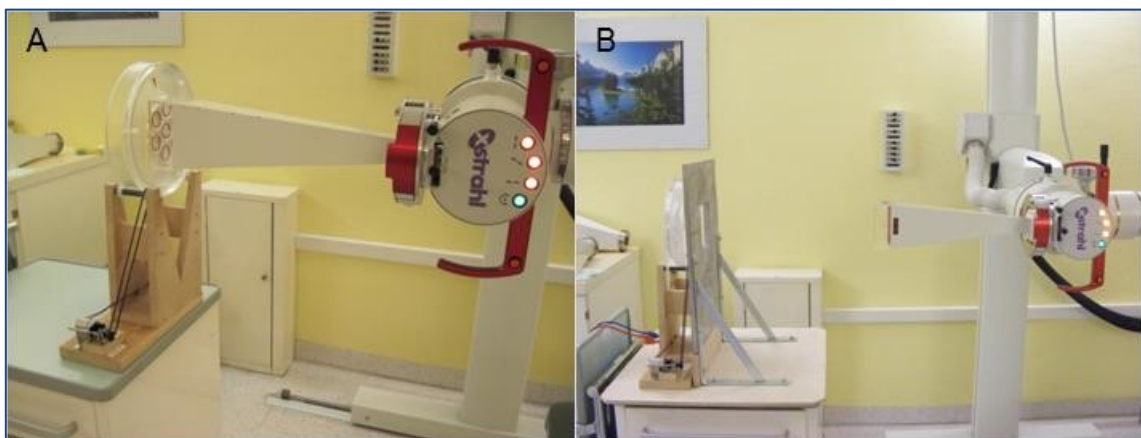


Abbildung 8 – Photonenbestrahlung am Röntgentherapiegerät. A Aufbau mit Bestrahlungscontainern und Rotor direkt vor dem Röntgentubus für die Bestrahlung mit Hochdosisraten, **B** Aufbau mit Bestrahlungscontainern, Rotor und MCP96-Schild in 40 cm Entfernung zum Applikator für die Bestrahlung mit Niedrigdosisraten.

2.2.2 Neutronenstrahlung

In Kooperation mit der PTB in Braunschweig wurden zwei unterschiedliche Arten von Neutronenbestrahlungen für die Bestrahlung der Zellen zur Verfügung gestellt. Die Vorbereitung der Zellen zur Bestrahlung, die Nachbereitung sowie das Sammeln der Proben für die weiteren Analysen erfolgte durch mich im Rahmen dieser Arbeit. Die Exposition der Zellen mit der Strahlung an der Anlage wurde von den Mitarbeitern des PTB durchgeführt. Die PTB verfügt über einen Van-de-Graaff-Generator und einen Zyklotron zur Erzeugung von monoenergetischen Neutronen (Abbildung 9; Brede *et al.*, 1980).

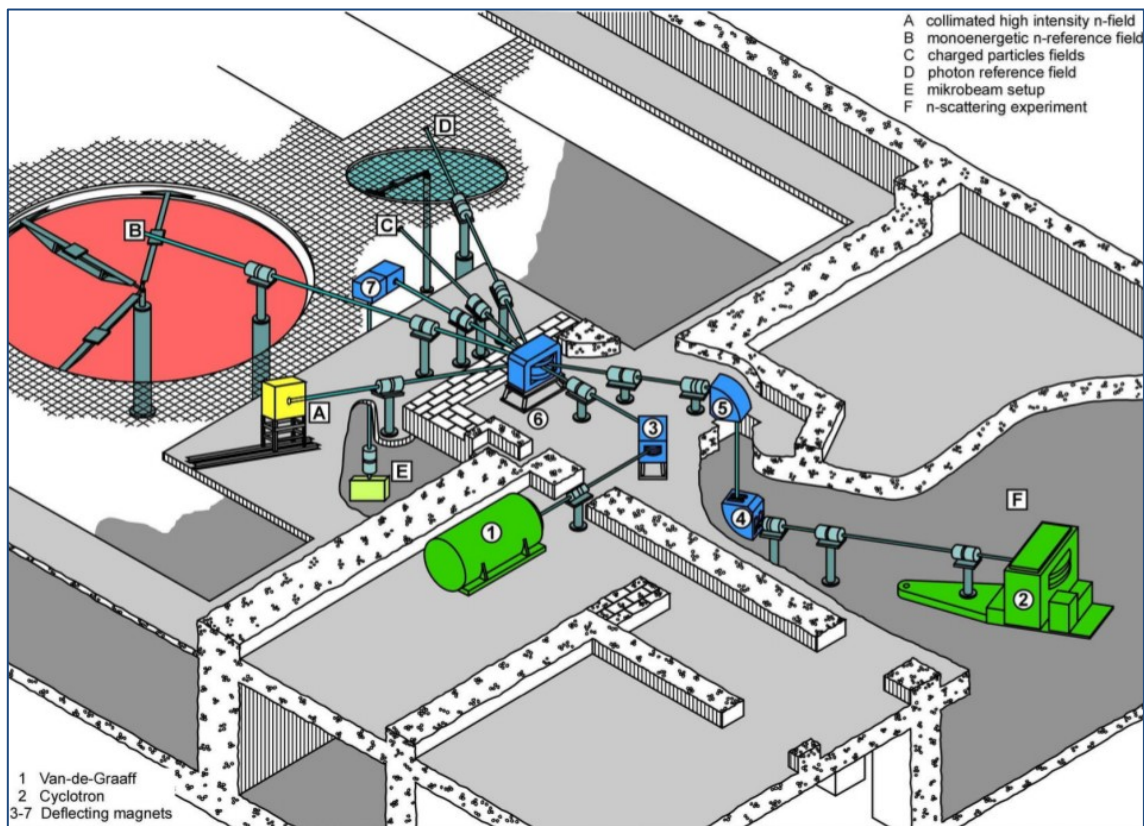
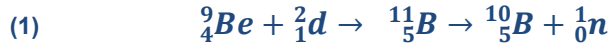


Abbildung 9 – Bestrahlungsanlage in der PTB, Braunschweig. Schematischer Aufbau der Bestrahlungseinrichtungen (1 Van-de-Graaff-Generator (grün), 2 Zyklotron (grün); (Abbildung aus Gagnon-Moisan *et al.*, 2012)).

2.2.2.1 Neutronen mit breiter Energieverteilung

Zunächst wurden Versuche mit einem intensiven kollimierten Neutronenstrahl mit breiter Energieverteilung (0,1 – 10 MeV, ICRU Report No. 63, 2000) für eine hohe Dosisrate von 0,1 Gy/min (HDR) und eine niedrige Dosisrate von 0,003 Gy/min (LDR)

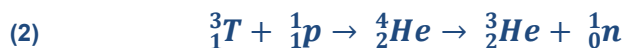
durchgeführt. Zur Erzeugung des Neutronenstrahls wurden Deuteronen (2_1d) innerhalb eines Kollimators in einem Winkel von 0° und mit einer Energie von 13 MeV auf ein Beryllium-Target (9_4Be) geschossen (siehe Formel (1)).



Die mittlere Neutronenenergie betrug $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (ICRU Report No. 63, 2000). Die von den Zellen absorbierte Dosis wurde von Mitarbeitern des PTB mit Hilfe einer kalibrierten Gewebe-äquivalenten Ionisationskammer gemäß ICRU Report No. 45 (1989) bestimmt. Mit der Hochdosisrate wurden die Dosen 0,1 Gy, 0,25 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy und 2 Gy sowie 1 Gy mit der Niedrigdosisrate appliziert. Die relative Messunsicherheit für die gesamte Dosisbestimmung betrug 6 % (Juerß *et al.*, 2017).

2.2.2.2 Monoenergetische Neutronen

Des Weiteren wurden am PTB monoenergetische Neutronen erzeugt, die als Streustrahlung während einer Protonentherapie erwartet werden. Durch eine Tritium-Reaktion werden Neutronen mit einer Energie von 0,56 MeV (Dosisrate: 0,0045 Gy/min) und durch eine Lithium-Reaktion Neutronen mit einer Energie von 1,2 MeV (Dosisrate: 0,003 Gy/min) produziert (Schmid *et al.*, 2003; Frankenberg-Schwager *et al.*, 2010; siehe Formeln (2) und (3)).



Die Neutronenausbeute pro Einheit Target-Ladung bei einem Austrittswinkel von 0° wurde mit einem *Long Counter* (Neutronendetektor) von Mitarbeitern des PTB gemessen. Zur Bestimmung der spektralen Neutronenausbreitung in der Zellsuspension wurden im Rahmen des Projektes vorab *Monte Carlo*-Kalkulationen des Neutronentransports durch die Universität Pavia (*Università degli studi di Pavia*) durchgeführt. Die in der Materie freigesetzte Energie (KERMA = *kinetic energy released in matter*) wurde mittels eines Fluenz-zu-KERMA-Umwandlungskoeffizienten aus der spektralen Fluenz berechnet (Chadwick *et al.*, 1999; ICRU Report No. 63, 2000). Auf diese Weise kann die Ausbreitung der gestreuten Neutronen im Bestrahlungs-Setup (Container und Halterung) vorausbestimmt werden. Die relative Messunsicherheit für die Dosisbestimmung betrug 7 %, wobei diese maßgeblich aus

dem Abstand der Probe zur Neutronenquelle resultierte (Juerß *et al.*, 2017). Die absorbierte Neutronendosis wurde nach der Bestrahlung rechnerisch bestimmt und korrigiert. Es wurde versucht, die einzelnen Bestrahlungsdurchgänge so genau wie möglich aufeinander abzustimmen. Die pro Bestrahlungsdurchführung applizierten Neutronendosen und die anschließend durchgeführten Experimente sowie die daraus resultierenden durchschnittlichen Neutronendosen pro Experiment sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt. Die unterschiedlichen Neutronendosen resultieren aus den verschiedenen Bestrahlungsdurchgängen und der erst nachfolgend genau berechneten Bestrahlungsdosis pro Durchführung. So wurde z. B. das WST-1-Assay (Versuch 3.2.1) dreimal infolge einer 1,2 MeV monoenergetischen Neutronenstrahlung durchgeführt, nach Durchgang Nummer 3, 4 und 5 (siehe Tabelle 2). Die drei Durchgänge wiesen unterschiedliche Strahlendosen von 0,19 Gy, 0,43 Gy und 0,87 Gy (#3 und #4) bzw. 0,19 Gy, 0,44 Gy und 0,90 Gy (#5) auf. Daraus ergeben sich für dieses Experiment durchschnittliche Neutronendosen von 0,19 Gy, 0,43 Gy und 0,88 Gy (siehe Tabelle 3).

Tabelle 2 – Applizierte Dosen monoenergetischer Neutronen der Energien 1,2 MeV und 0,56 MeV pro Container mit dem Abstand D von 5 cm, 7 cm und 10 cm zur Neutronenquelle sowie im Anschluss durchgeführte Experimente: 2.4.1 Sphärenassay, 2.4.2 Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie, 2.5.1 Zellvitalität, 2.5.2 Koloniebildungstest, 2.5.3 γ H2AX-Assay zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen, 2.6.1 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) zur Analyse von Tumorsuppressorgenen, 2.6.2 RT² Profiler PCR-Array zur Analyse onkologisch relevanter Signalwege, 2.6.3 Mikro-RNA-Analyse, 2.6.4 Proteomanalyse

$E_n = 1,2 \text{ MeV}$

	absorbierte Dosis			durchgeführte Experimente (mit Kapitelnummer)					
	$D_{5\text{cm}}$	$D_{7\text{cm}}$	$D_{10\text{cm}}$	2.4.1	2.4.2	2.5.1	2.5.2	2.5.3	2.6.1
#	[Gy]	[Gy]	[Gy]	Sphä- ren	DFZ	WST	KBT	γ H2AX	TSG
1	0,76	0,37	0,16				x	x	x
2	0,84	0,41	0,18				x	x	
3	0,87	0,43	0,19	x	x	x	x		x
4	0,87	0,43	0,19	x	x	x	x		x
5	0,90	0,44	0,19	x	x	x	x	x	x
6	0,89	0,43	0,19					x	

$E_n = 0,56 \text{ MeV}$

absorbierte Dosis			durchgeführte Experimente (mit Kapitelnummer)							
$D_{5\text{cm}}$	$D_{7\text{cm}}$	$D_{10\text{cm}}$	2.4.1	2.4.2	2.5.1	2.5.2	2.5.3	2.6.1	2.6.2	2.6.3/0
# [Gy]	[Gy]	[Gy]	Sphären	DFZ	WST	KBT	γH2AX	TSG	Array	Prot./miRNA
1	0,76	0,36	0,15	x	x	x	x	x	x	
2	0,82	0,39	0,16	x	x		x	x		
3	0,89	0,42	0,17	x	x	x	x	x	x	
4	0,90	0,43	0,18		x	x	x	x	x	
5	0,90	0,43	0,18							x
6	0,90	0,43	0,18							x
7	0,89	0,42	0,17							x

Tabelle 3 – Aus den durchgeführten Bestrahlungen mit monoenergetischen Neutronen resultierende Durchschnittsdosen pro Experiment und Container mit dem Abstand D von 5 cm, 7 cm und 10 cm zur Neutronenquelle

 $E_n = 1,2 \text{ MeV}$

		$\langle D_{5\text{cm}} \rangle$ [Gy]	$\langle D_{7\text{cm}} \rangle$ [Gy]	$\langle D_{10\text{cm}} \rangle$ [Gy]
2.4.1	Sphärenassay	0,88	0,43	0,19
2.4.2	Durchflusszytometrie	0,88	0,43	0,19
2.5.1	WST-1-Assay	0,88	0,43	0,19
2.5.2	Koloniebildungstest	0,85	0,42	0,18
2.5.3	γH2AX -Assay	0,85	0,42	0,18
2.6.1	Tumorsuppressorgene	0,85	0,42	0,18

 $E_n = 0,56 \text{ MeV}$

		$\langle D_{5\text{cm}} \rangle$ [Gy]	$\langle D_{7\text{cm}} \rangle$ [Gy]	$\langle D_{10\text{cm}} \rangle$ [Gy]
2.4.1	Sphärenassay	0,82	0,39	0,16
2.4.2	Durchflusszytometrie	0,84	0,40	0,16
2.5.1	WST-1	0,85	0,40	0,17
2.5.2	Koloniebildungstest	0,84	0,40	0,16
2.5.3	γH2AX -Assay	0,84	0,40	0,16
2.6.1	Tumorsuppressorgene	0,85	0,40	0,17
2.6.2	Genexpressions-Array	0,85	-	-
2.6.3/0	Proteom-/miRNA-Analyse	0,90	0,43	0,18

2.2.2.3 Sekundäre Neutronen

Um ein hochenergetisches Neutronenspektrum zu generieren, ähnlich dem, das während einer Protonentherapie erzeugt wird, wurden zusätzlich Bestrahlungen am KVI-CART (Groningen, Niederlande) durchgeführt. Ein mit einem Zyklotron erzeugter unkollimierter 190 MeV-Protonenstrahl (4 mm-Pencil Beam) wird auf ein kubisches 30 cm-Wasserphantom innerhalb eines PMMA-Quaders mit 0,8 cm Wandstärke und einem Boden aus 1 cm Polycarbonat, gerichtet, in dem die Protonen abgestoppt werden (siehe Abbildung 10). Auf diese Weise werden sekundäre Neutronen erzeugt, die denen der Streuung während einer Protonentherapie entsprechen. Die Bestrahlungsgefäße wurden 5 cm hinter dem Wasserphantom in einem Winkel von 0° zum einfallenden Protonenstrahl positioniert. Das Strahlenprofil beim Eintritt in das Phantom wurde von Projektmitgliedern der Universität Pavia mit einem GafChromic-EBT-Film und einer Standardunsicherheit von 1 % bestimmt (Juerß *et al.*, 2017). Die Protoneninteraktionen im Wasser generierten am Ort der Probenposition ein gemischtes Feld aus γ -Strahlung und sekundären Neutronen. Die Gesamtdosis des gemischten Neutronen- γ -Feldes auf die Probe wurde von Projektpartnern aus Pavia und Wien mittels einer Monte-Carlo-Simulation bestimmt und betrug 4,0E-15 Gy/Proton (Juerß *et al.*, 2017). Durch den Eintritt von 3,8E13; 9,5E13; 1,9E14 bzw. 3,8E14 Protonen in das Wasserphantom wurden vier Probensätze mit einer Gesamtdosis von 0,152 Gy; 0,38 Gy; 0,76 Gy und 1,52 Gy bestrahlt (Abbildung 10). Die relative Standardunsicherheit für die Gesamtdosisbestimmung betrug etwa 5-6 %. Das Energiespektrum der sekundären Neutronen wurde genau an der Probenposition simuliert und ergab eine mittlere Neutronenenergie von $\langle E_n \rangle = 70,5$ MeV (Juerß *et al.*, 2017). Das Verhältnis von Neutronendosis zur Gesamtdosis betrug 0,65 und resultierte somit in Neutronendosen von ~0,1-1 Gy. Dies bedeutete 35 %-Zusatzdosis auf die Proben durch γ -Strahlung.

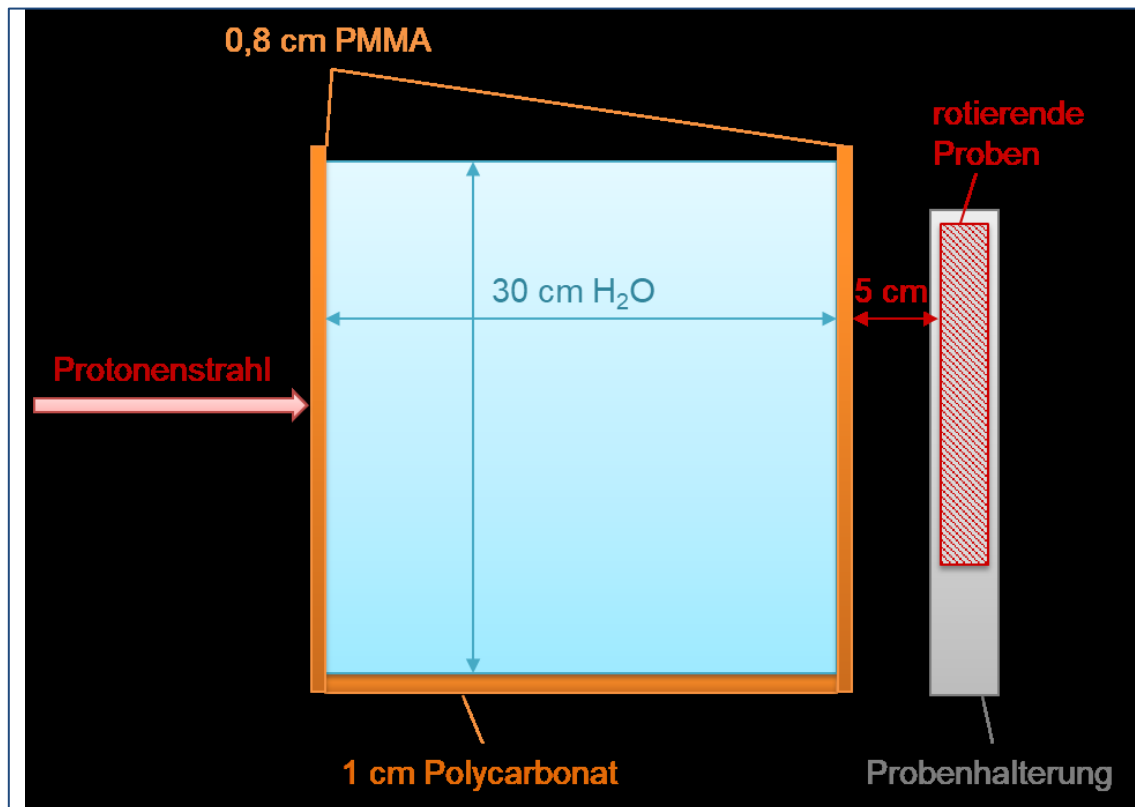


Abbildung 10 – Versuchsaufbau für die Neutronenexposition am KVI-CART, Groningen. Erzeugung von sekundären Neutronen durch den Beschuss eines kubischen 30 cm-Wasserphantoms (Mitte) mit Protonen (von links kommend); Exposition der Zellen (rechts in der Probenhalterung) mit einem gemischten sekundären Neutronen γ -Feld in einem Winkel von 0° zum Protonenstrahl.

Tabelle 4 – Parameter der Bestrahlungen am KVI-CART

	Protonenanzahl	Gesamtdosis	γ -Anteil (0,35)	Anteil sek. Neutronen (0,65)
1	3,8E13	0,152 Gy	0,0532 Gy	0,0988 Gy (~ 0,10 Gy)
2	9,5E13	0,38 Gy	0,133 Gy	0,247 Gy (~ 0,25 Gy)
3	1,9E14	0,76 Gy	0,266 Gy	0,494 Gy (~ 0,5 Gy)
4	3,8E14	1,52 Gy	0,532 Gy	0,988 Gy (~ 1 Gy)

Alle Strahlungsfelder und Bestrahlungsanordnungen wurden von Projektmitgliedern der Universität Pavia und Wien mit dem Monte-Carlo-Strahlentransportmodell PHITS ver. 2.88 (Sato *et al.*, 2013) simuliert, um die Dosishomogenität in den Behältern, die Dosis-Distanz-Beziehungen und die Eigenschaften des Neutronen-/Photonenfeldes am und im Probencontainer zu bestätigen.

2.3 Ablauf der Experimente

Die zeitliche Abfolge der verschiedenen Versuche, einschließlich ihrer Inkubationszeiten, sowie Bestrahlung und Transport der Zellen wurde in einem Schema chronologisch von oben (Tag 0) nach unten (Tag 11) dargestellt (Abbildung 11).

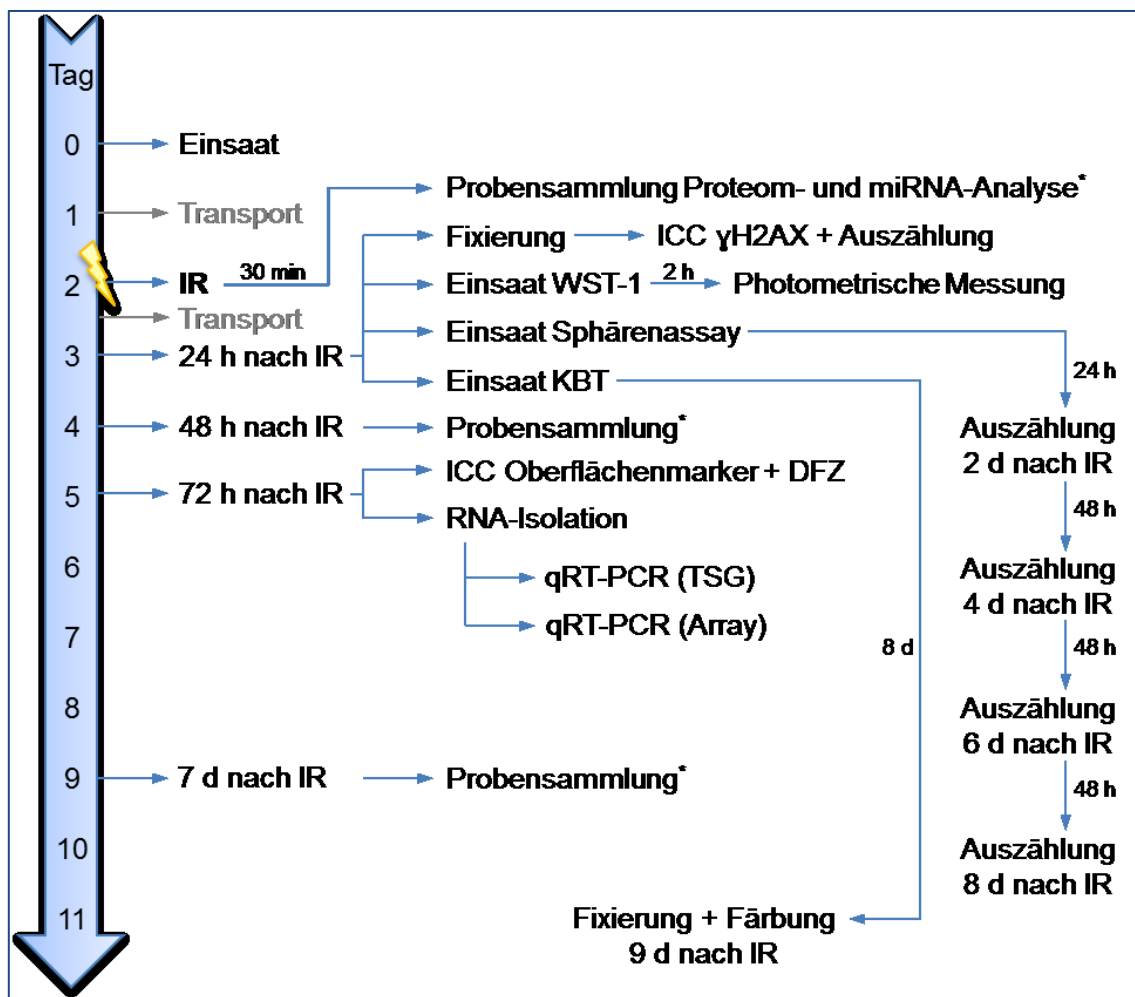


Abbildung 11 – Zeitliche Abfolge der Experimente und Bestrahlung, chronologisch von oben (Tag 0) nach unten (Tag 11). γH2AX: phosphoryliertes Histon 2AX; DFZ: Durchflusszytometer; ICC: immunocytochemische Färbung; IR: Bestrahlung; KBT: Koloniebildungstest; miRNA mikroRNA, qRT-PCR quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion, RNA Ribonukleinsäure, TSG Tumorsuppressorgene, WST-1 water soluble tetrazolium, * Probensammlung für Proteom- und miRNA-Analyse

An Tag 0 erfolgte die Einsaat der Zellen in Zellkulturgefäße, die ein adhärentes Wachstum erlaubten. Die Einsaatdichte wurde so gewählt, dass der Zellrasen am Tag der Bestrahlung eine Konfluenz von 70-80 % aufwies. An Tag 1 erfolgte der Transport der Zellkulturen bei Raumtemperatur und ohne CO₂-Inkubation innerhalb von ca. 4-5 Stunden zum jeweiligen Bestrahlungsort, zur Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) nach Braunschweig bzw. zum KVI-Center for Advanced

Radiation Technology (KVI-CART) in Groningen (Niederlande). Der Rücktransport wurde direkt im Anschluss an den letzten Bestrahlungszeitpunkt (Tag 2) durchgeführt. Erfolgte die Bestrahlung in Rostock, so wurden Hin- und Rücktransport simuliert, indem die Zellkulturgefäße für den entsprechenden Zeitraum aus dem Brutschrank genommen wurden.

Bereits 30 Minuten nach Bestrahlung wurde Zellmaterial für die späteren RNA- und Proteinanalysen gesammelt (Abbildung 11). Diese Proben wurden auf Trockeneis nach Rostock transportiert. 24 Stunden nach der Bestrahlung, an Tag 3, wurden γ H2AX-Assay, Koloniebildungstest und Sphärenassay begonnen und der Viabilitätstest mittels WST-1 durchgeführt. Am Folgetag, 48 Stunden nach der Bestrahlung, wurden erneut Zellen für RNA- und Proteinanalyse gewonnen. An Tag 5, 72 Stunden nach Bestrahlung, erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen für die durchflusszytometrische Messung sowie die Isolation der RNA für die beiden PCR-Experimente. Die letzte Gewinnung von Zellmaterial erfolgte 7 Tage nach Strahlenexposition. Hier wurde nochmals eine Probe für die Analyse von Proteom und miRNA entnommen. PCR- sowie Proteom- und miRNA-Analysen wurden blockweise in den folgenden Wochen und Monaten nach Bestrahlung durchgeführt, da das notwendige Zellmaterial bei -80 °C gelagert wurde.

2.4 Validierung der humanen Mammaepithelzellen als Modellsystem

2.4.1 Sphärenassay

Für das Sphärenassay wurden 1×10^4 MCF10A-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung trypsinisiert und je Bestrahlungsansatz als Triplikat in *Ultra-low attachment*-Platten ausgesät. Diese speziellen 6-Well-Platten verhindern durch eine besondere Beschichtung des Gefäßbodens das Adhären der humanen Brustgewebszellen, so dass diese in der Lage sind, aufgrund ihres Stammzellpotenzials, dreidimensionale Sphären auszubilden. Dieser Test gab somit Aufschluss über die Regenerationsfähigkeit der Zellen. Die Platten wurden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Sphärenanzahl pro Well alle zwei Tage (Tag 2-8 nach Bestrahlung) unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung bestimmt. Da die Zellen vor Einsaat vereinzelt wurden betrug die Sphärenanzahl an Tag 1 (24 Stunden nach Bestrahlung) Null. Die absolute Sphärenanzahl wurde als Mittelwert \pm Standardfehler über einen Zeitraum

von 0-8 Tagen ebenfalls grafisch dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur unbehandelten (scheinbestrahlten) Kontrolle wurde für den jeweiligen Zähltag (Tag 2-8) mit dem Student's *t*-Test bewertet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied an.

2.4.2 Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Oberflächenmarker MUC-1 (Mucin-1, CD227) und EpCAM (engl. *epithelial cell adhesion molecule*, epitheliales Zelladhäsionsmolekül) wurden immunologische Färbungen durchgeführt und diese mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. 72 Stunden nach erfolgter Strahlenexposition wurden von jedem bestrahlten Ansatz zwei Pellets à 1×10^5 Zellen, gelöst in 100 μ l kaltem Färbepuffer (Stain Buffer BSA), vorbereitet. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen die Oberflächenproteine MUC-1 (FITC-gekoppelt) und EpCAM (PE-gekoppelt) wurden mit einer Verdünnung von 1:20 zu jeweils einem der beiden Ansätze hinzugefügt. Für die unbestrahlten Kontrollgruppen wurde ein dritter Ansatz à 1×10^5 Zellen vorbereitet. Dieser blieb ungefärbt und diente zur Bestimmung der Autofluoreszenz der untersuchten Zellen. Nach einer 20- bis 30-minütigen Inkubation im Dunkeln bei 4°C wurden die Zellen mit 1 ml kaltem Färbepuffer gewaschen und zentrifugiert (400 x g, 4°C, fünf Minuten). Nachdem das Pellet erneut in frischem, kaltem Färbepuffer aufgenommen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Farbstoff 7-AAD (1:100) für zehn Minuten im Dunkeln und bei 4°C zur Differenzierung von vitalen und toten Zellen. 7-AAD interkaliert zwischen Guanin und Cytosin und färbt ausschließlich die DNA nicht-vitaler Zellen, da er eine intakte Zellmembran nicht passieren kann. Der Analysevorgang mit dem Durchflusszytometer Cytomics FC 500 sollte unmittelbar im Anschluss erfolgen, da der Avitalfarbstoff zytotoxisch wirkt. Beide Fluorochrome, FITC und PE, sowie 7-AAD wurden mit einem Laser bei 488 nm angeregt und emittieren Licht der Wellenlänge 578 nm (PE), 520 nm (FITC) sowie 647 nm (7-AAD). Für die Analyse der Oberflächenmarker wurden nur die als vital detektierten Zellen betrachtet. 7-AAD-positive Events (tote Zellen) wurden ausgeschlossen. Die Zellmessung stoppte nach dem Durchlauf von 1×10^4 vitalen Zellen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (X-mean, mittlere Häufigkeit) der Kontrollgruppe wurde auf den Wert X-mean = 1 normalisiert. Die mittleren X-Werte der behandelten Ansätze wurden relativ zu ihrer individuellen Kontrolle betrachtet.

Ungefärbte Zellen dienen als Negativkontrolle (Blindwert). Der Betrag der hier gemessenen Autofluoreszenz der Zellen wurde von allen behandelten Ansätzen und Kontrollen subtrahiert (siehe Abbildung 12). Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden mit dem Einstichproben-*t*-Test bewertet, wobei ein *p*-Wert von $\leq 0,02$ als signifikant betrachtet wurde.

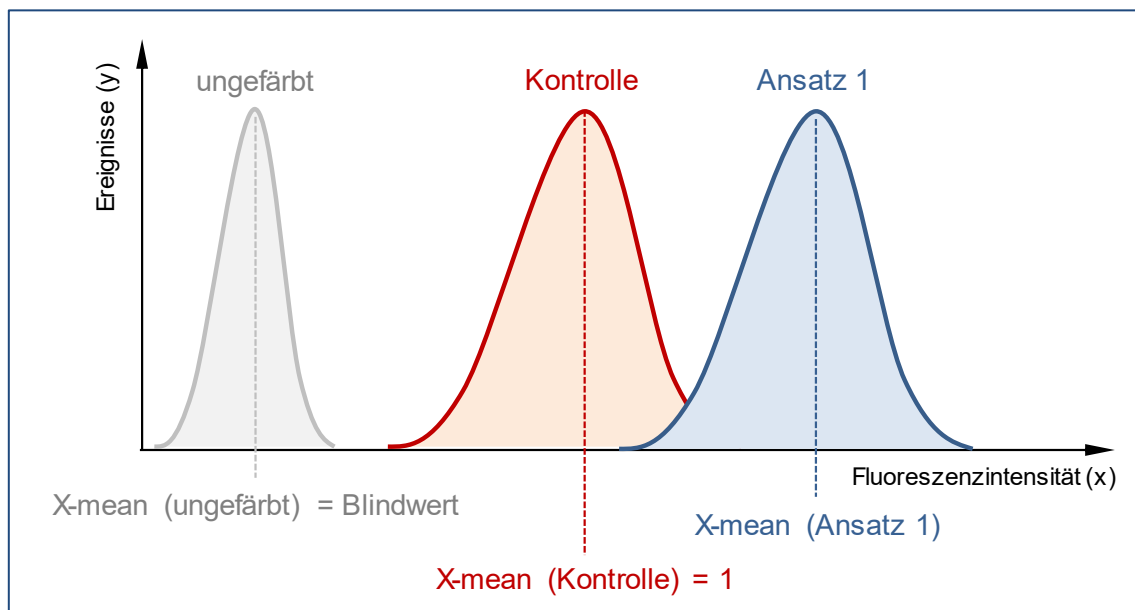


Abbildung 12 – Analyse der Oberflächenmarker anhand von durchflusszytometrischen Histogrammen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (X-mean) der Kontrollzellen wird auf X-mean = 1 normalisiert; die mittlere Fluoreszenzintensität der bestrahlten Proben wird zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Der Blindwert (Betrag der Autofluoreszenz) wurde in jedem Ansatz berücksichtigt.

2.5 Biologische Wirksamkeit

2.5.1 Zellvitalität

Für die kolorimetrische Quantifizierung der Zellvitalität wurde das Reagenz WST-1 eingesetzt – ein Tetrazoliumsalz, das durch die Präsenz von NADH und der mitochondrialen Dehydrogenase zu Formazan reduziert wird. Dieser Vorgang wird durch einen Farbumschlag von hell- zu dunkelrot sichtbar und kann im Mikroplatten-Reader photometrisch gemessen werden. 24 Stunden nach der Bestrahlung mit Photonen oder Neutronen wurden 1×10^4 Zellen/Well in Triplikaten in einer 96-Wellplatte (Volumen: 200 μ l/Well) eingesät. Anschließend wurden 20 μ l der Reagenz WST-1 hinzugefügt und die Wellplatte für zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte mit einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm gegen die Background-Kontrolle. Der

Extinktionswert einer scheinbestrahlten 0 Gy-Kontrolle wurde auf den Wert 1 normalisiert. Alle anderen Bestrahlungsdosen wurden zu der individuellen Kontrolle in Verhältnis gesetzt. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der Unterschiede wurde der Student's *t*-Test (zweiseitig, homoskedastisch) verwendet. P-Werte $\leq 0,05$ gelten als signifikant.

2.5.2 Koloniebildungstest

Zur Bestimmung des klonogenen Überlebens der Zellpopulation wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. Dieser bestimmt die Effizienz von Pharmazeutika und/oder Bestrahlungen, indem das Langzeitüberleben der Zellen über eine Mindestdauer von sechs abgeschlossenen Mitosen (Tage bis Wochen) nach Behandlung dargestellt wird. Die Wachstumsfraktion sowie die Plattiereffizienz eines solchen Versuchs ergeben sich aus dem Verhältnis zwischen ausgesäten Zellen zu Beginn und entstandenen Kolonien am Ende eines Beobachtungszeitraums. Eine Kolonie besteht hierbei aus mindestens 50 Zellen und ist aus einer einzigen ausgesäten Zelle entstanden. Somit demonstriert eine Kolonie die Aufrechterhaltung der Proliferationsfähigkeit einer Zelle unter den gegebenen Versuchsbedingungen.

Die 24 Stunden zuvor mit Neutronen oder Photonen bestrahlten Zellen aus adhärennten Kulturen wurden auf eine definierte Zahl von 200 Zellen/ml eingestellt und je Bestrahlungsdosis in drei T₂₅-Kulturflaschen eingesät (Triplikate) und bei 37 °C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von sechs Mitosen inkubiert. Dies führte bei den schnellproliferierenden MCF10A-Zellen zu einer Inkubationszeit von acht Tagen. Die entstandenen Kolonien wurden dann etwa zehn Minuten mit 70 % Ethanol fixiert und 5-10 Minuten mit Kristallviolett gefärbt. Die Kolonien wurden quantifiziert; Plattiereffizienz und Überlebensfraktion wurden rechnerisch ermittelt (Schmitz, 2011). Die Überlebensfraktionen wurden logarithmisch als Funktion der Bestrahlungsdosis aufgetragen und mit Hilfe des linear-quadratischen Modells (LQ-Modell; Barendsen, 1982) „gefittet“ (siehe Formel (4)).

$$(4) \quad S(D) / S(0) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

Die Variablen α und β werden als Gewebekonstanten bezeichnet. Werte für die relative biologische Wirksamkeit (*relativ biological effectiveness*, RBE) wurden für alle Neutronenstrahlen relativ zur Referenzbestrahlung (Photonen) anhand des

Quotienten aus den Strahlendosen bei einem Zellüberleben von 10 % ($SF = 0,1$) bestimmt (Paganetti *et al.*, 2002) und werden im Folgenden als $RBE_{(SF0,1)}$ bezeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Student-*t*-Test (zweiseitig, homoskedastisch) beurteilt, wobei p -Werte $\leq 0,05$ als signifikant galten.

2.5.3 γ H2AX-Assay zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche (DSB) innerhalb der DNA zählen zu den schwerwiegendsten Folgen von ionisierender Strahlung und können bei fehlerhafter bzw. fehlender Reparatur zum Zelltod führen. Das Histon H2A.X ist eine Variante der Histonfamilie H2A. Kommt es zu einem Doppelstrangbruch innerhalb der DNA wird das Serin an der 139. Stelle dieser Histonvariante phosphoryliert und kann durch eine immunologische Markierung visualisiert werden. Jede Markierung (Focus) entspricht genau einem Doppelstrangbruch und kann präzise gezählt werden.

Um die Immunfluoreszenzfärbung zu ermöglichen, wurden 1×10^4 Zellen direkt nach der Bestrahlung in eine Kammer eines 4-Kammer-Objektträgers ausgesät und 24 Stunden später auf diesem mit einer 2 %-Formaldehydlösung fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran, wurden unspezifische Bindungen geblockt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers gegen das phosphorylierte Histon H2A.X (1:100). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht, um ein besseres Bindungsergebnis zu erzielen. Am Folgetag wurde der Sekundärantikörper appliziert (1:400), der an das Maus-Antigen des ersten Antikörpers bindet und zugleich ein Fluorochrom trägt, das unter dem Fluoreszenzmikroskop, Licht einer Wellenlänge von 594 nm (gelb) absorbiert und im roten Bereich bei einer Wellenlänge von 620 nm (rot) emittiert. Zusätzlich wurden die gefärbten Objektträger mit Vectashield Mounting-Medium eingedeckt, das den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthielt, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert und die Zellkerne blau darstellt. Das Eindeckmedium verhindert das schnelle Ausbleichen der Fluorochrome unter Lichteinfluss sowie bei längerer Lagerung im Dunkeln. Je Ansatz wurden die Foci von 50 Zellkernen in Duplikaten bei 1000-facher Vergrößerung mit einem inversen Mikroskop gezählt. Die Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen wurde aus der Foci-Differenz zwischen bestrahlten Zellen und der dazugehörigen scheinbestrahlten Kontrolle (0 Gy) berechnet und als ΔY (extra

yield) als Funktion der Bestrahlungsdosis grafisch aufgetragen. Durch die Anwendung eines LQ-Modells (siehe Formel (5)) wurden den Daten lineare Funktionsgraphen angepasst (Barendsen, 1982). Für alle Graphen ergibt sich einheitlich ein β -Wert von Null.

$$(5) \quad F(D) = \alpha D + \beta D^2$$

Die resultierenden α -Werte dienten zur Berechnung des RBE-Wertes (Franken *et al.*, 2011) und werden im Folgenden als $RBE_{(foci\ 24h)}$ bezeichnet. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der Unterschiede wurde der Student's *t*-Test (zweiseitig, homoskedastisch) verwendet; p-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant.

2.6 Analyse von Genom, Transkriptom und Proteom

Das Genom, die Gesamtheit der Gene eines Individuums ist weitestgehend statisch. Jede gesunde Zelle eines Körpers besitzt den gleichen genetischen Code. Das Proteom hingegen ist dynamisch und dem Einfluss äußerer Faktoren unterlegen. Es ist die Gesamtheit der exprimierten Proteine eines Körpers zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen. In Anlehnung dessen ist das Transkriptom die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiven, exprimierten Gene einer Zelle (*Lexikon der Biologie*, 2020). Alle drei Komponenten wurden mit unterschiedlichen Methoden untersucht, die im Folgenden beschrieben werden.

2.6.1 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) zur Analyse von Tumorsuppressorgenen

Mutationen und andere Defekte in tumorsupprimierenden Genen können ein Auslöser für die Entstehung von Krebserkrankungen sein. Kommt es zu Beeinträchtigungen innerhalb dieser Gene, die eine Änderung der Expressionsrate zu Folge hat, z. B. aufgrund von ionisierender Strahlung, so kann dies durch eine Genexpressionsanalyse mit dem Verfahren der quantitativen Real Time-PCR nachgewiesen werden. Mit Hilfe von TaqMan® Gene Expression Assays wurden die Gene *RB1*, *CDKN1B* (auch: *p27*) und *TP53* analysiert. Hierfür wurde 72 Stunden nach erfolgter Bestrahlung ein trockenes Zellpellet von etwa 1×10^6 Zellen hergestellt und

die RNA mit dem NucleoSpin RNA Kit laut Herstellerangaben isoliert. Der RNA-Gehalt wurde mittels photometrischer Messung mit einer Mikrolitermesszelle im Biophotometer bei 260 nm bestimmt. Als Blindwert diente RNase-freies Wasser, das ebenfalls als Lösungsmittel für die RNA verwendet wurde. Blindwert und RNA wurden zur Messung 1:10 mit Tris-HCl-Puffer verdünnt. Anschließend erfolgte die Synthese der cDNA mit Hilfe des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits* laut Herstellerangaben im Thermomixer. Das cDNA-Produkt konnte direkt für die anschließende PCR genutzt werden. TaqMan®-Assays und Master Mix wurden mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und gemeinsam mit der cDNA in Triplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit einer adhäsiven Folie versiegelt. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte im ABI 7300 Real Time-PCR System mit dem in Tabelle 5 aufgeführten Programm.

Tabelle 5 – Ablauf des Programms zur Polymerase-Kettenreaktion im ABI 7300 Real Time-PCR System

Schritt	Temperatur	Zeit [mm:ss]	Periode
1. Denaturierung	95 °C	10:00	1x
2. Annealing	95 °C	00:15	} 40 Zyklen
3. Elongation	60 °C	01:00	

Mit jedem Elongationsschritt steigt die Fluoreszenzintensität des Zielprodukts und kann einen bestimmten Schwellenwert (quantitativ) überschreiten. Die Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus in Echtzeit gemessen (Real Time). Die daraus folgenden C_t -Werte (Zyklus des Schwellenwertes) wurden für die Auswertung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Hierbei wird die Veränderung der Verdopplungsrate (eine Verdopplung = ein Zyklus) relativ im Vergleich zu einem Referenzgen betrachtet, dass bezüglich der durchgeführten Behandlung unverändert bleibt. Als Housekeeping-Gen (Referenz) wurde GAPDH verwendet. Die grafisch dargestellte Änderung der Genexpression wurde mit dem binären Logarithmus (\log_2) der *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) von mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Mit Hilfe des Einstichproben- t -Tests wurde die statistische Signifikanz bewertet. Ein p -Wert $\leq 0,02$ zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied an.

2.6.2 RT² Profiler PCR-Array zur Analyse onkologisch relevanter Signalwege

Für die Analyse von Genen aus Signalwegen, die bekanntermaßen bei der Entstehung von Krebserkrankungen involviert sind, wurde das *Human Cancer PathwayFinder* PCR-Array verwendet. Auf einer 96-Well-Platte befanden sich 84 zu untersuchende Gene (A1-G12) sowie zwölf zusätzliche Wells, die Housekeeping-Gene und interne Kontrollen enthielten (Genliste siehe Anhang Tabelle 15). Die cDNA-Synthese für das Array erfolgte mit der zuvor isolierten RNA (siehe Kapitel 2.6.1) und dem *RT² First Strand Kit* laut Angaben des Herstellers. Das Array wurde mit Ansätzen durchgeführt, die mit 0,85 Gy der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen exponiert wurden und den dazugehörigen unbestrahlten Kontrollen. Die cDNA eines einzelnen Ansatzes wurde zusammen mit dem *RT² SYBR Green Master Mix* und Nuklease-freiem Wasser in alle 96 Wells der vorgefertigten Array-Platte pipettiert. Die PCR erfolgte im ABI 7300 Real Time-PCR-System. Die Arrays wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Als Housekeeping-Gen wurde RPLP0 verwendet. Mit der Darstellung des negativen dekadischen Logarithmus der p-Werte in Abhängigkeit des binären Logarithmus der *fold change* im *volcano plot*, wird die Beziehung von Signifikanz und Expressionsänderung veranschaulicht. Mit Hilfe des Student's *t*-Tests (zweiseitig, homoskedastisch) wurde die statistische Signifikanz bewertet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied an.

2.6.3 Mikro-RNA-Analyse

In Zusammenarbeit mit dem Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung (Abteilung Funktionelle Genomforschung) der Universitätsmedizin Greifswald wurde die Analyse der Mikro-RNA (miRNA, miR) durchgeführt. Auch hier wurden Zellen untersucht, die mit 0,18 Gy; 0,43 Gy und 0,90 Gy der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen bestrahlt wurden sowie die dazugehörige unbestrahlte Kontrolle (0 Gy).

Die Probensammlung erfolgte 30 Minuten, 48 Stunden und sieben Tage nach Bestrahlung. Ein trockenes Pellet von ca. 1×10^6 Zellen wurde in QIAzol Lysisbuffer aufgenommen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach dem Versand des Zellmaterials auf Trockeneis

wurden die nachfolgenden Schritte durch Mitarbeiter der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt:

Die Gewinnung der Mikro-RNA erfolgte mit dem *miRNeasy Mini Kit* laut Herstellerprotokoll. Hiermit wurde die Gesamt-RNA aus den Zelllysaten gewonnen und die miRNA aufgereinigt. Durch ein vorheriges *Clustern* der einzelnen Proben mittels Genespring-Software wurde der 30-Minuten-Zeitpunkt für weitere Auswertungen ausgeschlossen. Nach der Konzentrations- und Qualitätsbestimmung erfolgte das Profiling von 100 ng RNA mit dem *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* von Agilent laut Angaben des Herstellers. Die Rohdaten wurden mittels *Genespring GX Software* von Agilent an der Universitätsmedizin Greifswald gesammelt. Da die Triplikate der Bestrahlungsgruppen für die Messung gepoolt wurden, konnte kein statistischer Test für die Sicherheit der Werte angewandt werden. Stattdessen wurden, nach Absprache mit uns, für die Validierung limitierende Grenzwerte und Filter in der *Genespring GX Software* verwendet: Der *fold change* als relativer Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 Gy) musste mindestens einen Wert von 2 erreichen und der Flag-Filter wurde ebenfalls auf einen Wert von 2 festgelegt. Der Flag-Filter basiert auf den Qualitätseigenschaften der Probenwerte und kann die Werte 0 (Merkmal ist nicht positiv und nicht signifikant im Vergleich zur Probe bzw. nicht über dem Hintergrund), 1 (Merkmal ist nicht einheitlich in den zu vergleichenden Gruppen, möglicherweise Ausreißer) oder 2 (Merkmal ist eineindeutig in beiden Gruppen präsent) annehmen. Für einige Gene wurden die Ergebnisse mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) überprüft und bestätigt.

Die Datenverarbeitung der von der Universitätsmedizin Greifswald zur Verfügung gestellten Rohdaten wurde durch mich selbst mit Hilfe von Excel (Microsoft) durchgeführt. Eine Datenbank mit 2.549 humanen miRNA (miRBase database, release 21.0) wurde zusammen mit den von der Genespring GX Software gesammelten Rohdaten und Filterwerten an mich versendet. Die Auswertung dieser Daten zur Erstellung der Abb. 24, 25 und 26 erfolgte durch mich; ebenso wie die Anfertigung der Heat-Maps und Venn-Diagramme mittels Excel.

2.6.4 Proteomanalyse

Die Proteomanalyse wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung (Abteilung Funktionelle Genomforschung) der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt. Analysiert wurden Zellen, die mit 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen exponiert wurden sowie die dazugehörigen unbestrahlten Kontrollen (0 Gy).

Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die MCF10A-Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten – 30 Minuten, 48 Stunden und sieben Tage – gesammelt und ein trockenes Pellet von ca. 1×10^6 Zellen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Der Versand nach Greifswald erfolgte innerhalb von 18 Stunden auf Trockeneis. Die nachfolgenden Schritte wurden durch Mitarbeiter der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt:

Hier wurden nach dem Auftauen des Zellmaterials die Proteine mit Hilfe eines Solubilisierungspuffers und eines standardisierten *Freeze-Thaw*-Protokolls aufgeschlossen und gelöst. Die Nukleinsäure-Fragmentierung wurde durch eine Ultraschallbehandlung erreicht. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt. Als Proteinstandard wurde in Solubilisierungspuffer gelöstes BSA verwendet. Eine Proteinmenge von 3 µg wurde reduziert und alkyliert und mit Trypsin über Nacht bei 37 °C hydrolysiert. Die Peptidlösung wurde mit C18-Material (µZipTip®-C18) aufgereinigt und entsalzt. Die anschließende Analyse erfolgte durch eine LC-ESI-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Electrosprayionisation-Tandemmassen-spektrometrie) – ein Verfahren das eine HPLC (*high pressure liquid chromatography*) mit einem ESI-Massenspektrometer koppelt, bei dem die Peptidlösungen mittels Elektrosprayionisation (ESI) vernebelt bzw. ionisiert werden. Die HPLC wurde mit dem *Acquity UPLC system* und einer geringen Flussrate von 300 nL/min durchgeführt. Die Massenspektrometrie erfolgte mit einem *LTQ Orbitrap Velos*. Die Proteinidentifikation aus den chromatografischen Mustern (Rohdaten) und die Quantifizierung der relativen Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels *Rosetta Elucidator Software* sowie *Gene Data Analyst*. Die Software legt einen sicheren Unterschied ab einem *fold change* von 1,3 bzw. -1,3 fest.

Bei einer gemeinsam mit Mitarbeitern in Greifswald durchgeführten Datenbank-Recherche in „Uniprot_Sprot_human_rel. 2016_05“ mit Parametern wie „Oxidation von Methionin“ und „Carbamidomethylation von Cystein“ wurden aus 223.262 detektierten Merkmalen (*features*) 2.287 Proteine (*hits*) mit mehr als einer Peptidmodifikation (\geq zwei Peptide) identifiziert.

Die weiteren Datenanalysen der in Greifswald auf 2.287 Proteine reduzierten Datenbank erfolgte in Rostock durch mich mit Hilfe von Excel. So wurde die Datenbank nochmals gefiltert und analysiert (Abb. 27 und 28). Da für jede Dosis und jeden

Zeitpunkt drei unabhängige Proben vorlagen, wurde der gepaarte t-test angewendet. Werte von $p \leq 0,05$ galten als signifikant. Ein sogenanntes *Grouping* wurde mit dem Programm Cytoscape (Version 3.4.0, San Diego, USA) vorgenommen.

2.7 Materialien

Tabelle 6 – Zellkulturmedium und Zusätze

Bestandteil	Hersteller
Grundmedium	
DMEM/F-12 (1:1 Mix of DMEM and Ham's F-12, 1x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Zusätze	
Insulin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydrocortisone (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
h-EGF (100 µg/ml)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Choleratoxin (1 mg/ml) (von <i>Vibrio cholerae</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pferdeserum	Gibco® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (1 x 10 ⁴ Units Penicillin, 10 mg Streptomycin/mL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 7 – Chemikalien und Lösungen

Bestandteil	Hersteller
Kristallviolett-Färbelösung	
Crystal Violet (1 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	
5x PBS (Phosphate Buffered Saline)	
Natriumchlorid (NaCl, 137 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 2 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl, 2,7 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua bidest.(ad 1000 ml)	
1x PBS (pH 7,4)	
5x PBS	siehe oben
Aqua bidest.	
Fixierungslösung für γH2AX-Färbung	
Formaldehyd (2 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1x PBS	siehe oben
Permeabilisierungslösung für γH2AX-Färbung	
Glycine (0,1 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TritonX-100 (0,25 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1x PBS	siehe oben
Blockierungslösung für γH2AX-Färbung	
Ziegen-Serum (2 %)	PAA, Pasching, Austria
Bovine Serum Albumin (1 %)	PAA, Pasching, Austria
Tween® 20 (0,01 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1x PBS	siehe oben
Solubilisierungspuffer für Proteomanalyse	
Urea 8 mol/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Thiourea 2 mol/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	
Lysispuffer für miRNA-Analyse	
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland

2-Mercaptoethanol (1 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
weiteres	
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 500 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution (0,25 %/0,02 % w/v) in PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
Nuclease-free Water, 1000 ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
BD Pharmingen™ Stain Buffer (BSA), 500 ml	BD, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 8 – Kits und Assays

Kit/Assay	Hersteller
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
NucleoSpin RNA	MACHERY-NAGEL GmbH & Co KG, Düren, Deutschland
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
20X TaqMan® Gene Expression Assay, Hs00608519_m1	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
20X TaqMan® Gene Expression Assay, Hs02758991_g1	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
20X TaqMan® Gene Expression Assay, Hs01034249_m1	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
20X TaqMan® Gene Expression Assay, Hs01597588_m1	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland

20X TaqMan® Gene Expression Assay, Hs01078066_m1	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
RT² First Strand Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT² Profiler PCR Array (96-Well Format), Human Cancer PathwayFinder	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT² SYBR Green ROX™ qPCR Mastermix	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce™ (Bradford) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
miRNeasy Micro Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 9 – Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-phospho-Histone H2A.X Antibody (Mouse)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG	Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI	VECTOR LABORATORIES LTD., Peterborough, UK
Anti-EpCAM PE, Clone EBA-1 (ASR)	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Mouse Anti-Human MUC1 (CD227), Clone HMPV (RUO)	BD, Heidelberg, Deutschland
7-AAD Viability Staining Solution	BioLegend, Fell, Deutschland

Tabelle 10 – Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cellstar® Polypropylen Röhrchen, 50 ml und 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zellkulturflaschen, 75 cm² und 25 cm²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikroplatten, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Corning® Costar® Ultra-Low attachment multiwell plates (6 Well)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Objektträger Superfrost (Menzelgläser)	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Multiply®-µStrip Pro, 8er Kette, PCR clean	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
µZipTip® C18 (Millipore)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 11 – Geräte und Software

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse II, Herasafe KSP18	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad (Inkubations-/ Inaktivierungsbad) GSL 1008	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Mikroskop Nikon TE 300	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Zellzählgerät Coulter Counter Z2	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Schüttler Stuart™ Gyrotory rocker SSL3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DNA/RNA UV-cleaner box UVT-B-AR	Biosan über Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland

Variomag® Electronicrührer Monotherm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mikroliterzentrifuge Mikro 200 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Mikroplatten-Reader anthos zenyth 340 r	anthos Microsysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Labor-pH-Meter CG 841	SCHOTT-Geräte GmbH, Mainz, Deutschland
Zentrifuge Peqlab® PerfectSpin Mini	VWR, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Rotofix 32A	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Genie® 2	VWR, Darmstadt, Deutschland
Cytomics FC 500	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
LabelGuard Mikroliter Messzelle, Paket mit 0,2-1 mm Pfadlänge-Deckel	Implen GmbH, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ABI 7300 Real Time-PCR System	Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland
Software	Entwickler
7300 System SDS RQ Study Software	Applied Biosystems® by Thermo Scientific™, Darmstadt, Deutschland
CXP Software Version 2.2 Analysis	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CXP Software Version 2.2 Cytometer	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Cytoscape Version 3.4.0	Cytoscape Consortium, San Diego, USA
ClueGOPlugin	INSERM, Paris, Frankreich
Genespring GX software	Agilent, Santa Clara, USA

3 Ergebnisse

Innerhalb dieser Arbeit wurde der akute und langfristige Effekt von Neutronenstrahlung auf gesunde humane Brustzellen betrachtet. Dazu wurden Zellen der Linie MCF10A mit Neutronen verschiedener Qualitäten behandelt und die Effekte mit der Wirkung von 220 kV Photonen verglichen. Die Daten der Photonenbestrahlungen sind in der Dissertation von Dajana Juerß (Universitätsmedizin Rostock) zu finden und dienen in der vorliegenden Arbeit als Referenz für die Neutronenexpositionen. Zur Beurteilung der Auswirkungen wurden verschiedene Experimente 30 Minuten, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden sowie sieben Tage nach erfolgter Strahlenexposition durchgeführt (Ablauf der Experimente, siehe Abbildung 11). Als Kontrolle wurden jeweils unbestrahlte Zellen mitgeführt.

Zunächst sollten die gesunden humanen Brustzellen und der ihnen innewohnende Stammzellphänotyp validiert werden (Abschnitt 3.1). Hierzu wurden die Sphärenbildungskapazität sowie die Ausprägung von Oberflächenmarkern der humanen Brustzellen als Kriterien für einen Stammzellcharakter betrachtet. Die Ergebnisse zur biologischen Wirksamkeit von Neutronen auf die Zelllinie MCF10A werden bezüglich der Parameter Vitalität, klonogenes Überleben und Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen relativ zu einer 220 kV Photonenbestrahlung in Abschnitt 3.2 dargestellt. Anschließend werden tiefer gehende Experimente zur Beurteilung der Auswirkungen von Neutronen auf spezifische Gene, Transkriptionsprodukte und Proteine beschrieben (Abschnitt 3.3).

3.1 Validierung der MCF10A-Zellen als Modellsystem

Die Zelllinie MCF10A beinhaltet eine Stammzell-ähnliche Subpopulation, die die dreidimensionale Ausbildung von Mammosphären, aufgrund der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ermöglicht. Ebenfalls eine Eigenschaft, die den Stammzell-Phänotyp unterstreicht, ist die Expression der Oberflächenmarker EpCAM und MUC-1 (EpCAM⁺ MUC-1⁺), die unter anderem einen großen Teil der Bruststammzellen charakterisieren (70 % lt. Stingl, 2009). Diese Eigenschaften wurden unter unbestrahlten Kontrollbedingungen und infolge von Bestrahlung untersucht.

3.1.1 Sphärenbildung

Die Fähigkeit zur Sphärenbildung infolge einer Strahlenexposition wurde mit Hilfe eines speziellen Kultivierungsverfahrens untersucht. Bereits zwei Tage nach dem Bestrahlungszeitpunkt war die Ausbildung von Sphären aus den 24 Stunden zuvor eingesäten Einzelzellen zu erkennen (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Da über den gesamten Beobachtungszeitraum kein Mediumwechsel erfolgte und somit auch keine Erneuerung der Nährstoffe, kam es nach kurzer Zeit zum Absterben der Zellen und somit zum Niedergang der Sphären. Dargestellt ist die Entwicklung der absoluten Sphärenanzahl über einen Zeitraum von acht Tagen (Tag 1-8 nach Bestrahlung).

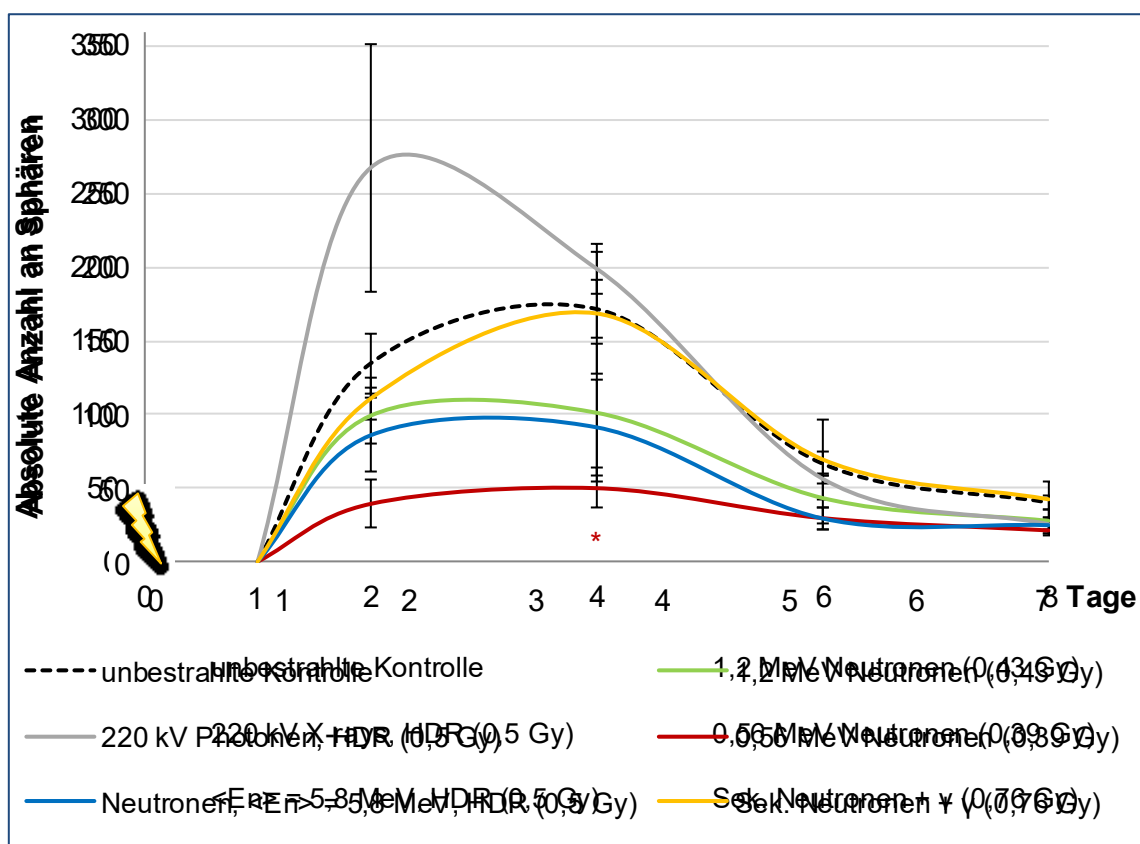


Abbildung 13 – Absolute Anzahl an gebildeten Sphären der MCF10A-Zellen 2-8 Tage nach Exposition mit mittleren Strahlendosen von 0,39 Gy bis 0,76 Gy unterschiedlicher Strahlenqualitäten. Dargestellt ist MW ± SD (n = 3, unbestrahlte Kontrolle: n = 21); * p ≤ 0,05 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Unbestrahlte MCF10A-Zellen in der Kontrolle zeigten bereits 24 Stunden nach der Einsaat als Einzelzellsuspension (2 Tage nach „Scheinbestrahlung“) eine starke Sphärenbildungsfähigkeit (135 ± 20 Sphären), die in den folgenden zwei Tagen nochmals auf 172 ± 20 Sphären anstieg. Anschließend erfolgte ein rascher Abfall der Sphärenanzahl auf 67 ± 8 bis 40 ± 4 Sphären an Tag 6 bzw. Tag 8.

Mittlere Dosen von 0,43 Gy und 0,5 Gy der 1,2 MeV bzw. $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV Neutronen hatten bereits eine Senkung der Sphärenbildungsfähigkeit auf etwa 50-70 % der Kontrollgruppe (an Tag 2 und 4) bewirkt.

Eine monoenergetische Neutronenstrahlung mit einer niedrigeren Energie von 0,56 MeV löste mit einer Dosis von 0,39 Gy eine signifikante Reduktion der Sphärenbildung an Tag 4 aus. Die absolute Zahl der gebildeten Sphären betrug 50 ± 14 . Dies entsprach einer Senkung von über 70 % im Vergleich zur Kontrolle (172 ± 20). Auch an Tag 2 konnte eine um etwa 70 % reduzierte Sphärenbildung beobachtet werden, jedoch war diese nicht signifikant.

Eine Dosis von 0,76 Gy der sekundären Neutronen + γ -Strahlung ($\sim 0,5$ Gy Neutronenanteil) hatte kaum eine Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zur Folge.

Eine mittlere Dosis (0,5 Gy) der 220 kV Photonenstrahlung bewirkte sogar einen Anstieg der Sphärenbildung, besonders an Tag 2 (267 ± 84), der jedoch nicht signifikant war.

Um die beobachteten Effekte zu verstärken wurden die Neutronen- und Photonendosen erhöht und auch Bestrahlungen mit einer Niedrigdosisrate (LDR) eingesetzt. Die in Abbildung 13 dargestellte Kontrollgruppe (gestrichelte schwarze Linie) ist identisch zur vorherigen Kontrolle (siehe Abbildung 13).

Die Erhöhung der Dosis der Neutronen mit breiter Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV, HDR) von 0,5 Gy auf 1 Gy verstärkte die bisher beobachtete Tendenz. Die Sphärenbildung war im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 2 um etwa 60 % reduziert (54 ± 7 , im Vgl. Kontrolle: 135 ± 20). An Tag 4 war dieser Effekt nochmals stärker ausgeprägt. Eine signifikant niedrige Sphärenbildung wurde mit nur 45 ± 14 Sphären im Vergleich zu 172 ± 20 Sphären der Kontrollgruppe deutlich. Wurde die Dosis von 1 Gy der Neutronen mit breiter Energieverteilung mit einer Niedrigdosisrate appliziert, so war der reduzierende Effekt wie bei der HDR-Bestrahlung nicht mehr ersichtlich. Die absolute Anzahl an Sphären war an Tag 2 und 4 tendenziell nur um etwa 30 % reduziert.

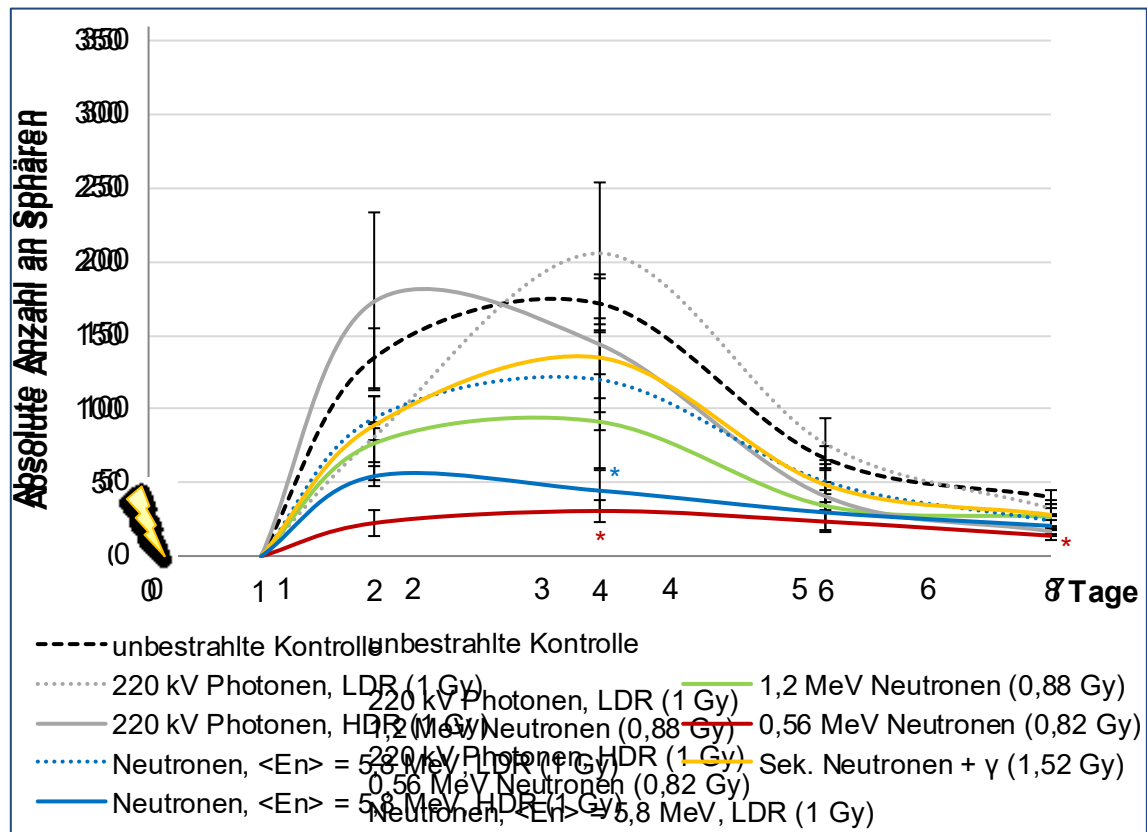


Abbildung 14 – Absolute Anzahl an gebildeten Sphären der MCF10A-Zellen 2-8 Tage nach Exposition mit höheren Strahlendosen von 0,82 Gy bis 1,52 Gy unterschiedlicher Strahlenqualitäten. Dargestellt ist $MW \pm SD$ ($n = 3$, unbestrahlte Kontrolle: $n = 21$); * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Ähnlich ist der Verlauf der Sphärenbildung infolge einer Exposition mit einem gemischten Neutronen- γ -Feld mit einer Dosis von 1,52 Gy (~ 1 Gy sekundärer Neutronenanteil). Die Dosisverdopplung von 0,76 Gy auf 1,52 Gy erzielte eine etwa 20 % stärkere Reduktion der Sphärenbildungsfähigkeit.

Eine Dosiserhöhung von 0,43 Gy auf 0,88 Gy der 1,2 MeV monoenergetischen Neutronen zeigte keine deutliche Veränderung der bisher beobachteten Wirkung. Die zuvor erreichte Reduktion der Sphärenbildung wurde tendenziell nur geringfügig an Tag 2 verstärkt.

Deutliche Wirkung zeigte die Erhöhung der Dosis von 0,39 Gy auf 0,82 Gy der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen. Wie auch bei der mittleren Dosis konnte hier die stärkste Beeinflussung der Sphärenbildungsfähigkeit beobachtet werden. War die Sphärenbildung an Tag 2 und 4 im Vergleich zur Kontrolle bereits bei einer mittleren Dosis um etwa 70 % reduziert, so wurde diese Wirkung nochmals um mehr als 10 % verstärkt. Die Anzahl der Sphären betrug an Tag 2 nur noch 23 ± 9 und an Tag 4 nur 31 ± 7 .

Infolge der Erhöhung der Dosis von 0,5 Gy auf 1 Gy der Photonenstrahlung (HDR) war die tendenzielle Steigerung der Sphärenbildungskapazität, die im Vergleich zur Kontrolle an Tag 2 auftrat (Abbildung 13), nicht mehr zu erkennen (Abbildung 14). Wird die gleiche Dosis von 1 Gy mit einer Niedrigdosisrate appliziert, wurde eine zeitliche Verschiebung der Sphärenbildung deutlich. Im Gegensatz zur HDR-Photonenbestrahlung (Tag 2: 173 ± 61 Sphären) ist die höchste Anzahl an Sphären bei der LDR-Strahlung erst an Tag 4 zu erkennen (206 ± 48 Sphären).

Generell war zu erkennen, dass alle Neutronenstrahlen einen stärkeren Einfluss auf die Sphärenbildung der MCF10A-Zellen hatten als die Referenzstrahlung der Photonen mit 220 kV. Eine Neutronenexposition verursachte überwiegend eine Einschränkung der Sphärenbildungskapazität.

3.1.2 Analyse von Oberflächenmarkern/Stammzellmarkern

Zur Untersuchung der Ausprägung der Oberflächenmarker EpCAM und MUC-1 wurde eine spezifische Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern durchgeführt, die mit Hilfe des Durchflusszytometers detektiert werden konnten. Die transmembranen Proteine EpCAM und MUC-1 sind in Stammzellen, adulten gesunden Zellen und in Krebszellen unterschiedlich exprimiert und wurden nach Bestrahlung und unter unbestrahlten Kontrollbedingungen quantifiziert. Die folgenden Darstellungen (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16) zeigen die strahleninduzierten Veränderungen der Fluoreszenzintensität und somit der Expression von EpCAM und MUC-1 in bestrahlten Zellen im Verhältnis zu individuellen scheinbestrahlten Kontrollen, deren Wert auf $X\text{-mean} = 1$ normiert wurde. Ist die Ausprägung des Proteins in einem Ansatz z. B. um das doppelte erhöht, so wird dies durch einen Wert von $X\text{-mean} = 2$ gekennzeichnet. $X\text{-mean} = 0,5$ bedeutet eine um die Hälfte reduzierte Expression des Membranproteins im Vergleich zur Kontrolle.

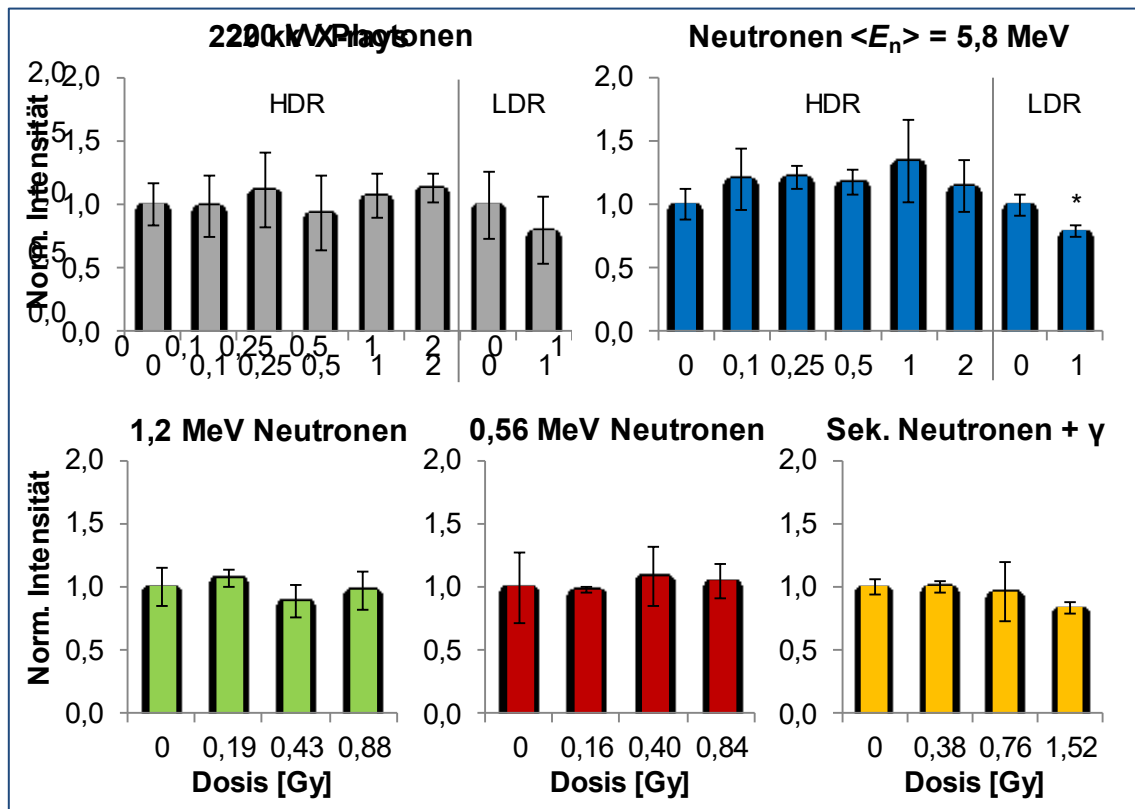


Abbildung 15 – Fluoreszenzintensität EpCAM-exprimierender MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten. Dargestellt ist $MW \pm SD$ (Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR), 1,2 MeV Neutronen, 0,56 MeV Neutronen, sek. Neutronen + γ : $n = 3$, Photonen (HDR, LDR): $n = 4$, Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (HDR): $n = 5$); * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur 0 Gy-Kontrolle; HDR – high dose rate, LDR – low dose rate.

Die Bestrahlung der Ansätze mit monoenergetischen Neutronen mit einer Energie von 0,56 MeV bzw. 1,2 MeV verursachte keine deutlichen Veränderungen der Fluoreszenzintensität. Sie war in den EpCAM-gefärbten Zellen in allen Gruppen nahezu konstant im Vergleich zur scheinbestrahlten Kontrolle. Die Exposition der Zellen mit einem gemischten Feld aus sekundären Neutronen und γ -Strahlen löste ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der Fluoreszenzintensität aus.

Die Zellbestrahlung mit Neutronen einer breiten Energieverteilung, appliziert mit einer Hochdosisrate, löste ebenfalls keine deutlichen Expressionsunterschiede auf. Einzig eine LDR-Neutronenbestrahlung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) resultierte in einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenzintensität auf 0,79 und somit eine verminderte Präsenz des Proteins EpCAM.

Die Anzahl EpCAM-exprimierender Zellen ist aufgrund der Photonenstrahlung von 220 kV (HDR und LDR) kaum verändert. Eine tendenziell reduzierte

Fluoreszenzintensität infolge der 1 Gy LDR-Bestrahlung zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

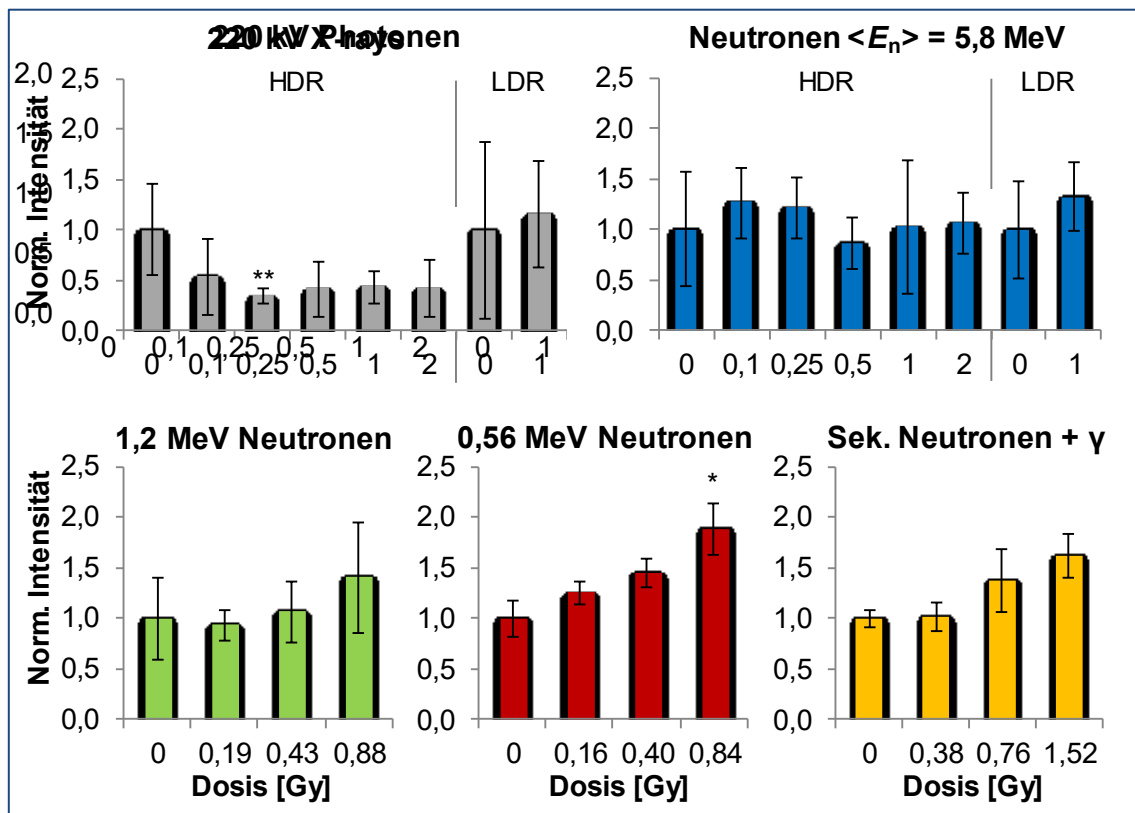


Abbildung 16 – Fluoreszenzintensität MUC-1-exprimierender MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten. Dargestellt ist MW ± SD (Photonen (HDR), Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR), 1,2 MeV Neutronen, sek. Neutronen + γ : $n = 3$, Photonen (LDR), Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (HDR), 0,56 MeV Neutronen: $n = 4$); * $p \leq 0,02$, ** $p \leq 0,01$ im Vergleich zur 0 Gy-Kontrolle; HDR – high dose rate, LDR – low dose rate.

Eine Exposition der Zellen mit Neutronen einer breiten Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) verursachte keine eindeutigen Veränderungen in der Fluoreszenzintensität – unabhängig von der Applikationsart mit Hoch- oder Niedrigdosisrate.

Monoenergetische Neutronen mit einer Energie von 0,56 MeV indizierten einen dosisabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die höchste Dosis dieser Bestrahlungsart von 0,84 Gy führte zu einer signifikant erhöhten Präsenz von MUC-1 mit einem Wert von 1,89 im Vergleich zur Kontrolle. Auch die monoenergetischen Neutronen mit einer etwas höheren Energie von 1,2 MeV sowie die sekundären Neutronen + γ zeigten einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, der jedoch nicht signifikant war.

Die Präsenz des Oberflächenproteins MUC-1 und somit die Fluoreszenzintensität nahm infolge der Referenzbestrahlung der Zellen mit 220 kV Photonen (HDR) um etwa die Hälfte ab. Eine Dosis von 0,25 Gy führte sogar zu einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenzintensität auf einen Wert von 0,34. Die Photonenstrahlung, appliziert mit einer Niedrigdosisrate, löste keine erkennbaren Effekte aus.

3.2 Biologische Wirksamkeit der Neutronenstrahlung

Trifft ionisierende Strahlung auf eine Zelle wird die Strahlungsenergie von den Molekülen der Zelle absorbiert. Die aufgenommene Energie kann vielfältige Auswirkungen hervorrufen. Die Art der Strahlung und die Strahlendosis bestimmen die biologische Wirksamkeit und somit das Ausmaß der Strahlenbelastung auf den Organismus. Zur Beurteilung der biologischen Wirksamkeit der untersuchten Strahlung wurde zunächst die metabolische Vitalität der bestrahlten Zellen bestimmt sowie die Überlebensfraktion und DNA-Defekte in Form von Doppelstrangbrüchen betrachtet.

3.2.1 Vitalität von Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung

Zur Bestimmung der Rate vitaler Zellen wurde 24 Stunden nach Bestrahlung eine photometrische Messung an MCF10A-Zellen mittels des Reagenz WST-1 durchgeführt. Die gemessene Extinktion der unbestrahlten Kontrolle wurde auf den Wert 1,0 normalisiert. Alle folgenden Bestrahlungsdosen beziehen sich auf ihre individuelle 0 Gy-Kontrolle (siehe Abbildung 17).

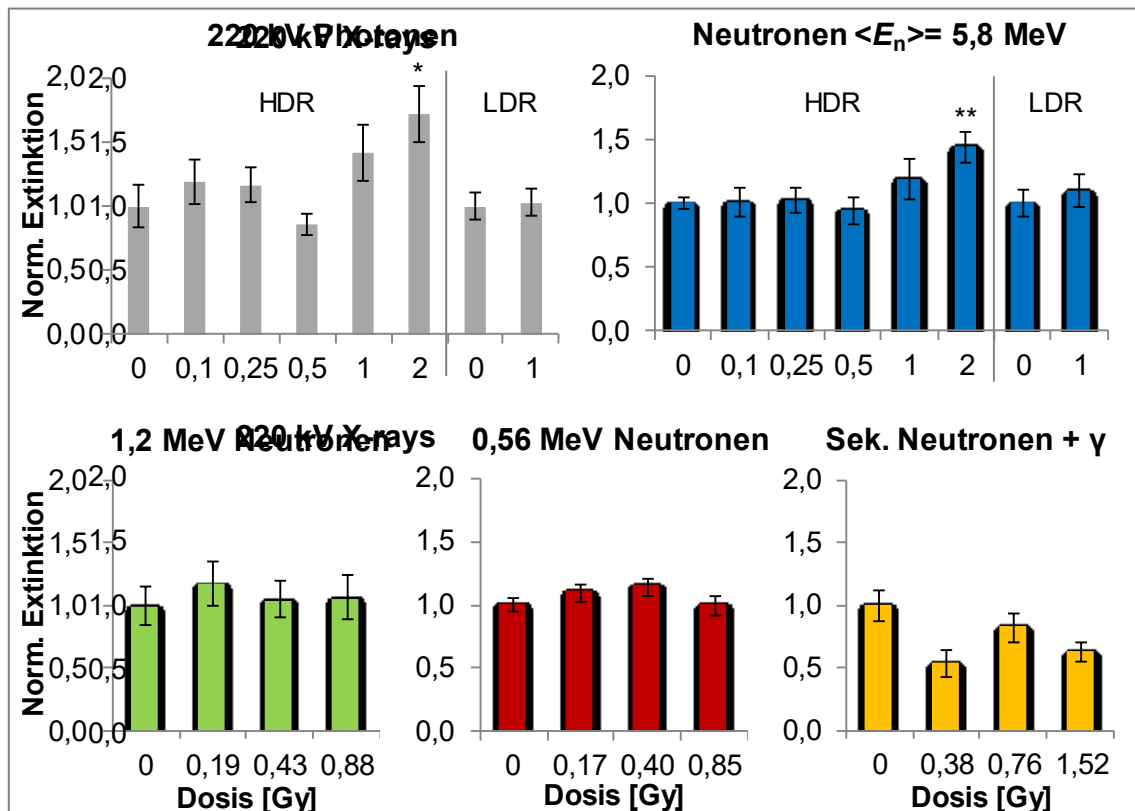


Abbildung 17 – Vitalität der MCF10A-Zellen 24 Stunden nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten. Dargestellt ist der normalisierte MW ± SD. (Photonen (LDR, HDR), 1,2 MeV Neutronen, 0,56 MeV Neutronen, sek. Neutronen + γ: n = 3, Neutronen <E_n> = 5,8 MeV (LDR, HDR): n = 4,); * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 im Vergleich zur 0 Gy-Kontrolle; HDR – high dose rate, LDR – low dose rate.

Die Exposition mit 2 Gy Neutronen einer breiten Energieverteilung von durchschnittlich 5,8 MeV (HDR) bewirkten 24 Stunden später eine signifikante Erhöhung der Vitalität (1,4). Im Gegensatz dazu gab es keine Änderung der metabolischen Aktivität infolge einer 1 Gy LDR-Bestrahlung.

Die metabolische Aktivität der humanen gesunden Brustzellen ist 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen (1,2 MeV und 0,56 MeV) im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert.

Werden die MCF10A-Zellen mit einem Feld aus „realen“ sekundären Neutronen und γ-Strahlen exponiert, so ist die Vitalität der Zellen teilweise signifikant um nahezu 50 % reduziert (0,5 nach 0,38 Gy). Auch höhere Neutronendosen bewirken hier eine Reduktion der Vitalität (0,6 nach 1,52 Gy).

Infolge einer Bestrahlung der humanen Brustzellen mit 220 kV Photonen (HDR) mit einer Dosis von 2 Gy war die Vitalität signifikant erhöht (1,7). Auch bereits bei 1 Gy schien die Vitalität tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht zu sein (1,4). Eine LDR-

Bestrahlung hatte jedoch wie auch bei der LDR-Neutronenbestrahlung keinen ersichtlichen Effekt.

3.2.2 Überlebensfraktionen

Die Beurteilung des Langzeitüberlebens der gesunden humanen Brustzellen nach Bestrahlung erfolgte mittels eines Koloniebildungstest. Unter Verwendung des LQ-Modells wurde ein Funktionsgraph für jede Strahlenqualität erstellt (siehe Abbildung 18). Die resultierenden α -Werte der linear-quadratischen Funktion sowie die Werte für die relative biologische Wirksamkeit (RBE), die in Relation zur LDR-Photonenbestrahlung berechnet wurden, sind in Tabelle 12 (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 66) zu finden.

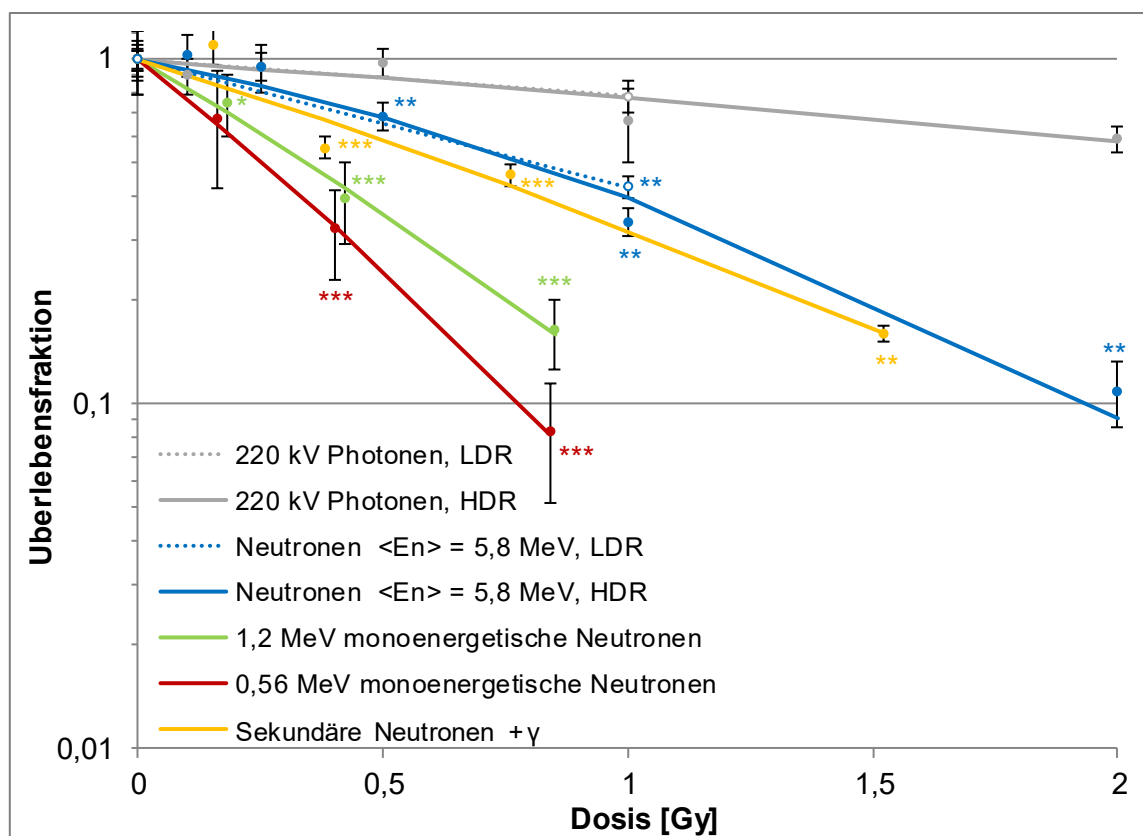


Abbildung 18 – Klonogenes Überleben der MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten. Dargestellt ist der MW \pm SEM (Photonen (LDR, HDR), Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR), sek. Neutronen + γ : $n = 3$, Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (HDR), 0,56 MeV Neutronen: $n = 4$, 1,2 MeV Neutronen: $n = 5$). Die Kurven wurden mit dem LQ-Modell gefittet ($S(D) / S(0) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$). Die Signifikanzen beziehen sich auf die Referenzstrahlung 220 kV Photonen (LDR): * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; HDR – high dose rate, LDR – low dose rate.

Für alle Strahlenqualitäten war ein dosisabhängiger Abfall der Überlebensfraktion zu verzeichnen. Die verwendeten Neutronenstrahlen hatten allgemein einen stärkeren

Effekt als die Photonenstrahlen. Der Effekt der Neutronen mit breiter Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$) auf die MCF10A-Zellen fiel geringer aus als bei den monoenergetischen Neutronen. Die HDR-Bestrahlung bewirkte im Dosisbereich von 0,5 Gy bis 2 Gy ein signifikant niedrigeres Überleben im Vergleich zur Referenzstrahlung. Die Überlebensfraktionen lagen bei 0,69 (0,5 Gy), 0,34 (1 Gy) bzw. 0,11 (2 Gy). Das Ergebnis der 1 Gy LDR-Neutronenbestrahlung fiel zwar etwas weniger deutlich aus ($SF = 0,43$), war aber dennoch signifikant unterschiedlich zur Referenz Photonenstrahlung von 220 kV.

Ein ähnlicher Effekt war nach der Exposition mit einem gemischten Neutronen- γ -Feld (Anteil sekundärer Neutronen 65 %) zu beobachten. Auch hier waren bereits ab einer Dosis von 0,38 Gy signifikante Unterschiede zu erkennen ($SF = 0,55$). Höhere Dosen (0,76 Gy und 1,52 Gy) dieses Neutronen- γ -Feldes führten zu deutlichen Auswirkungen auf das Zellüberleben, das nur noch bei $SF = 0,46$ bzw. $SF = 0,16$ lag.

Die monoenergetischen Neutronen (1,2 MeV und 0,56 MeV) zeigten die stärksten Effekte auf die Überlebensfraktion. Die 1,2 MeV Neutronen bewirkten bereits bei einer geringen Dosis von 0,18 Gy eine signifikant stärkere Reduktion der Überlebensfraktion. Höhere Dosen (0,42 Gy und 0,85 Gy) verringerten das Überleben der humanen Brustgewebszellen deutlich signifikant auf bis zu 40 % bzw. 16 %. Der größte Einfluss auf das Überleben wurde durch die monoenergetischen Neutronen mit einer geringen Energie von 0,56 MeV ausgelöst. Eine im Vergleich zur LDR-Photonenreferenz deutlich signifikante Reduktion der Überlebensfraktion auf $SF = 0,32$ bei 0,40 Gy und sogar $SF = 0,08$ bei 0,84 Gy wurde detektiert.

Die Referenzstrahlung von 220 kV Photonen (LDR) bewirkte bei einer Dosis von 1 Gy eine Reduktion des Zellüberlebens um 22 % ($SF = 0,78$). Wurde eine Dosis von 1 Gy mit einer Hochdosisrate (220 kV Photonen, HDR) appliziert, so sank die Überlebensfraktion bereits auf 66 % ($SF = 0,66$) und nach 2 Gy auf 59 % ($SF = 0,59$).

3.2.3 DNA-Doppelstrangbrüche

Zur weiteren Beurteilung der Auswirkung von Neutronen auf humane gesunde Brustzellen im Vergleich zu Photonen wurden strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) mittels einer Immunfluoreszenzfärbung dargestellt und quantifiziert. Als Marker für komplexe DSB wurden die verbleibenden γ H2AX-Foci 24 Stunden nach Strahlenexposition detektiert, als die Reparatur von weniger komplexen Läsionen abgeschlossen war. Die Foci-Differenz (ΔY , extra yield) wurde relativ zur Scheinbestrahlung (0 Gy-Kontrolle) jeder Strahlenqualität aufgetragen (siehe Abbildung 19). Signifikante Veränderungen wurden vergleichsweise zur Photonenbestrahlung (LDR) bestimmt. Die Quotienten der α -Werte der Funktionsgraphen (siehe Formel (5)) ergeben die in Tabelle 12 aufgelisteten RBE-Werte.

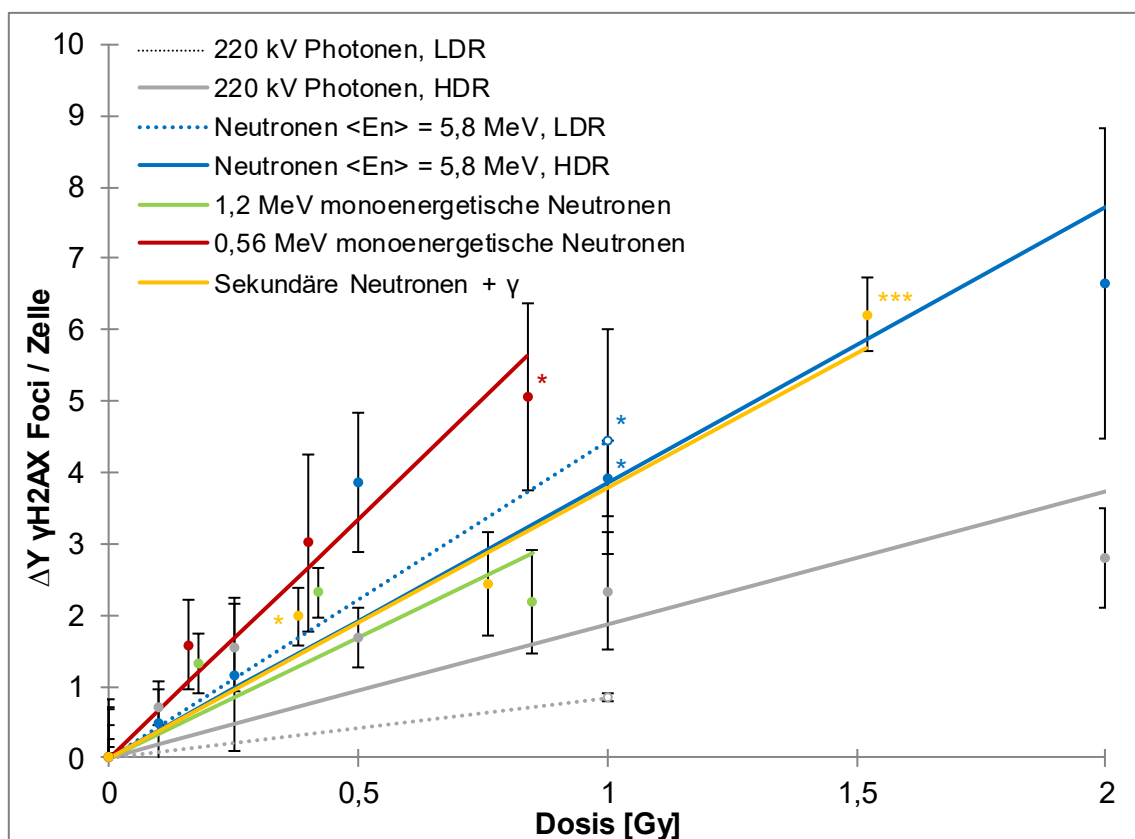


Abbildung 19 – DNA-Doppelstrangbrüche der MCF10A-Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenarten. Darstellung der Foci-Differenz (ΔY) zur individuellen 0 Gy-Kontrolle, als $MW \pm SEM$ (Photonen (LDR, HDR), sek. Neutronen + γ : $n = 3$, Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR, HDR), 1,2 MeV Neutronen, 0,56 MeV Neutronen: $n = 4$). Die Kurven wurden mit dem LQ-Modell gefittet ($F(D) = \alpha D + \beta D^2$). Die Signifikanzen beziehen sich auf die Referenzstrahlung 220 kV Photonen (LDR): * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; HDR – high dose rate, LDR – low dose rate.

Für alle Strahlenqualitäten galt, dass die Anzahl der γ H2AX-Foci mit steigender Dosis wächst. Infolge der LDR- und HDR-Bestrahlung der Zellen mit Neutronen einer breiten

Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$) kam es, im Vergleich zur LDR-Photonenexposition, zu drastischeren Anstiegen der DSB im Zellkern. Eine Dosis von 1 Gy verursachte im Mittel $3,9 \pm 0,5$ Foci/Zelle (HDR) bzw. $4,4 \pm 1,6$ Foci/Zelle (LDR). Durch die Applikation von sekundären Neutronen (+ γ) wurde ein vergleichbarer Effekt erzeugt. Signifikante Unterschiede waren im Vergleich zur LDR-Photonenkontrolle erkennbar. Bereits bei einer niedrigen Dosis von 0,38 Gy wurden im Mittel $2,0 \pm 0,4$ strahleninduzierte DSB verursacht. Die höchste Dosis von 1,52 Gy ergab durchschnittlich $6,2 \pm 0,5$ DSB innerhalb eines Zellkerns. Im Vergleich zur Referenz zeigte sich ein deutlich signifikanter Unterschied ($p = 0,0003$).

Anders als nach dem Koloniebildungstest zur Bestimmung der Überlebensfraktion erwartet, zeigte die monoenergetische Bestrahlung mit 1,2 MeV Neutronen keine stärkere Wirkung als die Neutronen mit breiter Energieverteilung ($\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$). Die Foci-Differenz zur 0 Gy-Kontrolle lag infolge der höchsten Bestrahlungsdosis von 0,85 Gy bei $2,2 \pm 0,7$ DSB/Zelle.

Deutlich erhöhte Foci-Differenzen waren nach Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen der niedrigen Energie von 0,56 MeV zu erkennen. Ein signifikanter Anstieg auf $5,1 \pm 1,3$ DSB/Zelle trat nach der höchsten Dosis von 0,84 Gy auf.

Bereits eine 220 kV Photonenstrahlung (HDR, LDR) bewirkte einen deutlichen Anstieg der Foci-Anzahl pro Zelle mit steigender Dosis. Der Effekt der HDR-Bestrahlung war hier etwas deutlicher ausgeprägt als der LDR-Effekt. Dieser lag für eine Dosis von 1 Gy (LDR) durchschnittlich bei $0,8 \pm 0,07$ DNA-DSB pro Zelle.

Tabelle 12 – α -Werte der LQ-Funktionen für die Überlebensfraktion und DNA-Doppelstrangbrüche nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten. $\text{RBE}_{(\text{SF } 0,1)}$ wurde für die Überlebensfraktion (SF) bei 10 % berechnet, $\text{RBE}_{(\text{Foci } 24 \text{ h})}$ wurde auf Grundlage des α -Wertes berechnet (nach $F(D) = \alpha D + \beta D^2$, mit $\beta = 0$).

Strahlenqualität	α -Wert (SF)	α -Wert (Foci 24 h)	$\text{RBE}_{(\text{SF } 0,1)}$	$\text{RBE}_{(\text{Foci } 24 \text{ h})}$
220 kV Photonen LDR, (Referenz)	0,12	0,84	1,00	1,00
220 kV Photonen HDR	0,24	1,87	0,58	2,22
Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$, LDR	0,43	4,43	2,06	5,25
Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$, HDR	0,65	3,86	1,99	4,57
1,2 MeV monoenerg. Neutronen	1,91	3,36	3,75	3,98
0,56 MeV monoenerg. Neutronen	2,55	6,71	4,97	7,95
Sekundäre Neutronen + γ	1,03	3,37	2,09	4,47

Bei dem Vergleich der relativen biologischen Wirksamkeiten anhand der berechneten Werte, $RBE_{(SF\ 0,1)}$ und $RBE_{(Foci\ 24\ h)}$ (siehe Tabelle 12), fällt auf, dass die Hochdosisrate der 220 kV Photonenbestrahlung im Koloniebildungstest eine deutlich geringere Wirkung ($RBE_{(SF\ 0,1)} = 0,58$) zeigte als die Niedrigdosisrate (LDR, $RBE_{(SF\ 0,1)} = 1,00$). Dieser Effekt kehrte sich bei der Betrachtung der verursachten DNA-Doppelstrangbrüche um. Der $RBE_{(Foci\ 24\ h)}$ der HDR-Bestrahlung war hier mehr als doppelt so hoch als bei der LDR-Bestrahlung (im Vgl. $RBE_{(Foci\ 24\ h)}$: $2,22 > 1,00$). Des Weiteren war die biologische Wirksamkeit aller untersuchten Neutronenspektren im Vergleich zur relativen biologischen Effektivität der verwendeten Photonen deutlich höher. Im untersuchten Energiebereich gibt es einen deutlichen Anstieg der relativen biologischen Effektivität mit sinkender Neutronenenergie. Je niedriger die Energie der Neutronen ($\langle E_n \rangle = 5,8\text{ MeV}$ (HDR, LDR), $1,2\text{ MeV}$, $0,56\text{ MeV}$) desto höher der $RBE_{(SF\ 0,1)}$ (im Vgl. $RBE_{(SF\ 0,1)}$: $1,99 < 2,06 < 3,75 < 4,97$). Die höchste biologische Wirksamkeit hat anhand der Analyse der Überlebensfraktion die Bestrahlung der Zellen mit monoenergetischen Neutronen mit $0,56\text{ MeV}$. Bei der Untersuchung strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche zeigte sich die höchste biologische Effektivität ebenfalls infolge der $0,56\text{ MeV}$ -Neutronenbestrahlung. Im Allgemeinen waren die RBE-Werte der DSB-Induktion quantitativ höher als die RBE-Werte der Überlebenskurven.

3.3 Analyse von Genom, Transkriptom und Proteom

Nach der Extraktion von RNA infolge der Bestrahlung konnten mittels unterschiedlicher Verfahren eine Vielzahl relevanter Gene, Mikro-RNAs und Proteine untersucht werden. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen werden im Folgenden näher betrachtet.

3.3.1 Genomanalyse I – Expression von Tumorsuppressorgenen

Eine Untersuchung zur Expression tumorsupprimierender Gene wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR durchgeführt. 72 Stunden nach der Exposition der Zellen mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten wurde die RNA extrahiert und die daraus synthetisierte cDNA für eine Analyse der bekannten Tumorsuppressorgene *CDKN1B*, *TP53* und *RB1* verwendet. Die folgenden Abbildungen 20-22 stellen den binären

Logarithmus (\log_2) des *fold change* (FC) in Abhängigkeit von der Strahlendosis dar. Die unbestrahlte Kontrolle entspricht einem Wert von Null ($\log_2(1) = 0$). Ein *fold change* von 2 bzw. 0,5, und somit eine doppelte bzw. halbe Expressionsrate, entspricht einem Wert von 1 bzw. -1. Expressionsänderungen sowie Signifikanzen wurden in Relation zur individuellen 0 Gy-Kontrolle jeder Strahlenqualität dargestellt.

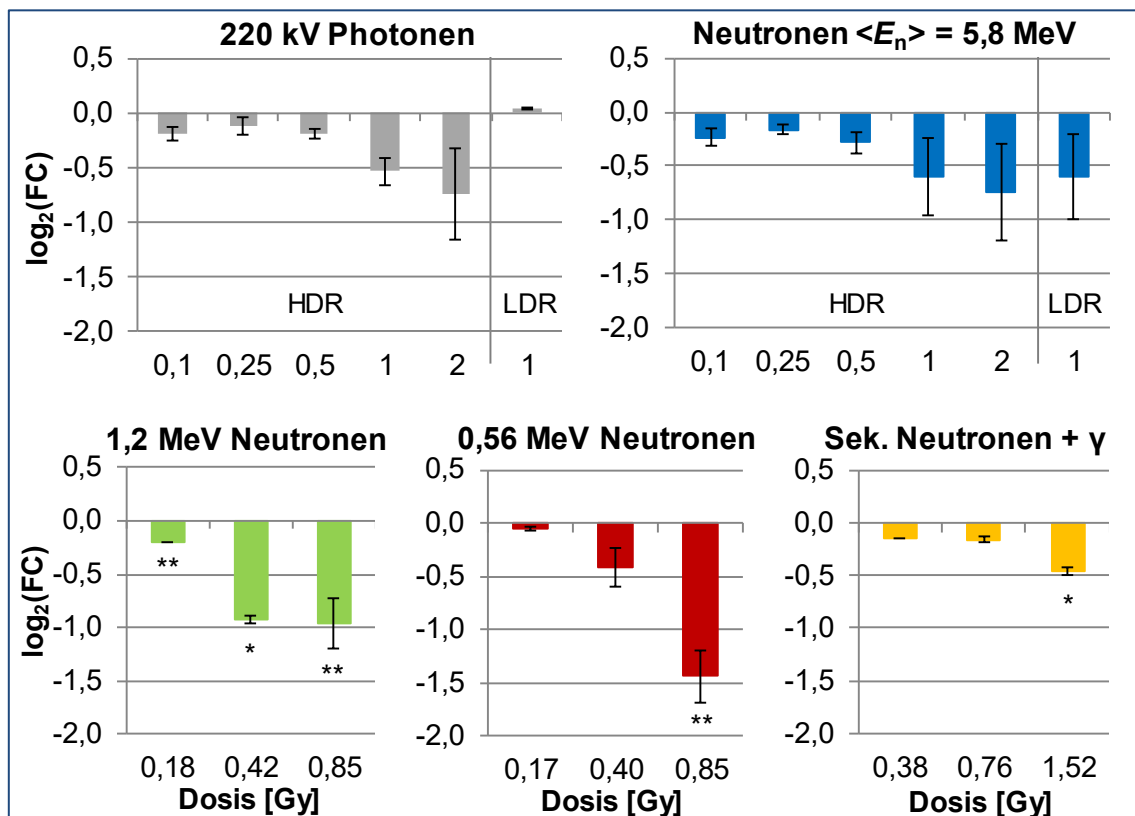


Abbildung 20 – Expression des Gens *CDKN1B* 72 Stunden nach Bestrahlung. Dargestellt ist der \log_2 fold change (FC) \pm SD des Gens *CDKN1B* nach Bestrahlung mit Photonen (LDR, HDR) $n = 5$, 1,2 MeV Neutronen $n = 5$, 0,56 MeV Neutronen $n = 3$, sek. Neutronen + γ : $n = 3$, Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR, HDR) $n = 5$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ im Vergleich zur individuellen 0 Gy-Kontrolle; HDR – high dose rate, LDR – low dose rate.

Die Expression des Gens *CDKN1B* (siehe Abbildung 20) sank infolge der Neutronenbestrahlung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) mit der Hochdosisrate mit steigender Dosis. Auch die Referenzstrahlung von 220 kV Photonen zeigte tendenziell diesen Effekt. Die LDR-Photonen mit einer Dosis von 1 Gy zeigten kaum eine Änderung der *CDKN1B*-Expression, im Gegensatz zur LDR-Neutronenbestrahlung, die eine Reduktion der Genexpression zur Folge hatte.

Deutlichere Effekte einer Reduktion zeigten sich nach monoenergetischer Bestrahlung der MCF10A-Zellen mit einer Energie von 1,2 MeV und 0,56 MeV sowie infolge von Sekundärneutronen. 72 Stunden nach der Behandlung waren besonders bei den höheren Dosen von 0,85 Gy und 1,52 Gy signifikant geringere Expressionsraten zu

erkennen. Auch die niedrige und mittlere Dosis der 1,2 MeV Neutronenstrahlung zeigte bereits signifikante Unterschiede. Generell bewirkten die monoenergetischen Neutronen und die Exposition mit sekundären Neutronen einen dosisabhängigen Abfall der *CDKN1B*-Expression. Der stärkste Effekt und somit die geringste *CDKN1B*-Expression wurde durch die Behandlung mit 0,85 Gy der 0,56 MeV Neutronen ausgelöst.

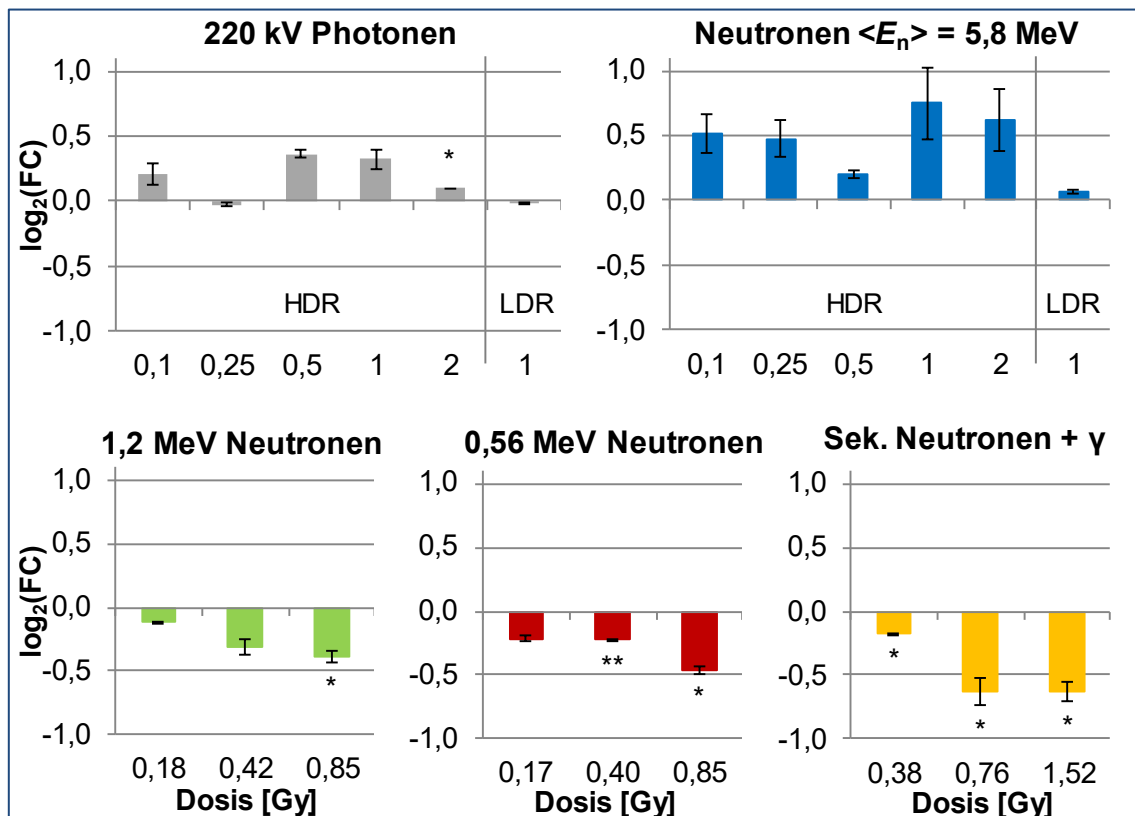


Abbildung 21 – Expression des Gens *TP53* 72 Stunden nach Bestrahlung. Dargestellt ist der \log_2 fold change (FC) \pm SD des Gens *TP53* nach Bestrahlung mit Photonen (LDR, HDR) $n = 5$, 1,2 MeV Neutronen $n = 5$, 0,56 MeV Neutronen $n = 3$, sekundäre Neutronen + γ : $n = 3$, Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR, HDR) $n = 5$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Anders als die Expression von *CDKN1B* war die des Gens *TP53* infolge der unterschiedlichen Strahlenqualitäten nicht nur reduziert (siehe Abbildung 21), sondern zeigte in Abhängigkeit von der Strahlenqualität unterschiedliche Effekte. Die HDR-Neutronenexposition ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) steigerte die Expression von *TP53* tendenziell. Die LDR-Bestrahlung mit Neutronen einer mittleren Energie von $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV bewirkte kaum eine Veränderung. Ähnlich zeigte auch die HDR-Photonenbestrahlung eine tendenziell gesteigerte Expression. Wie auch bei *CDKN1B* war die *TP53*-Expression 72 Stunden nach der Behandlung mit 1 Gy der LDR-Photonen kaum beeinflusst.

Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen nach Bestrahlungen mit den monoenergetischen und den sekundären Neutronen (+ γ) wieder deutliche und signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich zur 0 Gy-Kontrolle. Eine dosisabhängige Reduktion der *TP53*-Expression war nach der Bestrahlung mit 1,2 MeV Neutronen zu erkennen. Auch infolge der Behandlung mit 0,56 MeV Neutronen war eine leichte Dosisabhängigkeit sichtbar. Der stärkste Effekt war nach der Exposition der Brustzellen mit sekundären Neutronen zu beobachten. Neutronendosen von 0,76 Gy und von 1,52 Gy verursachten ähnlich starke Hemmung der *TP53*-Expression.

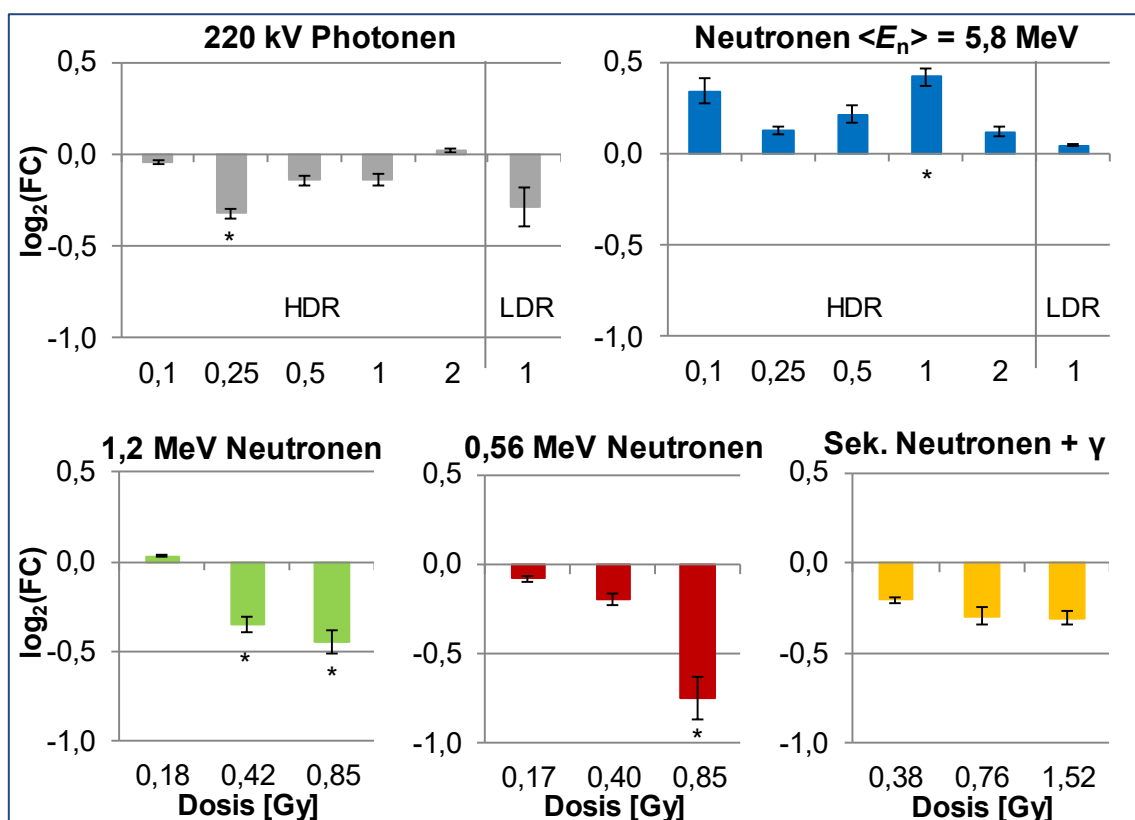


Abbildung 22 – Expression des Gens *RB1* 72 Stunden nach Bestrahlung. Dargestellt ist der log₂ fold change (FC) \pm SD des Gens *RB1* nach Bestrahlung mit Photonen (LDR, HDR) $n = 5$, 1,2 MeV Neutronen $n = 5$, 0,56 MeV Neutronen $n = 3$, sekundäre Neutronen + γ : $n = 3$, Neutronen $\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV (LDR, HDR) $n = 5$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Wiederum ein anderes Bild war bei der Genexpression von *RB1* zu erkennen (siehe Abbildung 22). Die HDR-Neutronenbestrahlung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) zeigte eine Tendenz zur Überexpression von *RB1* und bei einer Dosis von 1 Gy sogar eine signifikante Expressionssteigerung. Wohingegen eine leichte, aber dennoch signifikante Reduktion der Expression infolge einer HDR-Photonenbestrahlung mit einer Dosis von

nur 0,25 Gy zu erkennen war. Höhere Dosen zeigten keine eindeutigen Abhängigkeiten.

Die monoenergetischen Neutronenbestrahlungen von 1,2 MeV und 0,56 MeV sowie die Sekundärneutronen verursachten hingegen wieder eine eindeutige Hemmung des Tumorsuppressorgens. Eine Bestrahlung mit 0,42 Gy und 0,85 Gy der 1,2 MeV Neutronen reduzierte die *RB1*-Expression signifikant. Auch die Exposition mit Sekundärneutronen zeigte über alle angewendeten Dosen eine tendenzielle Senkung der Genexpression. Ein deutlicher und dosisabhängiger Effekt war wieder infolge der Behandlung der MCF10A-Zellen mit den 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen zu erkennen. Die höchste Dosis von 0,85 Gy verursachte eine signifikante Minderung der *RB1*-Expression im Vergleich zur unbehandelten 0 Gy-Kontrolle.

Alles in allem verursachten die monoenergetischen Neutronen mit einer Energie von 1,2 MeV bzw. 0,56 MeV sowie die sekundären Neutronen prägnante Abnahmen in der Expression der drei untersuchten Tumorsuppressorgene *CDKN1B*, *TP53* und *RB1*.

3.3.2 Genomanalyse II – Untersuchung onkologisch-relevanter Signalwege

Weitere Untersuchungen zu onkologischen Signalwegen, wie auch Proteom- und miRNA-Analysen, wurden nur mit Zellen durchgeführt, die mit monoenergetischen Neutronen mit einer niedrigen Energie von 0,56 MeV exponiert wurden, da sich diese Strahlenqualität in den vorherigen Versuchen als biologisch effektivste herausstellte.

Für das RT²-Profiler-Array zur Analyse tumorrelevanter Gene (Auflistung aller Gene des Arrays siehe Anhang Tabelle 15) wurden die humanen gesunden Brustgewebszellen mit einer Dosis von 0,85 Gy bestrahlt und deren Auswirkungen mit einer unbestrahlten Kontrollgruppe verglichen. Unter den 84 untersuchten Genen konnten elf nicht detektiert werden (*CCL2*, *CCND2*, *EPO*, *FASLG*, *FLT1*, *GSC*, *IGFBP5*, *KDR*, *LPL*, *SNAI1*, *SOX10*).

Die folgende Abbildung 23 stellt den binären Logarithmus (\log_2) des *fold change* für jedes detektierte Gen dar. Die unbestrahlte Kontrolle entspricht einem Wert von Null ($\log_2(1) = 0$). Ein *fold change* von 2 bzw. 0,5, und somit eine doppelte bzw. halbe Expressionsrate, entspricht einem Wert von 1 ($\log_2(2) = 1$) bzw. -1 ($\log_2(0,5) = -1$). Expressionsänderungen sowie Signifikanzen wurden in Relation zur unbestrahlten

0 Gy-Kontrolle dargestellt. Tabelle 16 im Anhang ergänzt die Abbildung 23 und listet nochmals die FC-Werte \pm Standardabweichung (mit p-Werten) aller detektierten Genen auf.

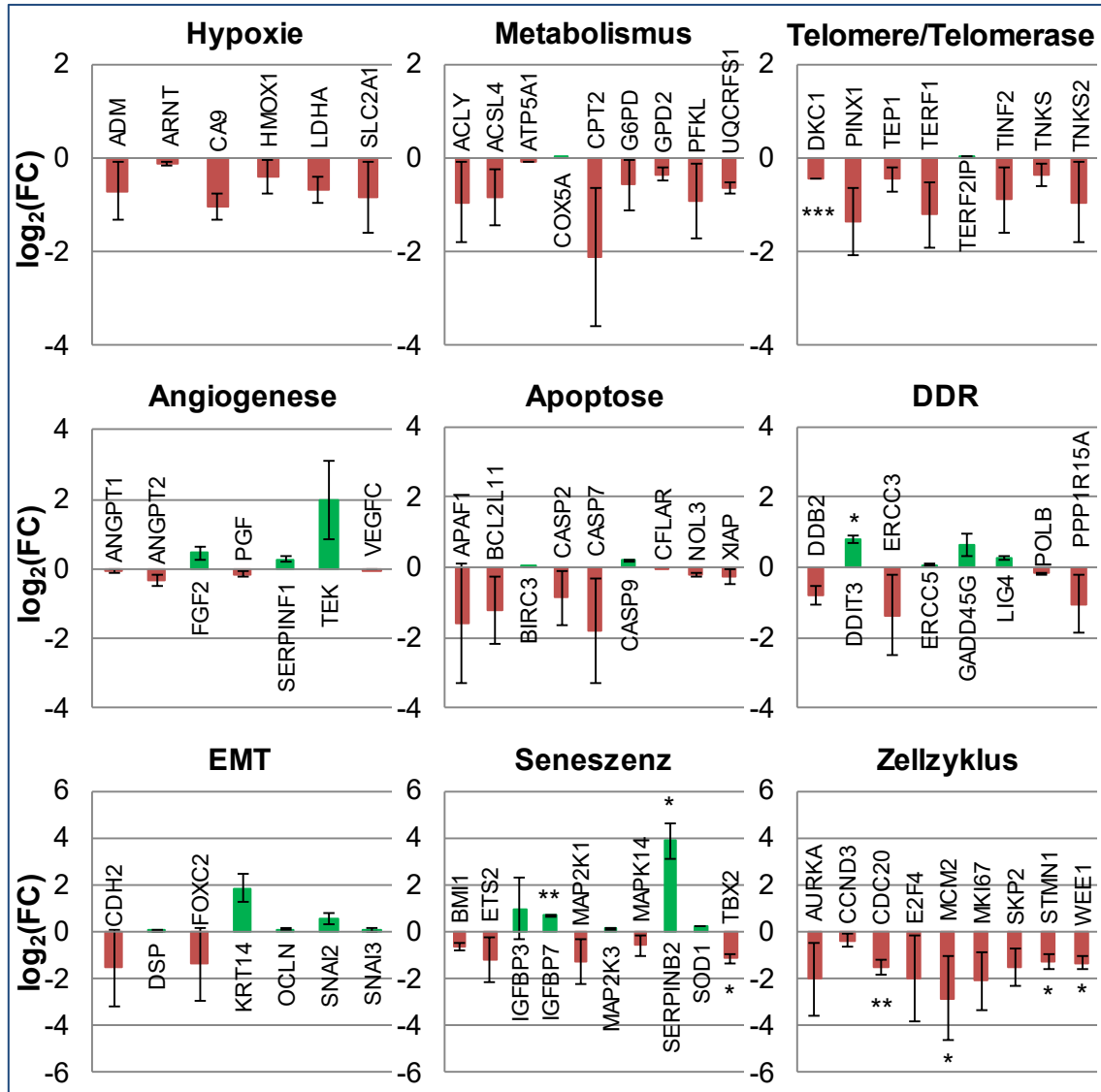


Abbildung 23 – Regulation von Genen für tumorrelevante Signalwege als Ergebnis der Analyse der mit 0,56 MeV Neutronen bestrahlten Zellen mittels RT²-Profiler-PCR-Arrays *Human Cancer PathwayFinder* (n = 3). Darstellung des log₂ fold change (FC) \pm SD, rot = herabreguliert, grün = hochreguliert, Sortierung nach Funktion (*Functional Gene Grouping*): Signalwege der Hypoxie, des Metabolismus, der Telomere/Telomerase, der Angiogenese, der Apoptose, der DDR (DNA damage & repair, DNA-Schäden und –Reparatur), der EMT (epithelial-mesenchymale Transition), der Seneszenz und des Zellzyklus; * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, * p \leq 0,001.**

Der Abbildung macht deutlich, dass infolge der Bestrahlung die Gene eher zu einer Herabregulation tendieren (rote Säulen). Insgesamt sind 52 der untersuchten Gene herabreguliert, davon sechs signifikant im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (*DKC1*, *TBX2*, *CDC20*, *MCM2*, *STMN1*, *WEE1*). Diese Gene gehören größtenteils in die Gruppe der Zellzyklus-Signalwege. Alle neun untersuchten Gene dieser Gruppe sind unterexprimiert. Auch die Gruppen Hypoxie, Metabolismus,

Telomere/Telomerase und Apoptose zeigen überwiegend herabregulierte Gene (siehe Tabelle 15 im Anhang).

Die Expression von 21 Genen ist hochreguliert, drei davon signifikant (*DDIT3*, *IGFBP7*, *SERPINB2*). Vor allem *SERPINB2* (*PAI-2*) ist deutlich überexprimiert und gehört in die Gruppe der Gene, die hauptsächlich Signalwege der Seneszenz beeinflussen. In den Gruppen Seneszenz, DNA-Schäden und Reparatur DDR (DNA damage & repair, DDR), epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Angiogenese gibt es hochregulierte sowie herunterregulierte Gene. Eine klare Tendenz zur Hoch- oder Herunterregulation eines gesamten Signalweges ist nicht zu erkennen.

3.3.3 Transkriptomanalyse – Betrachtung regulierter Mikro-RNA

Um die Ergebnisse der Genomanalyse auf Ebene des Transkriptoms zu erweitern, wurde die Expression von miRNA 48 Stunden bzw. sieben Tage nach einer Exposition mit monoenergetischen Neutronen ($E_n = 0,56 \text{ MeV}$) untersucht und mit Hilfe der Datenbank miRBase analysiert. Die folgende Tabelle 13 listet die Anzahl der im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle regulierten miRNA auf. Ab einem *fold change* von 2,0 galt eine miRNA als hochreguliert im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Herabregulierte miRNA hatten einen *fold change* von -2,0 und weniger im Vergleich zur Kontrolle.

Tabelle 13 – Anzahl regulierter miRNA aus einer Datenbank von 2.549 humanen miRNA (miRBase database, release 21.0). Auflistung aller regulierten miRNA (rot: herabreguliert $FC \leq -2,0$; grün: hochreguliert $FC \geq 2,0$) in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt (48 h bzw. 7 d) nach der Bestrahlung mit Dosen von 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy monoenergetischer Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV) im Vergleich zur unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle sowie die Anzahl sicher detektierter miRNA (Flag-Filter = 2) aus der Gruppe der herab- bzw. hochregulierten miRNA.

Dosis	Zeitpunkt	Herabregulierte miRNA ($FC \leq -2,0$)	davon sicher detektiert (Flag-Filter = 2)
		Hochregulierte miRNA ($FC \geq 2,0$)	
0,18 Gy	48 h	15	3
		43	2
	7 d	14	1
		2	1
0,43 Gy	48 h	162	143
		159	22
	7 d	53	13
		21	20
0,90 Gy	48 h	162	143
		160	22
	7 d	49	13
		26	20

Nach 48 Stunden waren nach allen Bestrahlungsdosen grundsätzlich mehr miRNA reguliert als nach sieben Tagen. Nach 48 Stunden und einer Dosis von 0,18 Gy waren 58 miRNA reguliert, davon 15 miRNA herabreguliert ($FC \leq -2,0$) und 43 miRNA hochreguliert ($FC \geq 2,0$). Als sicher detektiert (Flag-Filter = 2) galten von den herabregulierten 3 bzw. von den hochregulierten 2 miRNA. Nach einer Dosis von 0,43 Gy waren insgesamt 321 miRNAs reguliert, davon 165 sicher (143 Herunterregulierte, 22 Hochregulierte). Infolge von 0,90 Gy waren es 322, davon waren ebenfalls 165 sicher detektiert (143 Herunterregulierte, 22 Hochregulierte). Im Vergleich dazu waren es nach sieben Tagen nur noch 74 über die FC-Grenzen regulierte miRNA nach 0,43 Gy (53 herabreguliert, 21 hochreguliert) und 75 miRNAs nach 0,90 Gy (49 herabreguliert, 26 hochreguliert), davon sind jeweils 33 sicher detektiert (13 Herunterregulierte, 20 Hochregulierte). Die niedrigste Neutronendosis von 0,18 Gy führte nur zu einer Herabregulierung von 14 miRNA (davon eine sicher) und einer Hochregulierung von zwei miRNA (davon eine sicher). Eine Dosiserhöhung von 0,18 Gy zu 0,43 Gy verursachte einen starken Anstieg regulierter miRNA. Die Erhöhung der Dosis von 0,43 Gy auf 0,90 Gy bewirkte kaum eine Steigerung

regulierter miRNA. Deutliche Unterschiede gab es allerdings zwischen den Zeitpunkten. Nach sieben Tagen nahm die Anzahl regulierter miRNA unabhängig von der Bestrahlungsdosis stark ab.

Nach der Betrachtung der Tabelle 13 stellte sich die Frage, ob die regulierten miRNA nach 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy identisch sind, oder ob nach sieben Tagen andere miRNA reguliert wurden als nach 48 Stunden. Für diese Betrachtung wurde die Darstellung eines Venn-Diagramms gewählt. Dieses zeigte mit Hilfe von Kreisen und der darin enthaltenen Anzahl von Werten, Gemeinsamkeiten zwischen unterschiedlichen Behandlungsgruppen anhand von Schnittmengen auf (siehe Abbildung 24).

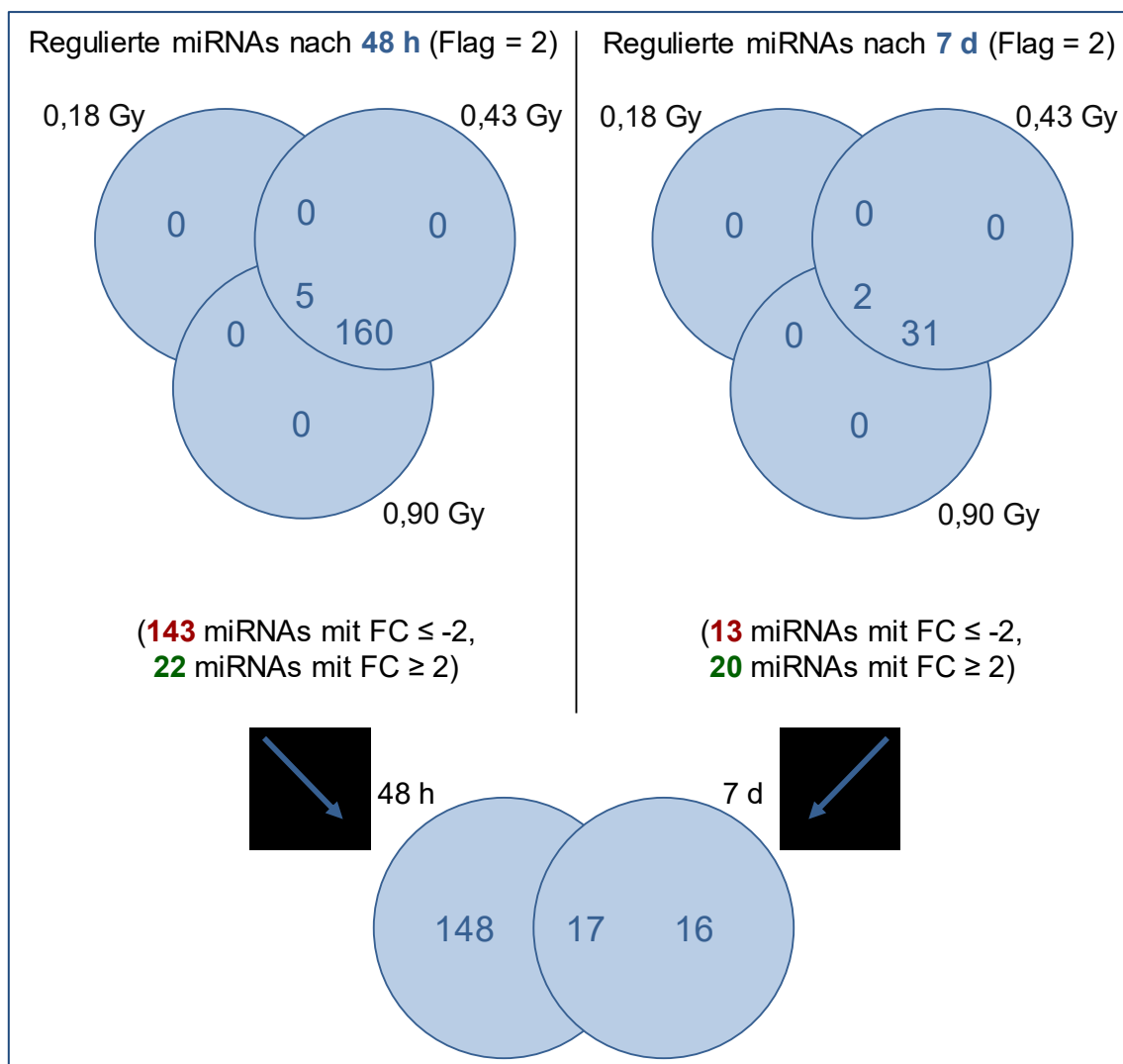


Abbildung 24 – Venn-Diagramme für miRNA. Darstellung der Anzahl regulierter miRNA mit Hilfe von Mengenkreisen; Gemeinsamkeiten zwischen unterschiedlichen Behandlungsgruppen werden anhand von Schnittmengen dargestellt; oben: ein Mengenkreis pro Dosis (0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy monoenergetischer Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV)) zum Messzeitpunkt 48 h (links) bzw. 7 d (rechts); unten: ein Mengenkreis pro Messzeitpunkt 48 h und 7 d; nur sicher detektierte miRNA (Flag-Filter = 2) aus der Gruppe der herab- bzw. hochregulierten miRNA werden dargestellt; (rot: herabreguliert $FC \leq -2,0$; grün: hochreguliert $FC \geq 2,0$).

In den dargestellten Venn-Diagrammen werden nur miRNA aufgeführt, die die FC-Grenze überschritten und sicher detektiert waren, das heißt einen Flag = 2 aufwiesen. Zum 48 Stunden-Zeitpunkt waren infolge einer Dosis von 0,90 Gy 165 miRNA reguliert. Die gleichen miRNA waren auch bereits nach 0,43 Gy reguliert. Fünf davon traten auch schon nach einer geringen Dosis von 0,18 Gy auf. Nach sieben Tagen waren infolge der geringen Bestrahlungsdosis von 0,18 Gy zwei miRNA reguliert. Die gleichen miRNA waren auch noch nach höheren Dosen von 0,43 Gy und 0,90 Gy reguliert. Nach 0,43 Gy kamen noch 31 weitere regulierte miRNA hinzu. Die gleichen waren auch nach 0,90 Gy reguliert. Es kamen keine weiteren hinzu. Vergleicht man die Zeitpunkte miteinander, so fällt auf, dass nach 48 Stunden 165 miRNA deutlich reguliert und sicher detektiert waren und nach sieben Tagen insgesamt 33 miRNA. Die Schnittmenge beider Messzeitpunkte betrug 17. Diese 17 miRNA, die nach 48 Stunden und sieben Tagen reguliert waren, sind in den folgenden Abbildungen Abbildung 25 und Abbildung 26 farblich markiert. Die Abbildungen zeigen *Heatmaps*, die dem FC-Wert der regulierten miRNA eine Farbe zuordnen. Anhand der Farbgebung, wurde deutlich, dass nach 48 Stunden (Abbildung 25) die miRNA überwiegend herunterreguliert waren (rot) und nach sieben Tagen (Abbildung 26) überwiegend hochreguliert (grün). Ebenfalls fiel auf, dass nach der geringsten Dosis von 0,18 Gy monoenergetischer Neutronen die meisten miRNA, die nach höheren Bestrahlungsdosen beeinflusst waren, hier die kritische FC-Grenzen ($-2 \leq FC \leq 2$) noch nicht überschritten – dargestellt als schwarze Kästchen in den Heatmaps. Es fiel auch auf, dass eine Dosiserhöhung von 0,43 Gy auf 0,90 Gy kaum den FC-Wert beeinflusste – zu erkennen ist dies an der Farbgebung, die sich bei den genannten Bestrahlungsdosen kaum unterscheidet.



Abbildung 25 – HeatMap der 165 regulierten und sicher detektierten miRNA 48 Stunden nach Bestrahlung mit 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy monoenergetischer Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV). Dargestellt sind die FC-Werte der 165 regulierten miRNA in Form eines Farbkästchens in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis – je positiver der FC-Wert, umso heller der grüne Farbton und je negativer der FC-Wert, umso heller und kräftiger der Rotton – d. h. deutlich hochregulierte miRNA sind mit einem grellen Grün dargestellt, stark herunterregulierte Werte mit einem kräftigen hellen Rot; FC-Werte, die nahe an den Grenzen von -2 und +2 liegen, werden in dunkleren Rot- und Grüntönen dargestellt. Werte, die die FC-Grenze von -2 bzw. +2 nicht erreichen, sind schwarz; miRNA in roter Schriftfarbe sind in beiden Abbildungen (Abb. 25 und Abb. 26) zu finden und sind somit nach 48 Stunden und nach sieben Tagen reguliert.

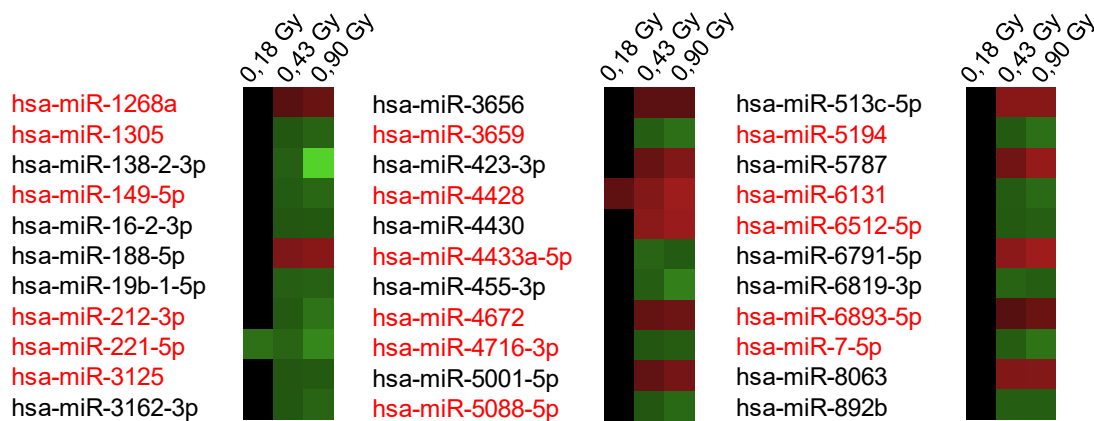


Abbildung 26 – HeatMap der 33 regulierten und sicher detektierten miRNA sieben Tage nach Bestrahlung mit 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy monoenergetischer Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV). Dargestellt sind die FC-Werte der 33 regulierten miRNA in Form eines Farbkästchens in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis – je positiver der FC-Wert, umso heller der grüne Farbton und je negativer der FC-Wert, umso heller und kräftiger der Rotton – d. h. deutlich hochregulierte miRNA sind mit einem grellen Grün dargestellt, stark herunterregulierte Werte mit einem kräftigen hellen Rot; FC-Werte, die nahe an den Grenzen von -2 und +2 liegen, werden in dunkleren Rot- und Grüntönen dargestellt. Werte, die die FC-Grenze von -2 bzw. +2 nicht erreichen, sind schwarz; miRNA in roter Schriftfarbe sind in beiden Abbildungen (Abb. 25 und Abb. 26) zu finden und sind somit nach 48 Stunden und nach sieben Tagen reguliert.

3.3.4 Proteomanalyse – Betrachtung regulierter Proteine

Um auch die Protein-Ebene des Modells zu betrachten, wurden mit Hilfe von chromatografischen und spektrometrischen Verfahren, Veränderungen an Aminosäuren festgestellt. Mittels einer Uniprot-Datenbank-Recherche („Uniprot_Sprot_human_rel. 2016_05“) wurden aus 223.262 Merkmalen 2.287 Proteine mit mehr als einer Peptidmodifikation (≥ 2 Peptide) identifiziert. Die Software *Gene Data Analyst* legt einen sicheren Unterschied ab einem *fold change* von mehr als 1,3 bzw. weniger als -1,3 fest ($-1,3 \geq FC \geq 1,3$). Proteine, die diese Grenze überschreiten galten als reguliert im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ($FC(0 \text{ Gy}) = 0$). Unterschiede mit einem p-Wert von $p \leq 0,05$ waren signifikant. In Abhängigkeit zur Bestrahlungsdosis und dem Messzeitpunkt zeigt Tabelle 14 von den 2.287 „Treffern“, nur die Proteine, die nach *Gene Data Analyst* im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle als herauf- bzw. herunterreguliert ($-1,3 \geq FC \geq 1,3$) galten und auch ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ erreichten.

Tabelle 14 – Anzahl regulierter Proteine aus einer Uniprot-Datenbank („Uniprot_Sprot_human_rel. 2016_05“). Auflistung aller sicher regulierter Proteine (rot: herabreguliert $FC \leq -1,3$; grün: hochreguliert $FC \geq 1,3$) in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt (30 min, 48 h bzw. 7 d) nach der Bestrahlung mit Dosen von 0,18 Gy, 0,43 Gy und 0,90 Gy monoenergetischer Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV) im Vergleich zur unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle sowie die Anzahl signifikanter Proteine ($p \leq 0,05$) aus der Gruppe der herab- bzw. hochregulierten Proteine.

Dosis	Zeitpunkt	Herabregulierte Proteine: $FC \leq -1,3$	Davon signifikant: $p \leq 0,05$
		Hochregulierte Proteine: $FC \geq 1,3$	
0,18 Gy	30 min	12	4
		30	4
	48 h	122	7
		30	4
	7 d	32	4
		16	3
0,43 Gy	30 min	11	1
		43	3
	48 h	129	42
		189	30
	7 d	41	15
		55	12
0,90 Gy	30 min	5	0
		41	1
	48 h	230	114
		242	84
	7 d	162	94
		148	74

Bereits nach der geringsten Bestrahlungsdosis von 0,18 Gy wurden nach 30 Minuten vier Proteine detektiert, die signifikant hochreguliert und vier Proteine, die signifikant herunterreguliert waren. Obwohl die Anzahl herabregulierter Proteine zum Messzeitpunkt von 48 Stunden stark ansteigt (auf 122 Proteine) sind aber nur sieben davon als signifikant bewertet. Die hochregulierten Proteine nehmen nicht zu. Nach einer Woche (Messzeitpunkt 7d) nimmt die Anzahl messbar regulierter Proteine wieder ab und nur noch drei bzw. vier waren auch signifikant hoch- bzw. herabreguliert. Nach einer Bestrahlungsdosis von 0,43 Gy waren nach 30 Minuten nur ein Protein signifikant hochreguliert und drei Proteine signifikant herabreguliert im Vergleich zur

unbestrahlten Kontrolle. Die regulierten Proteine nahmen zum Messzeitpunkt von 48 Stunden zu (42 signifikant hochreguliert und 30 signifikant herabreguliert) und nahmen zum Messzeitpunkt von sieben Tagen wieder ab (15 signifikant hochreguliert und zwölf signifikant herabreguliert). Die höchste Bestrahlungsdosis von 0,90 Gy verursachte insgesamt die meisten Proteinregulationen. Zwar wurde nach 30 Minuten nur ein signifikant hochreguliertes Protein identifiziert, jedoch waren es nach 48 Stunden bereits 114 signifikant herunterregulierte und 84 signifikant hochregulierte Proteine. Zum Messzeitpunkt von sieben Tagen nahm die Anzahl signifikant regulierter Proteine ab (94 signifikant hochreguliert und 74 signifikant herunterreguliert). Unabhängig von der Bestrahlungsdosis wurden nach 48 Stunden immer die meisten regulierten Proteine detektiert.

Da in den Bestrahlungsgruppen von 0,43 Gy und 0,90 Gy und den Messzeitpunkten von 48 Stunden und sieben Tagen ausreichend regulierte Proteine detektiert wurden, konnte mit Hilfe der Cytoscape-Software ein funktionelles *Grouping* durchgeführt werden. Hier werden den identifizierten Proteinen, Signalwege bzw. Prozesse zugeordnet. Abbildung 27 und Abbildung 28 zeigen diese Zuordnung.

Nach einer monoenergetischen Neutronendosis von 0,43 Gy ($E_n = 0,56$ MeV) sind bereits 48 Stunden nach Exposition Proteine reguliert, die vier verschiedenen Prozessen zugeordnet werden können – der Entwicklung des Immunsystems, Stoffwechselprozesse, Zelladhäsion sowie Zellzyklus. Vor allem sind Proteine des Zellzyklus herunterreguliert. Zum Messzeitpunkt von sieben Tagen nimmt diese Tendenz wieder ab. Des Weiteren ist kein eindeutiger Trend zu erkennen, da nur wenige Proteine hoch- aber auch herunterreguliert sind (Abbildung 27).

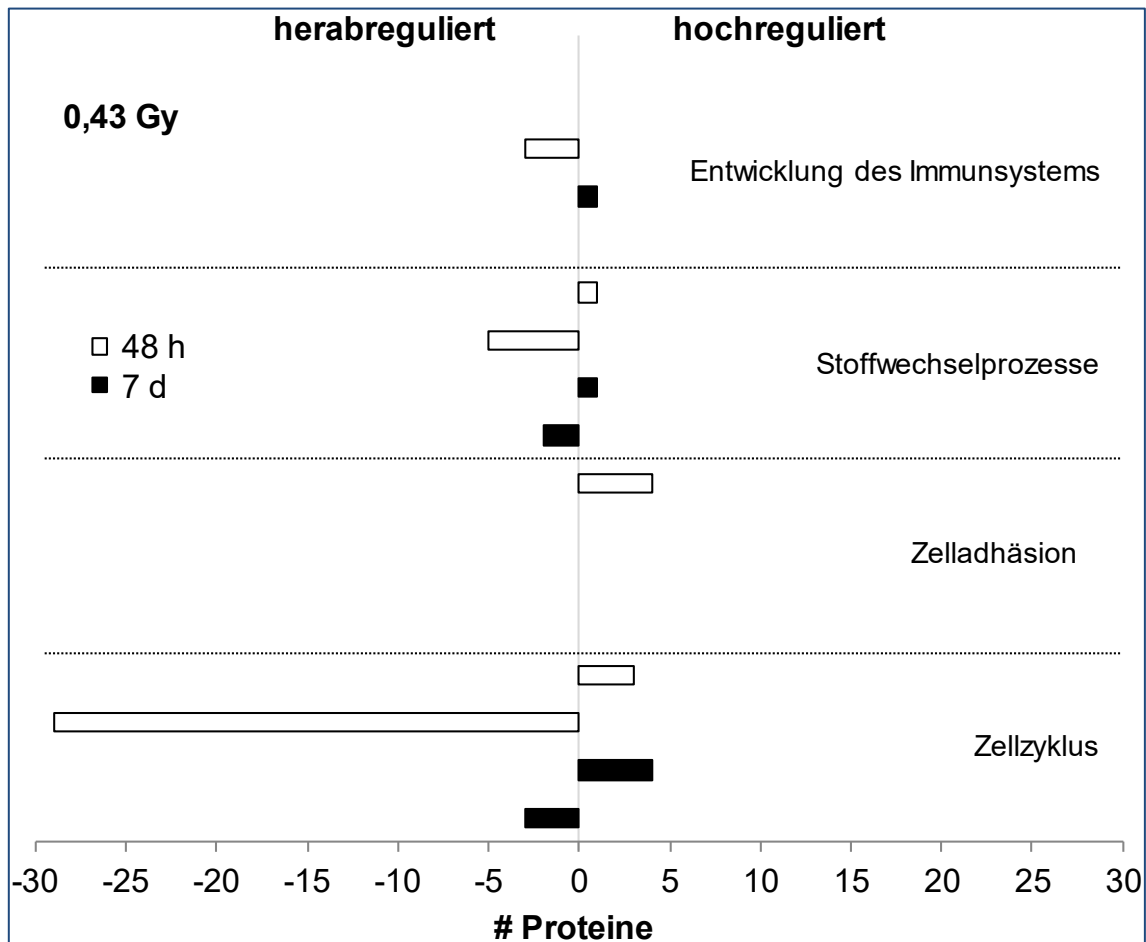


Abbildung 27 – Proteinregulationen nach einer Bestrahlungsdosis von 0,43 Gy der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen zu den Messzeitpunkten 48 Stunden (weiße Balken) und sieben Tagen (schwarze Balken): Dargestellt ist die Anzahl der Proteine auf der x-Achse, die den Gruppen (Signalwege und/oder Prozesse), Entwicklung des Immunsystems, Stoffwechselprozesse, Zelladhäsion und Zellzyklus, zugeordnet wurden. Balken, die von der Mittellinie ($x = 0$ Proteine) nach links ragen sind herunterreguliert. Balken, die nach rechts ragen, sind hochreguliert.

Nach einer monoenergetischen Neutronendosis von 0,90 Gy wurden zwei weitere Gruppen identifiziert. Nach 48 Stunden und sieben Tagen waren ebenfalls Proteine der Gruppe „Regulation der Reaktion auf externe Stimuli“ sowie „Organisation zellulärer Bestandteile“ betroffen. In beiden Gruppen wurden deutlich mehr Proteine hoch- als herunterreguliert. Auffallend war auch das vor allem die Anzahl regulierter Proteine in der Gruppe der Stoffwechselprozesse stark zugenommen hat. Nach 48 Stunden ist nur eine leichte Tendenz zu den herabregulierten Proteinen zu erkennen. Nach sieben Tagen sind mehr als doppelt so viele Proteine in dieser Gruppe herunterreguliert als hochreguliert. Auch in der Zellzyklus-Gruppe nahm nach einer höheren Bestrahlungsdosis die Anzahl regulierter Proteine stark zu. Nach 48 Stunden überwogen die herunterregulierten Proteine, nach sieben Tagen sind mehr Proteine hochreguliert. Auch in der Gruppe der Zelladhäsionsproteine überwiegt nach sieben

Tagen aber auch bereits nach 48 Stunden die Anzahl der hochregulierten Proteine (Abbildung 28).

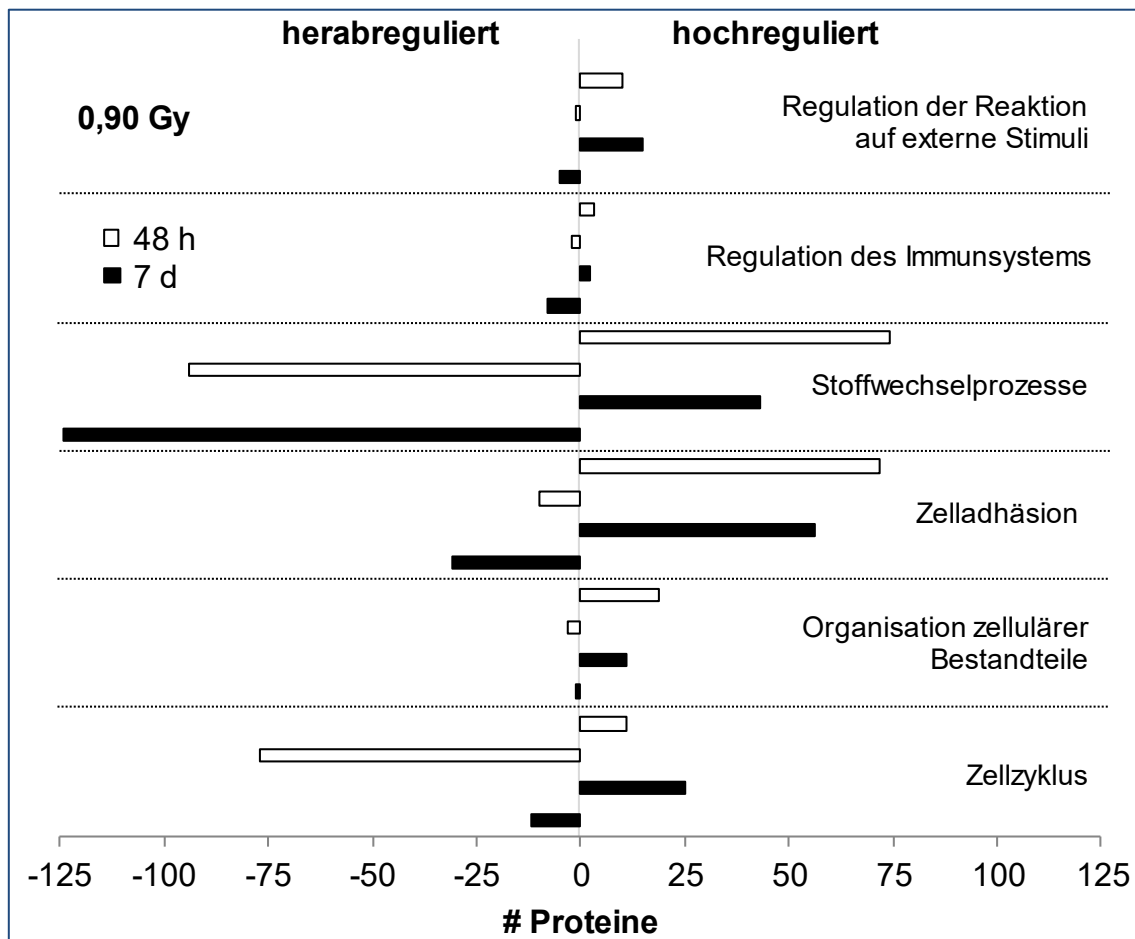


Abbildung 28 – Proteinregulationen nach einer Bestrahlungsdosis von 0,90 Gy der 0,56 MeV mono-energetischen Neutronen zu den Messzeitpunkten 48 Stunden (weiße Balken) und sieben Tagen (schwarze Balken): Dargestellt ist die Anzahl der Proteine auf der x-Achse, die den Gruppen (Signalwege und/oder Prozesse), Regulation der Reaktion auf externe Stimuli, Regulation des Immunsystems, Stoffwechselprozesse, Zelladhäsion, Organisation zellulärer Bestandteile und Zellzyklus, zugeordnet wurden. Balken, die von der Mittellinie (x = 0 Proteine) nach links ragen sind herunterreguliert. Balken, die nach rechts ragen, sind hochreguliert.

Nach der mittleren Neutronendosis von 0,43 Gy und nach der hohen Neutronendosis von 0,90 Gy sind vor allem Proteine des Stoffwechsels, des Zellzyklus und der Zelladhäsion im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle reguliert.

4 Diskussion

Um die biologische Wirksamkeit von Neutronen auf humane gesunde Brustzellen darzustellen, wurden innerhalb dieser Arbeit verschiedene radiobiologisch relevante Effekte mit Hilfe der Zelllinie MCF10A untersucht. Die Zelllinie diente als Modellsystem für humanes gesundes Brustgewebe und wurde zunächst evaluiert. Die relative biologische Wirksamkeit von monoenergetischen Neutronen mit einer Energie von 0,565 MeV und 1,2 MeV, von einem gemischten Neutronenfeld mit einer breiten Energieverteilung von 0,1 MeV bis 10 MeV ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) und von einem gemischten Neutronen- γ -Feld mit 65 % Neutronendosis wurde verglichen. Als Referenz für die Neutronenexpositionen dienten jeweils die Daten der Photonenbestrahlungen mit 220 kV, die in der Dissertation von Dajana Juerß (Universitätsmedizin Rostock) zu finden sind. Für die hochwirksamen monoenergetischen Neutronen mit 0,565 MeV wurden weiterführende Untersuchungen auf Proteom- und Transkriptom-Ebene durchgeführt.

4.1 MCF10A – humane gesunde Brustgewebszellen als Modellsystem für eine strahleninduzierte Karzinogenese

Die in normalem (gesundem) humanen Brustgewebe vorkommenden Stammzellen können Angriffspunkte für onkogene Ereignisse und möglicherweise daraus folgende maligne Veränderungen sein. Die Zusammensetzung und der Phänotyp biochemischer Merkmale in gesundem Brustgewebe und von Tumorgewebe der Brust können sehr heterogen sein. In dieser Arbeit wurde zunächst die Eignung der verwendeten MCF10A-Zellen als Modellsystem für gesundes humanes Brustgewebe und, aufgrund der vorhandenen Subpopulation von Zellen mit Stammzellpotential, als ein initiales Ziel der Karzinogenese untersucht. Hierzu wurde der Stammzell-Phänotyp der MCF10A-Zellen mit Hilfe eines Mammosphären-Assays bestimmt, der das Selbsterneuerungspotential der Zellen darstellt, sowie die Expression der Antigene EpCAM und MUC-1 mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen und durchflusszytometrischen Analysen veranschaulicht.

Die Daten zeigten eine starke Veränderung der Sphärenbildung besonders infolge von höheren monoenergetischen Neutronendosen und nach Exposition mit dem gemischten Feld aus sekundären Neutronen und γ -Strahlung. Die teilweise sehr starke

und signifikante Reduktion der Sphärenbildung infolge einer Neutronenexposition kann die Folge einer Reduktion bzw. Beeinflussung der Stammzell-Subpopulation innerhalb der MCF10A-Zellen sein.

Eine Reduktion der Mammosphären-Bildung infolge von Bestrahlung mit klinisch relevanten Dosen (Photonen) in Kombination mit 5-Azacytidine konnte ebenfalls die Arbeitsgruppe um Chang *et al.*, 2014 an der Brustkrebszelllinie MCF-7 nachweisen. Sie konnten das Überleben und das Wachstum von Krebsstammzellen unterdrücken. Bisher wurde jedoch vor allem die Sphärenbildung infolge von Bestrahlung in Krebszelllinien und nicht in normalen, gesunden Zelllinien untersucht. Auch Phillips, McBride & Pajonk, 2006 isolierten tumorinitiierende Zellen aus den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, die in der Lage waren Sphären auszubilden und untersuchten diese hinsichtlich des Zellüberlebens und der Expression verschiedener Oberflächenmarker infolge von Bestrahlung; betrachteten aber nicht das Sphärenbildungsverhalten. Stattdessen gibt diese Arbeit einen ersten Einblick in die Fähigkeit der Sphärenbildung von normalen humanen Brustzellen, die mit einem breiten Spektrum verschiedener Neutronenenergien bestrahlt wurden.

Die Oberflächenmarker EpCAM und MUC-1 sind nicht nur in Zellen mit Stammzellpotential und Vorläuferzellen vorhanden, sondern auch in Krebsstammzellen und sind ebenfalls bekannt, in epithelialem Brustkrebs überexprimiert zu sein (siehe Abbildung 5; Shtutman *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2007; Nath & Mukherjee, 2014). Des Weiteren gibt es aber zu den Expressionsmustern der transmembranen Glycoproteine unter Bestrahlung in humanen gesunden Zellen kaum einschlägige Literatur. Bei der Betrachtung der Färbungen war es grundsätzlich schwierig einen Unterschied zwischen ungefärbten Kontrollen, Isotyp-Kontrollen und den behandelten Zellen herauszufiltern. Unter Bestrahlungsbedingungen konnten für EpCAM kaum Unterschiede zwischen den verwendeten Strahlungsarten und -dosen erkannt werden, wodurch auf einen stabilen Anteil der verschiedenen Subpopulationen in der Zelllinie geschlossen werden könnte. Anders konnten aber deutliche Abweichungen bei der Expression des Glykoproteins MUC-1 beobachtet werden. Der starke Abfall der MUC-1-Expression infolge der Referenzbestrahlung mit Photonen könnte einen Verlust der MUC-1⁺-Subpopulation bedeuten, was aber nicht gleichbedeutend mit einem Anstieg der Stammzell-ähnlichen Population sein muss, obwohl auch die Sphärenbildungskapazität einen leichten

Anstieg im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zeigte. Der leichte Anstieg infolge von höheren Neutronendosen könnte wiederum einen Verlust der Stammzellpopulation bedeuten und somit auch die Einschränkung der Sphärenbildungskapazität erklären. Auch Singh *et al.* (2017), konnten einen 30 %igen Anstieg der MUC-1-Expression infolge einer ^{137}Cs - γ -Bestrahlung erkennen, jedoch wurden auch in dieser Studie wieder Karzinomzellen verwendet. Die Zell-Subpopulation, die für die Bildung von Sphären verantwortlich ist, muss aber nicht zwangsläufig die EpCAM⁺ MUC-1⁺-Subpopulation sein. Laut Stingl 2009 können verschiedene Stamm- und Vorläuferzellen unterschiedliche Antigen-Expressionsmuster aufweisen und so weisen vermutlich auch die MCF10A-Zellen unterschiedliche Subpopulationen mit unterschiedlichen Zelleigenschaften auf.

Letztendlich ist die Zelllinie MCF10A im Rahmen dieser Untersuchungen ein geeignetes Modell für die Darstellung von normalem humanem Brustgewebe. Das Stammzellcharakteristikum der Selbsterneuerung konnte durch den Sphärenassay gezeigt werden. Diese Eigenschaft und die Heterogenität dieser Zelllinie sind Parallelen zu humanem Brustgewebe. Die Verwendung anderer oder zusätzlicher Marker ist jedoch durchaus denkbar. CD49f ist zum Beispiel auch ein häufig genannter Kandidat für die Identifikation von Stamm- und Vorläuferzellen (Villadsen *et al.*, 2007). CD44 könnte als gängiger Tumormarker zusätzliche Informationen über das Karzinogenese-Potential liefern (Kim *et al.*, 2012). Eine Isolation und Kultivierung der entsprechenden Subpopulationen ist zwar technisch herausfordernd, könnte jedoch für verschiedene Untersuchungen von Vorteil sein.

4.2 Die biologische Wirksamkeit einer Neutronenexposition im Vergleich zur Photonenstrahlung

Anhand der erhaltenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich bezüglich der relativen biologischen Wirksamkeit eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen Neutronenstrahlungen im Vergleich zur Photonenreferenz ausmachen, erkennbar an den RBE-Werten aus Überlebenskurve und DNA-Doppelstrangbrüchen. In Übereinstimmung mit Tanaka *et al.*, 1999 und Schmid *et al.*, 2003 konnte in einem Energiebereich zwischen 0,56 MeV und $\langle E_n \rangle = 5,8 \text{ MeV}$ mit Hilfe der Überlebensfraktion eine erhöhte Wirksamkeit ($\text{RBE}_{\text{SF } 0,1}$) als Funktion abnehmender

Neutronenenergien ermittelt werden. Sowohl aus der Überlebenskurve als auch durch die Ermittlung der DNA-Doppelstrangbrüche wurde deutlich, dass die relative biologische Wirksamkeit der monoenergetischen Neutronen mit einer Energie von 0,565 MeV am effektivsten war. Aktuell gibt es nur wenige systematische Studien über die Auswirkung einer Neutronenexposition auf gesunde humane Zellen in Abhängigkeit zur Neutronenenergie. Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Göhde *et al.* (2003), die das Überleben von gesunden Mensch-Hamster-Hybridzellen (A_L) infolge einer niederenergetischen Neutronenexposition mit der Wirkung konventioneller Röntgenstrahlung verglichen. Für die von Göhdes Arbeitsgruppe untersuchten Neutronenenergien von $E_n = 0,56$ MeV; 2,5 MeV und 14,8 MeV wurden drei nahezu identische lineare Kurven mit einem RBE-Wert von 11 (RBE(SF)) relativ zu einer 220 kV Röntgenstrahlung beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigten die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Neutronenenergien im untersuchten Dosisbereich große Unterschiede bezüglich der Inhibition des klonogenen Überlebens. Im Vergleich zu Röntgenstrahlen (LDR) war die Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen (0,56 MeV; 1,2 MeV) deutlich reduziert. Ähnliche Effekte wurden auch von Okumura *et al.* (2013) über die Wirkung von Neutronen (*mixed beam*) mit einer Dosis bis zu 2 Gy auf das klonogene Überleben von CHO-K1 (*Chinese hamster ovary cells*) beschrieben. Frankenberg-Schwager und Kollegen (2010) ermittelten eine relative biologische Wirksamkeit von 5,4 für monoenergetische Neutronen mit $E_n = 0,56$ MeV für GCL1-Zellen (Hybrid aus normalen humanen Fibroblasten der Haut und HeLa) im Vergleich zu einer ⁶⁰Co γ-Strahlung. Diese Studien bestätigen und stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Wirkung von Neutronen, jedoch fehlt vor allem die Darstellung von menschlichen gewebespezifischen Zellen. Zudem wurden von den anderen Arbeitsgruppen oft kleinere Dosisbereiche von bis zu 1 Gy verwendet. Anders als in der Arbeit von Dionet *et al.*, 2016, zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine etwas höhere Wirksamkeit der LDR-Bestrahlungen im Vergleich zur HDR-Röntgen- und Neutronenstrahlung. Dionet und Kollegen untersuchten die Wirkung von schnellen Neutronen auf gesunde Fibroblasten der Haut und beschrieben eine höhere Effektivität von HDR-Bestrahlungen. Neben der Energie, der Bestrahlungsart und der Dosis kann auch die Dosisleistung eine wichtige Rolle für strahlenbiologische Effekte spielen, insbesondere auch, wenn es um die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen geht. Diese DNA-Schäden wurden mit Hilfe der verbleibenden γH2AX-Foci 24 Stunden nach

Bestrahlung in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine 2-fach höhere Reaktion der Zellen, die mit HDR- im Gegensatz zu LDR-Röntgenstrahlen behandelt wurden. Dies kann ein Ergebnis von Reparaturprozessen sein, die bereits nach wenigen Minuten beginnen. Die DNA-Doppelstrangbrüche, die durch eine LDR-Photonenbehandlung induziert wurden, könnten bereits während des Bestrahlungsprozesses repariert worden sein, da die Applikationszeit/Gy bis die volle anwendbare Dosis erreicht wird, für die LDR-Bestrahlung fast 20-fach höher ist als für eine HDR-Photonenbestrahlung. Auch Ishizaki *et al.*, (2004) vermuten bereits einen effizienten Reparaturprozess während der Bestrahlung. Bei den Neutronen zeigte sich dieser Unterschied zwischen HDR und LDR jedoch nicht, obwohl die Applikationszeit für eine Dosis von 1 Gy LDR sogar mehr als 30-fach höher war als die Bestrahlungszeit für 1 Gy HDR. Hier lösten die LDR-Neutronen sogar einen etwas größeren Effekt aus als die HDR-Neutronen (RBE 5,25 vs. 4,57). Die dargestellten Ergebnisse zeigen auch, dass die Anzahl der γ H2AX-Foci 24 Stunden nach Bestrahlung mit steigender Dosis linear zunahm. Dies wurde auch von Okumura und Kollegen (2013) berichtet, die als Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche 53BP1-Foci zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen ein bis drei Stunden nach Bestrahlung beobachteten, jedoch nicht nach 24 Stunden. Möglicherweise konnten sie deshalb keinen signifikanten Unterschied zwischen einer Neutronenstrahlung (*mixed beam*) und γ -Strahlen ausmachen. Genau wie bei Tanaka *et al.* (1999), die die DNA-Schäden nach Neutronenbestrahlung mittels Comet-Assay nachwiesen, konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit eine höhere biologische Wirksamkeit von 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen im Vergleich zu 1,2 MeV Neutronen nachgewiesen werden. Ihre Analyse des DNA-Schadens zeigte das gleiche Wirkungsmuster der verschiedenen Strahlungsqualitäten. Monoenergetische Neutronen waren effektiver als Photonen.

Um weiterhin eindeutige Effekte von Neutronen innerhalb eines kurzen Zeitraums beobachten zu können, wurde für nachfolgende Untersuchungen auf Proteom- und Transkriptom-Ebene diese Neutronenqualität gewählt. Das durch einen Protonenstrahl im Wasserphantom erzeugte sekundäre Neutronenfeld (+ γ) ergab RBE-Werte für die Überlebenskurve und für DNA-Doppelstrangbrüche, die mit denen der HDR und LDR Neutronenstrahlung ($\langle E_n \rangle = 5,8$ MeV) vergleichbar waren. Wie auch in vielen anderen Publikationen deutlich wird, ist der RBE-Wert ein probates Mittel um unterschiedliche

Strahlungsqualitäten zu vergleichen, jedoch ist er auch eine variable Funktion mit mehreren Faktoren (Tanaka *et al.*, 1999; Durante, 2014), zu denen auch die angewandte Methode und der Endpunkt selbst gehört.

4.3 Beeinflussung der Genexpression sowie des Transkriptoms und Proteoms infolge von Neutronenstrahlungen

Infolge der Bestrahlung mit unterschiedlichen Neutronenarten und Photonen wurden mittels verschiedener Verfahren das weitestgehend statische Genom, sowie das dynamische Proteom und Transkriptom (miRNA) untersucht.

4.3.1 Verringerte Expression von Tumorsuppressorgenen

Zur Darstellung des kanzerogenen Potentials wurde 72 Stunden nach Bestrahlung die Expression der Tumorsuppressorgene *CDKN1B*, *TP53* und *RB1* für alle untersuchten Strahlenqualitäten mit Hilfe einer quantitativen Real Time-PCR analysiert. Diese drei Gene gelten als typische Tumorsuppressoren, da sie Proteine verschlüsseln (p27, p53, Rb1), die an verschiedenen Punkten des Zellzyklus wirken, dessen Progression inhibieren und somit die unkontrollierte Proliferation von Zellen (Hanahan & Weinberg, 2011), die zur Entstehung von Neoplasien führen kann (Slingerland & Pagano, 2000), verhindern können (siehe Abbildung 29). Ein Defekt in diesen Genen kann zu ungehinderter Zellproliferation führen. Eine Bestrahlung normaler eukaryotischer Zellen führt im Allgemeinen zu einer Verlangsamung der Zellzyklus-Progression von G1-S-G2 und zu einem p53-vermittelten Arrest in der G1-Phase (Bernhard *et al.*, 1995). Die hier durchgeführte qRT-PCR ergab eine deutliche Reduktion der untersuchten Tumorsuppressorgene *CDKN1B*, *TP53* und *RB1* nach Bestrahlung mit monoenergetischen Neutronen (0,56 MeV, 1,2 MeV) und sekundären Neutronen (+ γ).



Verlauf. Besonders die monoenergetischen Neutronen sowie auch die sekundären Neutronen verringerten die p27-Expression signifikant. Auch viele humane Tumoren zeigen einen verringerten p27-Level. Dies ist oftmals mit einer schlechten Prognose verbunden (Slingerland & Pagano, 2000). Eine Reduktion der p27-Expression wurde bereits häufig mit der Entstehung verschiedener Krebsarten assoziiert, darunter auch Brustkrebs (Catzavelos *et al.*, 1997; Vervoorts & Lüscher, 2008).

Das Protein Rb1 beeinflusst verschiedene Zellprozesse – angefangen bei der Regulation von Genexpressionen, Zellproliferation und Apoptose, bis hin zum embryonalen Wachstum und zur Entwicklung (Burkhart & Sage, 2008). Durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie verhindert es den unkontrollierten Übergang von der G1- in die S-Phase. Für die Regulation dieses Prozesses steht Rb1 in Verbindung mit dem Cyclin E-CDK2-Komplex, der Rb1 durch Phosphorylierung inhibieren kann. Dieser Komplex kann wiederum durch p27 inhibiert werden (Graña, Garriga & Mayol, 1998). Eine Reduktion von p27 kann somit zur Reduktion von Rb1 führen und den Übergang von G1 zu S, durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, ermöglichen. Ein erhöhter Level der Faktoren E2F1-E2F3 spielt außerdem eine onkogene Rolle in verschiedenen humanen Krebserkrankungen (Chen, Tsai & Leone, 2009). Da allein eine Inaktivierung des *RB1*-Gens zu einem Retinoblastom führen kann, das vor allem bei Kindern auftritt, war das *RB1*-Gen eines der ersten Tumorsuppressorgene das identifiziert wurde (Sachdeva & O'Brien, 2012). Defekte in diesem Gen können auch die Ursache für andere Krebsarten sein, da der Verlust der *RB1*-Funktion zu einer abnormalen Zellproliferation führt. Jönsson und Kollegen beschrieben 2012 in einer großangelegten Profiling-Studie, dass die meisten der erblich bedingten *BRCA1*-Mammakarzinome eine *RB1*-Inaktivierung aufweisen. Innerhalb dieser Arbeit zeigte sich, dass die Expression des *RB1* infolge einer monoenergetischen Bestrahlung mit Neutronen und infolge der Exposition mit sekundären Neutronen reduziert ist im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Jönsson und Kollegen fanden 2012 eine Verbindung zwischen einer *RB1*-Deletion und einer schlechteren Prognose für Patientinnen mit Estrogen-Rezeptor-positivem Brustkrebs. Fero *et al.* (1996) vermuteten bei der Karzinogenese in der Hypophyse ebenfalls eine Beteiligung des *RB1*.

Das Gen *TP53* reagiert auf diversen Zellstress und wird allgemein hin als Wächter des Genoms bezeichnet. p53 reguliert die Expression verschiedener Gene und beeinflusst

mehr als kaum ein anderes Protein den geregelten Ablauf des Zellzyklus, da es an jedem Checkpunkt angreifen kann. Durch seine Fähigkeit bei einem DNA-Schaden einen Zellzyklus-Arrest und DNA-Reparaturprozesse oder auch eine Apoptose bei zu stark entarteten Zellen einzuleiten, sorgt p53 für einen Bestand an gesunden Zellen. In sehr vielen humanen Krebsarten ist das Protein p53 mutiert, anders als bei der hier verwendeten Zelllinie MCF10A. In dieser Arbeit zeigte sich, dass 72 Stunden nach der Bestrahlung der humanen Brustzellen mit monoenergetischen und sekundären Neutronen eine im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle verringerte Expression von *TP53* auftritt. Aufgrund der zuvor beschriebenen einflussreichen Rolle von p53, kann ein reduzierter p53-Level zu diversen Beeinträchtigungen des Zellzyklus führen. Im Gegensatz dazu zeigten Kastan *et al.*, 1991, dass das p53-Level in myeloblastischen Leukämiezellen in den ersten ein bis zwei Stunden nach einer γ -Bestrahlung und zusätzlichen Coffein-Behandlung steigt und bis zu 72 Stunden nach Behandlung noch erhöht sein kann. Dies war eine Folge der erzeugten DNA-Schäden. Der ebenfalls beobachtete G1-Arrest zeigt an, dass der Zellzyklus hier gestoppt wurde, um p53-vermittelte Zellreparaturmechanismen einzuleiten. Auch Narayanan *et al.* beschrieben 2017 eine strahleninduzierte Induktion der p53-Signalwege ein bis vier Stunden nach der Behandlung in HF1-Zellen (*human follicular lymphoma cells*). Ein Anstieg des p53-Levels konnte auch nach einer Bestrahlung der Zellen mit Neutronen mit einer breiten Energieverteilung beobachtet werden, die eine geringere biologische Wirksamkeit haben als monoenergetische Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV). Allerdings kann eine zu starke Schädigung durch biologisch hoch wirksame Bestrahlungen die Funktion von p53 und dessen Signalwegen behindern bzw. ausschalten. Dann ist eine Einleitung von Reparaturmechanismen und einer Apoptose nicht mehr möglich, was zur Proliferation von defekten Zellen führen kann. Acin *et al.* lieferten 2011 mit Hilfe eines K-ras-Mausmodells Daten, die die Rolle von mutiertem p53 bei der Initiation von Kopf-/Halstumoren nachwiesen.

4.3.2 Beeinträchtigung der Zellzyklus-Signalwege

Die PCR-Analyse von 84 Genen, die in onkologisch-relevanten Signalwegen eine Rolle spielen, zeigte vor allem, dass Gene der Zellzyklussignalwege durch die Bestrahlung beeinflusst werden. Eine Dysregulation des Zellzyklus kann eine

Tumorgenese durch übermäßiges Wachstum entarteter Zellen zur Folge haben (Hanahan & Weinberg, 2011).

Vor allem die Gene *TBX2*, *CDC20*, *MCM2*, *STMN1* und *WEE1* fielen durch eine statistisch signifikante Herunterregulation auf. *SERPINB2* (*PAI-2*) war als einziges Gen signifikant hochreguliert und codiert das Protein PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor type-2*). PAI-2 spielt unter anderem eine Rolle bei der negativen Regulation der Apoptose (Datenbank uniprot: biological process, GO:0043066) und wird im verwendeten Array in der Gruppe der Seneszenz-Marker geführt. Seneszenz kann durch verschiedene zelluläre Stressoren induziert werden und wird als ein Zustand des Zellzyklusarrestes infolge unterschiedlicher Belastungen betrachtet (Campisi & D'Adda Di Fagagna, 2007). Dickinson und Kollegen beschrieben die Inhibition einer p53-unabhängigen Apoptose durch PAI-2 (Dickinson *et al.*, 1995). Hsieh *et al.* zeigten 2017, dass PAI-2 durch eine Komplexbildung den Tumorsuppressor p21 stabilisiert, der durch p53 aktiviert wird (siehe Abbildung 29) und eine Erhöhung von p53 die Expression von PAI-2 fördert. Da die Expression von *TP53* jedoch infolge der 0,56 MeV monoenergetischen Neutronenstrahlung reduziert war, scheint dies zunächst der vorherigen These der erhöhten Zellzyklusprogression zu widersprechen. Möglich wäre aber auch, dass, so wie von Kastan *et al.* (1991) beschrieben, p53 innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung zunächst erhöht war und daraus eine Erhöhung der PAI-2-Expression resultierte, jedoch 72 Stunden nach Bestrahlung der p53-Level bereits wieder reduziert war, aber der erhöhte PAI-2-Level bis dato noch nicht abgebaut ist und somit noch besteht. Möglich ist auch, dass die viel beschriebene p53-Hochregulation vorrangig bei biologisch weniger wirksamen ionisierenden Strahlungen, als der hier verwendeten Neutronenbestrahlung, auftritt.

Auch die Herunterregulation von *TBX2*, ein negativer Regulator der Seneszenz, spricht für einen Zellzyklusarrest und somit gegen eine gesteigerte Proliferation. *TBX2* spielt eine proliferationssteigernde Rolle, wird aber in den hier untersuchten Zellen verringert exprimiert. Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass die Zellen in einem Seneszenz-Zustand verharren, der protektiv einer Krebsentstehung entgegen wirkt (Douglas & Papaioannou, 2013). Eine Überexpression von *TBX2* wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen detektiert (Abrahams, Parker & Prince, 2010), unter anderem auch bei *BRCA1/2*-mutiertem Brustkrebs (Adem *et al.*, 2004).

Die weiteren durch die Neutronenbestrahlung statistisch signifikant herunterregulierten Gene *CDC20*, *MCM2*, *STMN1* und *WEE1* gehören zur Gruppe der Zellzyklus-beeinflussenden Gene. Bereits 2006 stellten Zhou *et al.* ebenfalls fest, dass *MCM2* sechs bis 24 Stunden nach einer γ -Bestrahlung in gesunden humanen Fibroblasten herunterreguliert ist und beschrieben diesen Effekt als Folge einer p53-vermittelten p21-Aktivierung. *CDC20* wird negativ reguliert von p53 und kann als Folge einer Inhibition durch siRNA einen G2/M-Arrest auslösen (Kidokoro *et al.*, 2008). Überexprimiert gilt es als Onkoprotein und ist in vielen humanen Tumoren zu finden (Wang *et al.*, 2013). Rowley *et al.* beschrieben 1992, dass eine funktionierende Wee1-Proteinkinase für einen strahleninduzierten G2/M-Arrest erforderlich ist, jedoch ist *WEE1* in unseren Untersuchungen unterexprimiert. Eine Überexpression von *STMN1* ist bei Karzinomen des Endometriums mit invasivem Verhalten und einer schlechteren Prognose verbunden. Ein Knock-down, also eine verringerte Expression, wie auch in dieser Arbeit, inhibiert das aggressive Tumorverhalten (He *et al.*, 2016).

Die verringerte Expression der Tumorsuppressorgene *CDKN1B*, *RB1* und *TP53* durch eine Bestrahlung mit 0,56 MeV monoenergetischen Neutronen könnte durchaus für eine einsetzende Tumorgenese durch eine ungehinderte und unkontrollierte Zellproliferation sprechen. Das Genexpressionsprofiling hingegen spricht für einen Zellzyklus-Arrest und somit für eine ganz normale strahleninduzierte Reaktion der Zellen, die nicht zur Karzinogenese führt, sondern für den Erhalt gesunder Zellen steht. Generell zeigen die meisten Gene der untersuchten Signalwege eine verringerte Expressionsrate im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Auch Gene der Apoptose- und Stoffwechselsignalwege, sowie der Hypoxieantwort und der Telomer-/Telomerase-Aktivität waren herunterreguliert – vor allem Prozesse der Apoptose und des Metabolismus sollten nach einer Strahlenbehandlung hochreguliert sein. Aufgrund der Herunterregulation von *CDKN1B*, *RB1* und *TP53* war zu erwarten, dass die im Array betrachteten Gene genau umgekehrt reguliert sein sollen als sie es waren, da sich die genannten Gene teilweise indirekt über andere Proteine (p21, E2F, CDC2, SKP-1 u.a.) in ihrer Expression beeinflussen bzw. auch direkt *downstream* oder *upstream* Substrate sind. Möglicherweise war die Neutronenbestrahlung zu hoch, so dass auch diese Signalwege herunterreguliert oder ganz ausgeschaltet wurden. Nahezu alle betrachteten Gene waren herunterreguliert.

Der genaue zeitliche Verlauf der bisher untersuchten Genexpression sollte in weiteren Versuchen kontrolliert werden. Hier bieten sich vor allem Zeitpunkte in den ersten 24 Stunden an. Eine Zellzyklusanalyse sowie Apoptose-/Nekrosemessungen würden den Rahmen der Genexpression sehr gut ergänzen und könnten die untersuchten Expressionsraten bestätigen bzw. widerlegen. Eine zusätzliche Expressionsbestimmung weiterer Gene, wie *P21*, *E2F* oder auch bestimmter Cycline, wäre denkbar, da sie das Bindeglied zwischen einigen der bisher untersuchten Gene sind.

4.3.3 Regulierte Mikro-RNAs und Proteomveränderungen als Folge einer Neutronenexposition

Um den Einfluss von Neutronenstrahlung auf Proteom- und Transkriptomebene zu untersuchen, wurde ein umfangreiches Datenbank-Screening durchgeführt, das eine Vielzahl von Kandidaten hervorgebracht hat, die möglicherweise eine große Rolle bei der Entstehung einer strahleninduzierten Karzinogenese und anderer strahlenabhängiger Effekte haben können.

Es zeigte sich, dass bereits 48 Stunden nach einer Dosis von 0,43 Gy mononenergetischer Neutronen ($E_n = 0,56$ MeV) 321 miRNAs deutlich reguliert waren. Durch die Steigerung der Neutronendosis wurde dieser Effekt aber kaum verändert. Auffallend war vor allem der starke Unterschied zwischen den Zeitpunkten. Waren nach einer Dosis von 0,90 Gy insgesamt 322 miRNAs über die FC-Grenze reguliert, waren es nach sieben Tagen nur noch 75 miRNAs. Zudem wurden nach 48 Stunden vor allem miRNAs detektiert, die herunterreguliert waren. Nach sieben Tagen waren die meisten der detektierten miRNAs hochreguliert. Der Zeitfaktor scheint hier also eine sehr große Rolle zu spielen. Die Veränderungen der Regulation von miRNAs finden wahrscheinlich in den ersten 48 Stunden statt und normalisieren sich dann wieder in den folgenden Tagen. Auch die Verteilung der FC-Werte war nach 48 Stunden größer als nach sieben Tagen ($-85 \leq FC \leq 53$ vs. $-42 \leq FC \leq 22$). Ein weiterer Punkt ist, dass nach 48 Stunden überwiegend andere miRNAs reguliert waren als nach sieben Tagen. Bei den wenigen miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten detektiert wurden, fiel auf, dass die Regulation der miRNAs zu den unterschiedlichen Zeitpunkten genau in die entgegengesetzte Richtung ging. Es scheint, als würde eine starke Hoch- bzw. Herunterregulation nach 48 Stunden in den folgenden Tagen nicht

nur normalisiert werden, sondern in die entgegengesetzte Richtung hinaus reguliert wurden, sodass aus einer Hochregulation eine Herunterregulation wird und umgekehrt. Die Ergebnisse zeigten wiederum keine Dosisabhängigkeit. Der FC-Wert stieg bzw. sank nicht mit steigender Bestrahlungsdosis.

Im Gegensatz dazu waren die Veränderungen des Proteoms stark dosisabhängig. Die Anzahl der regulierten Proteine wurde mit jeder Dosissteigerung fast verdoppelt. Auch bei den Proteomveränderungen spielt der untersuchte Zeitpunkt nach erfolgter Strahlenexposition eine Schlüsselrolle. Innerhalb der ersten 48 Stunden war ein starker Anstieg der Anzahl veränderter Proteine zu verzeichnen, der bis hin zu Tag 7 wieder abfiel. Die detektierten Proteine gehörten vor allem in die Gruppe der Zellzyklus-beeinflussenden Proteine und zu den Metabolismus-Signalwegen, was mit den Ergebnissen der Genomanalyse einhergeht.

Nach 48 Stunden auffallend herunterreguliert war z. B. die Gruppe der *let-7*-Familie. Diese bereits häufiger beschriebene Familie ist bekannt dafür in vielen Tumoren verringert zu sein – vor allem Brust- und Lungentumoren werden hier häufig genannt (Iorio *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Yanaihara *et al.*, 2006). Xu *et al.* beschrieben 2015, dass eine Überexpression an *let-7a* die Zellproliferation und die Sphärenbildungskapazität in Brustkrebsstammzellen reduziert. Das *miR-17-92*-Cluster, bestehend aus den sechs miRNAs *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-20a* und *miR-92-1*, beeinflusst die E2F-Familie und somit den Zellzyklus aber auch die Apoptose und Angiogenese. Es ist in einer Vielzahl solider Tumoren stark exprimiert, fördert die Proliferation und inhibiert Apoptoseprozesse (He *et al.*, 2005; Dews *et al.*, 2006; Mendell, 2008). Dieses Cluster ist in der hier vorliegenden Arbeit herabreguliert, jedoch wurden Normalzellen untersucht. *MIR-29*, hier nach 48 Stunden verringert exprimiert, ist ebenfalls bei Lungenkrebs herunterreguliert und trägt möglicherweise zum *Silencing* eines Tumorsuppressorgens bei (Yanaihara *et al.*, 2006; Fabbri *et al.*, 2007). Viele miRNAs sind in der Literatur bisher nicht beschrieben und bieten somit noch ein weites Feld für unzählige Forschungsansätze.

Eine miRNA kann hunderte von Zielgenen haben. Eine Einschätzung der Auswirkung ist anhand solcher Screening-Analysen nur schwer vorzunehmen. Die hier fast 400 detektierten miRNAs (bei der höchsten Neutronendosis) können demnach mehrere Tausend Funktionen ausüben und je nach Expression des Zielgens, Gewebes und

äußerlicher Beeinflussung induzierend oder supprimierend wirken. Um die genaue Funktion bzw. die Beeinträchtigungen, die eine Regulation einer miRNA zur Folge hat, beurteilen zu können, ist deshalb eine individuelle Untersuchungsmethode notwendig. Ein gezieltes Ausschalten einer miRNA wäre für weiterführende Untersuchungen denkbar. Auch die Auswertung des großen Protein-Datenpools bietet nur einen kleinen Einblick, da ein Protein nicht nur eine einzige spezielle Aufgabe hat, sondern in den verschiedensten Signalwegen wirken kann und je nach Reaktionspartner die eine Funktion oder genau die entgegengesetzte Funktion ausüben kann (krebserregend vs. krebsvorbeugend, fördernd vs. hemmend).

Die Daten bestätigen vor allem auch die starke Beeinflussung des Zellzyklus, die bereits in der Genomanalyse beschrieben wurde. Für anknüpfende Experimente konnten einige potentielle zu untersuchende Targets detektiert werden. Da der erhobene Datensatz sehr groß ist, wird eine tiefergehende Auswertung und Analyse der erhaltenen Daten durch Bioinformatiker mit Hilfe von Datenbanken und spezialisierter Software zum Gruppieren und *Clustern* großer Datensätze, durchgeführt, deren Ergebnis an dieser Stelle noch nicht in die vorliegende Arbeit mit einfließen können. Zusammen mit den miRNA-Daten wurde auch ein noch größerer Datensatz bestehend aus regulierten *long-non-coding*-RNAs (lncRNA) und mRNAs erhoben. Auch dieser wird durch die Bioinformatiker genauer betrachtet und ausgewertet. Zusammenfassend birgt dieser riesige Datenpool ein enormes Potential für anknüpfende strahlenbiologische Untersuchungen und Erkenntnisse. Die Cytoscape-Software, die für die Gruppierung der regulierten Proteine verwendet wurde, ist vor allem auf die Auswertung von Daten eines gesamten Organismus ausgelegt, so dass auch bei der Analyse einzelner Zellpopulationen auch Gruppen wie „Entwicklung des Immunsystems“ auftreten. Diese Ergebnisse sind dann nur schwer zu bewerten.

5 Ausblick

Um die tatsächlichen radiobiologischen Effekte der bei einer Protonentherapie entstehenden Streustrahlung auf gesundes Gewebe zu charakterisieren, wurden MCF10A-Zellen, gesunde humane Mammaepithelzellen, mit Neutronen verschiedener Energiespektren sowie Röntgenstrahlen mit Dosen von bis zu 2 Gy bestrahlt. Neutronenstrahlung sowie auch die zum Vergleich betrachtete Röntgenstrahlung verursachten dosisabhängige Verringerungen der Überlebensfraktionen und der DNA-Reparaturkapazität. Monoenergetische Neutronen mit einer Energie von $E_n = 0,56$ MeV und das sekundäre Neutronenfeld (+35% γ -Strahlung) hatten eine höhere Wirksamkeit als Röntgenstrahlung. Die Untersuchungen zu tumorrelevanten Signalwegen, sowie miRNA- und Proteinregulation deuteten vor allem auf Beeinflussungen des Stoffwechsels und des Zellzyklus hin.

Auf Basis dieser Arbeit empfehlen sich weitere Untersuchungen, wie eine Zellzyklusanalyse, z. B. mittels durchflusszytometrischer Messungen und einer Propidium-Iodid-DNA-Färbung. Auch die gezeigte Beeinflussung des Zellmetabolismus kann Gegenstand für weiterführende Untersuchungen werden. Weitere Messzeitpunkte (wie 6 h, 12 h, 24 h, 72 h) könnten die bisherigen Ergebnisse ergänzen. Die enormen Datensätze, die die miRNA- und Proteomanalysen erbracht haben, könnten für die Verarbeitung in zellbiologischen Modellen und Simulationen verwendet werden. Dies würde eine sinnvolle Ergänzung zur bisher erfolgten Auswertung bedeuten und den Zugang der großen Datenmenge für eine weitere Verwendung ermöglichen.

Für die Erzeugung einer Streustrahlung, die der realen Situation während einer Protonentherapie entspricht, wurde ein Wasserphantom als Pendant zum Patienten verwendet. Dabei entstand eine Streustrahlung, die aus 65% sekundären Neutronen und 35% Gammastrahlung bestand, ob diese Zusammensetzung der tatsächlichen Streustrahlung bei der Behandlung entspricht, wurde nicht untersucht. Eine Differenzierung zwischen Neutroneneffekten und Auswirkungen der Gammastrahlung war nicht möglich. Zudem ist ein Wasserphantom ein statischer und homogener Körper und kann mit einem menschlichen Körper mit unterschiedlichen Dichten und Strömungen nicht gleichgesetzt werden.

Die verwendeten MCF10A-Zellen stellen ein einfaches Modell des gesunden humanen Brustgewebes dar, auch wenn die Zellen heterogener als andere Zelllinien sind und sie eine Subpopulation von Zellen mit Stammzellpotential aufweisen. Das Mikroenvironment einer Zelllinie in Kultur ist mit dem von vitalen Zellen in einem Gewebeverbund nicht zu vergleichen. Folglich könnte das Verhalten der Zellen und die Reaktion auf interne und externe Stimuli ebenfalls abweichen. Dies sollte bei jeder *in vitro*-Studie beachtet werden. Da die meisten bisherigen Untersuchungen nur an Tumorzellen durchgeführt wurden, war die Einordnung der Ergebnisse und der Vergleich mit anderen Studien nicht einfach.

Grundsätzlich konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass monoenergetische Neutronen mit einer Energie um 1 MeV eine stärkere strahlenbiologische Wirkung auf normale menschliche MCF10A-Brustzellen haben als Röntgenstrahlen. Die Resultate sind für weitere Untersuchungen der strahleninduzierten Karzinogenese von hoher Relevanz und für eine bessere Risikobewertung nach sekundärer Neutronenexposition im Bereich der konventionellen und Protonen-Strahlentherapie sehr wichtig.

Literaturverzeichnis

Abrahams, A., Parker, M. I. and Prince, S. (2010) 'The T-box transcription factor Tbx2: Its role in development and possible implication in cancer', *IUBMB Life*, 62(2), pp. 92–102. doi: 10.1002/iub.275.

Acin, S. *et al.* (2011) 'Gain-of-function mutant p53 but not p53 deletion promotes head and neck cancer progression in response to oncogenic K-ras', *J Pathol*, 225(4), pp. 479–489. doi: 10.1002/path.2971.

Adem, C. *et al.* (2004) 'ERBB2, TBX2, RPS6KB1, and MYC alterations in breast tissues of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers', *Genes Chromosomes and Cancer*, 41(1), pp. 1–11. doi: 10.1002/gcc.20057.

Arena, Victor (1971) *Ionizing Radiation and Life; Hardcover: Books Available at: <https://www.amazon.com/Ionizing-Radiation-Arena-Victor-Hardcover/dp/B011SJ4IM2>* (Accessed: 9 December 2020).

Badve, S. and Nakshatri, H. (2012) 'Breast-cancer stem cells-beyond semantics', *The Lancet Oncology*, 13(1), pp. e43–e48. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70191-7.

Barendsen, G. W. (1982) 'Dose fractionation, dose-rate and iso-effect relationships for normal tissue responses', *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 8(January), pp. 1981–1997.

Bernhard, E. J. *et al.* (1995) 'Effects of ionizing radiation on cell cycle progression', *Radiation and Environmental Biophysics*, 34(2), pp. 79–83. doi: 10.1007/BF01275210.

Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997) 'Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell', *Nature medicine*, 3(7), pp. 730–737. doi: 10.1038/nm0798-822.

Brede, H. J. *et al.* (1980) 'THE BRAUNSCHWEIG ACCELERATOR FACILITY FOR FAST NEUTRON RESEARCH', *Nuclear Instruments and Methods*, 169, pp. 349–358.

Brenner, D. J. and Hall, E. J. (2008) 'Secondary neutrons in clinical proton radiotherapy: A charged issue', *Radiotherapy and Oncology*, 86, pp. 165–170. doi: 10.1016/j.radonc.2007.12.003.

Burkhardt, D. L. and Sage, J. (2008) 'Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene', *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer, pp. 671–682. doi: 10.1038/nrc2399.

Campisi, J. and D'Adda Di Fagagna, F. (2007) 'Cellular senescence: When bad things happen to good cells', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), pp. 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.

Catzavelos, C. *et al.* (1997) 'Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27(Kip1) protein: Prognostic implications in primary breast cancer', *Nature Medicine*, 3(2), pp. 227–230. doi: 10.1038/nm0297-227.

Chang, H. W. *et al.* (2014) '5-Azacytidine induces anoikis, inhibits mammosphere formation and reduces metalloproteinase 9 activity in mcf-7 human breast cancer cells', *Molecules*, 19(3), pp. 3149–3159. doi: 10.3390/molecules19033149.

Chen, H. Z., Tsai, S. Y. and Leone, G. (2009) 'Emerging roles of E2Fs in cancer: An exit from cell cycle control', *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer, pp. 785–797. doi: 10.1038/nrc2696.

Dews, M. *et al.* (2006) 'Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster', *Nature Genetics*, 38(9), pp. 1060–1065. doi: 10.1038/ng1855.

Dickinson, J. L. *et al.* (1995) 'Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function', *J Biol Chem*, 270(46), pp. 27894–27904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499264>.

Dionet, C. *et al.* (2016) 'Different dose rate-dependent responses of human melanoma cells and fibroblasts to low dose fast neutrons', *International Journal of Radiation Biology*, 92(9), pp. 527–535. doi: 10.1080/09553002.2016.1186300.

Dontu, G. *et al.* (2003) 'In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells', *Genes & Development*, 17(10), pp. 1253–1270. doi: 10.1101/gad.1061803.potential.

Douglas, N. C. and Papaioannou, V. E. (2013) 'The T-box transcription factors TBX2 and TBX3 in mammary gland development and breast cancer', *Journal of Mammary*

Gland Biology and Neoplasia, 18(2), pp. 143–147. doi: 10.1007/s10911-013-9282-8.

Durante, M. (2014) 'New challenges in high-energy particle radiobiology', *British Journal of Radiology*, 87(1035). doi: 10.1259/bjr.20130626.

Eidemüller, M. *et al.* (2011) 'Breast cancer risk after radiation treatment at infancy: potential consequences of radiation-induced genomic instability.', *Radiation protection dosimetry*, 143(2), pp. 375–379. doi: 10.1093/rpd/ncq473.

Eirew, P. *et al.* (2008) 'A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability', *Nature Medicine*, 14(12), pp. 1384–1389. doi: 10.1038/nm.1791.

Fabbri, M. *et al.* (2007) 'MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), pp. 15805–15810. doi: 10.1073/pnas.0707628104.

Fero, M. L. *et al.* (1996) 'A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27Kip1-deficient Mice', *Cell*, 85(5), pp. 733–744. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81239-8.

Franken, N. a P. *et al.* (2011) 'Comparison of RBE values of high-LET α -particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death.', *Radiation oncology (London, England)*, 6(1), p. 64. doi: 10.1186/1748-717X-6-64.

Frankenberg-Schwager, M. *et al.* (2010) 'THE RBE OF 3 . 4 MeV α -PARTICLES AND 0 . 565 MeV NEUTRONS RELATIVE TO 60 Co γ -RAYS FOR NEOPLASTIC TRANSFORMATION OF HUMAN HYBRID CELLS', 138(1), pp. 29–39.

Gagnon-Moisan, F. *et al.* (2012) 'Characterization of single crystal chemical vapor deposition diamond detectors for neutron spectrometry', in *Review of Scientific Instruments*. Rev Sci Instrum. doi: 10.1063/1.4733300.

Gerweck, L. E. and Kozin, S. V. (1999) 'Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy', *Radiotherapy and Oncology*. Radiother Oncol, pp. 135–142. doi: 10.1016/S0167-8140(98)00092-9.

Göhde, W. *et al.* (2003) 'Mutagenic effect of low energy neutrons on human chromosome 11', 79(11), pp. 911–918. doi: 10.1080/09553000310001621419.

Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* (2006) 'Downregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 might correlate with poor disease-free and overall survival in inflammatory breast cancer', *Clinical Breast Cancer*, 7(4), pp. 326–330. doi: 10.3816/CBC.2006.n.045.

Graña, X., Garriga, J. and Mayol, X. (1998) 'Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth', *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 3365–3383. doi: 10.1038/sj.onc.1202575.

Hall, E. J. (2006) 'intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers (Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;65:1-7).', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 66(1), pp. 1593–4; author reply 1595. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.06.058.

Hammer, J. (1983) 'INTERSTITIELLE STRAHLENTHERAPIE', *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 133(12), pp. 307–309. doi: 10.1007/3-540-31303-6_30.

Hanahan, D. and Weinberg, R. a. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

He, L. *et al.* (2005) 'A microRNA polycistron as a potential human oncogene', *Nature*, 435(7043), pp. 828–833. doi: 10.1038/nature03552.

He, X. *et al.* (2016) 'Elevated STMN1 promotes tumor growth and invasion in endometrial carcinoma', *Tumour Biology*, 37(7), pp. 9951–8. doi: 10.1007/s13277-016-4869-5.

Howlader, N. *et al.* (2012) 'Use of imputed population-based cancer registry data as a method of accounting for missing information: Application to estrogen receptor status for breast cancer', *American Journal of Epidemiology*, 176(4), pp. 347–356. doi: 10.1093/aje/kwr512.

Hsieh, H.-H. *et al.* (2017) 'JCS Advance Online Article. Posted on 30 August 2016', *Journal of cell science*, (August).

ICRU Report 45: Clinical neutron dosimetry. 'Part 1: Detemination of absorbed dose in a patient treated by external beams of fast-neutrons (1989). Bethesda, MD.

ICRU Report 63: Nuclear Data for Neutron and Proton Radiotherapy and for Radiation

Protection (2000). Bethesda, MD.

Iorio, M. V. *et al.* (2005) 'MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer', *Cancer Research*, 65(16), pp. 7065–7070. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.

Ishizaki, K. *et al.* (2004) 'No induction of p53 phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells.', *Journal of radiation research*, 45(4), pp. 521–525. doi: 10.1269/jrr.45.521.

Johnson, S. M. *et al.* (2005) 'RAS is regulated by the let-7 microRNA family', *Cell*, 120(5), pp. 635–647. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014.

Jönsson, G. *et al.* (2012) 'The retinoblastoma gene undergoes rearrangements in BRCA1-deficient basal-like breast cancer', *Cancer Research*, 72, pp. 4028–4036. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0097.

Juerß, D. *et al.* (2017) 'Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells.', *Radiation oncology (London, England)*, 12(1), p. 159. doi: 10.1186/s13014-017-0895-8.

Kastan, M. B. *et al.* (1991) 'Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage¹', *Cancer Research*, 5, pp. 6304–6311.

Kidokoro, T. *et al.* (2008) 'CDC20, a potential cancer therapeutic target, is negatively regulated by p53', *Oncogene*, 27(11), pp. 1562–1571. doi: 10.1038/sj.onc.1210799.

Kim, S.-Y. *et al.* (2012) 'Breast cancer stem cell-like cells are more sensitive to ionizing radiation than non-stem cells: role of ATM.', *PloS one*, 7(11), p. e50423. doi: 10.1371/journal.pone.0050423.

Kossatz, U. *et al.* (2004) 'Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression', *Genes and Development*, 18(21), pp. 2602–2607. doi: 10.1101/gad.321004.

Lexikon der Biologie. Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/> (Accessed: 9 December 2020).

- Mendell, J. T. (2008) 'miRiad Roles for the miR-17-92 Cluster in Development and Disease', *Cell*, 133(2), pp. 217–222. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.001.
- Molls, M. and Röper, B. (2006) 'Strahlenbiologische Grundlagen der Strahlentherapie', in *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 541–549. doi: 10.1007/3-540-31303-6_28.
- Narayanan, I. V. *et al.* (2017) 'Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53', *Scientific Reports*, 7(January), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep43598.
- Nath, S. and Mukherjee, P. (2014) 'MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression.', *Trends in molecular medicine*, 20(6), pp. 332–42. doi: 10.1016/j.molmed.2014.02.007.
- Newhauser, W. D. and Durante, M. (2011) 'Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 11(6), pp. 438–448. doi: 10.1038/nrc3069.
- Okumura, K. *et al.* (2013) 'Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured mammalian cells', *Journal of Radiation Research*, 54(1), pp. 70–75. doi: 10.1093/jrr/rrs079.
- Paganetti, H. *et al.* (2002) 'Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy', *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 53(2), pp. 407–421. doi: 10.1016/S0360-3016(02)02754-2.
- Paganetti, H. *et al.* (2012) 'Assessment of radiation-induced second cancer risks in proton therapy and IMRT for organs inside the primary radiation field', *Physics in Medicine and Biology*, 57, pp. 6047–6061. doi: 10.1088/0031-9155/57/19/6047.
- Phillips, T. M., McBride, W. H. and Pajonk, F. (2006) 'The response of CD24-/low/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation', *Journal of the National Cancer Institute*, 98(24), pp. 1777–1785. doi: 10.1093/jnci/djj495.
- Pitot, H. C. *et al.* (1989) 'Critical parameters in the quantitation of the stages of initiation, promotion, and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat',

in *Toxicologic Pathology*. Toxicol Pathol, pp. 594–612. doi: 10.1177/0192623389017004105.

Raouf, A. *et al.* (2008) 'Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process', *Cell Stem Cell*, 3(1), pp. 109–118. doi: 10.1016/j.stem.2008.05.018.

Rowley, R., Hudson, J. and Young, P. G. (1992) 'The wee1 protein kinase is required for radiation-induced mitotic delay', *Letters to Nature*, 356, pp. 57–59.

Ruf, P. *et al.* (2007) 'Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: Implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer', *British Journal of Cancer*, 97(3), pp. 315–321. doi: 10.1038/sj.bjc.6603881.

Russo, J. and Russo, I. H. (2004) 'Development of the human breast', *Maturitas*, 49(1), pp. 2–15. doi: 10.1016/J.MATURITAS.2004.04.011.

Sachdeva, U. M. and O'Brien, J. M. (2012) 'Understanding pRb: Toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma', *Journal of Clinical Investigation*, 122(2), pp. 425–434. doi: 10.1172/JCI57114.

Sato, T. *et al.* (2013) 'Particle and heavy ion transport code system, PHITS, version 2.52', *Journal of Nuclear Science and Technology*, 50(9), pp. 913–923. doi: 10.1080/00223131.2013.814553.

Schellong, G. *et al.* (2014) 'Brustkrebs bei jungen Frauen nach Therapie eines Hodgkin-Lymphoms im Kindes- und Jugendalter: Eine Beobachtungsstudie mit bis zu 33 Jahren follow-up', *Deutsches Arzteblatt International*, 111(1–2), pp. 3–9. doi: 10.3238/arztebl.2014.0003.

Schiebe, M., Hoffmann, W. and Bamberg, M. (2006) 'Perkutane Radiotherapie', in *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 550–555. doi: 10.1007/3-540-31303-6_29.

Schmid, E. *et al.* (2003) 'RBE of nearly monoenergetic neutrons at energies of 36 keV–14.6 MeV for induction of dicentrics in human lymphocytes', *Radiation and Environmental Biophysics*, 42(2), pp. 87–94. doi: 10.1007/s00411-003-0200-0.

Schmitz, S. (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*, *Der Experimentator: Zellkultur*.

Spektrum Akademischer Verlag. doi: 10.1007/978-3-8274-2573-7.

Shtutman, M. *et al.* (1999) 'The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), pp. 5522–5527. doi: 10.1073/pnas.96.10.5522.

Singh, A. K. *et al.* (2017) 'A Pilot Study of Stereotactic Body Radiation Therapy Combined with Cytoreductive Nephrectomy for Metastatic Renal Cell Carcinoma.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(17), pp. 5055–5065. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2946.

Slingerland, J. and Pagano, M. (2000) 'Regulation of the Cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer', *Journal of Cellular Physiology*, 183(1), pp. 10–17. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<10::AID-JCP2>3.0.CO;2-I.

Smith, G. H. and Chepko, G. (2001) 'Mammary epithelial stem cells', *Microscopy Research and Technique*. Microsc Res Tech, pp. 190–203. doi: 10.1002/1097-0029(20010115)52:2<190::AID-JEMT1005>3.0.CO;2-O.

Smith, G. H. and Medina, D. (2008) 'Re-evaluation of mammary stem cell biology based on in vivo transplantation', *Breast Cancer Research*. Breast Cancer Res. doi: 10.1186/bcr1856.

Spizzo, G. *et al.* (2004) 'High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer', *Breast Cancer Research and Treatment*, 86(3), pp. 207–213. doi: 10.1023/B:BREA.0000036787.59816.01.

Stingl, J. *et al.* (1998) 'Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast', *Differentiation*, 63(4), pp. 201–213. doi: 10.1111/j.1432-0436.1998.00201.x.

Stingl, J. *et al.* (2001) 'Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue', *Breast Cancer Research and Treatment*, 67, pp. 93–109. doi: 10.1023/A:1010615124301.

Stingl, J. (2009) 'Detection and analysis of mammary gland stem cells', *The Journal of pathology*, 217, pp. 229–241. doi: 10.1002/path.

Strahlenschutzkommission (ICRP) von 2007 ICRP-Veröffentlichung 103
Verabschiedet im März 2007.

Strahlentherapie und Onkologie: Rolf Sauer: (2003).

Suit, H. *et al.* (2007) 'Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects.', *Radiation research*, 167(1), pp. 12–42. doi: 10.1667/RR0527.1.

Tanaka, K. *et al.* (1999) 'Neutron energy-dependent initial DNA damage and chromosomal exchange.', *Journal of radiation research*, 40 Suppl, pp. 36–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804992>.

Vervoorts, J. and Lüscher, B. (2008) 'Post-translational regulation of the tumor suppressor p27KIP1', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20), pp. 3255–3264. doi: 10.1007/s00018-008-8296-7.

Villadsen, R. *et al.* (2007) 'Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast', *Journal of Cell Biology*, 177(1), pp. 87–101. doi: 10.1083/jcb.200611114.

Visvader, J. E. (2009) 'Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis', *Genes and Development*, 23, pp. 2563–2577. doi: 10.1101/gad.1849509.

Visvader, J. E. (2011) 'Cells of origin in cancer.', *Nature*, 469, pp. 314–322. doi: 10.1038/nature09781.

Wang, Z. *et al.* (2013) 'Cdc20: a potential novel therapeutic target for cancer treatment.', *Current pharmaceutical design*, 19(18), pp. 3210–4. doi: 10.2174/1381612811319180005.

Xu, C. *et al.* (2015) 'Let-7a regulates mammosphere formation capacity through Ras / NF- κ B and Ras / MAPK / ERK pathway in breast cancer stem cells Let-7a regulates mammosphere formation capacity through Ras / NF- κ B and Ras / MAPK / ERK pathway in breast cancer stem cells', 4101(June 2017). doi: 10.1080/15384101.2015.1030547.

Yamashita, T. *et al.* (2007) 'Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt- β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma', *Cancer Research*, 67(22), pp. 10831–

10839. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0908.

Yanaihara, N. *et al.* (2006) 'Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis', *Cancer Cell*, 9(3), pp. 189–198. doi: 10.1016/j.ccr.2006.01.025.

Zhang, R. *et al.* (2013) 'Comparison of risk of radiogenic second cancer following photon and proton craniospinal irradiation for a pediatric medulloblastoma patient', 58(4), pp. 807–823. doi: 10.1038/nature13314.A.

Zhou, T. *et al.* (2006) 'Profiles of global gene expression in ionizing-radiation-damaged human diploid fibroblasts reveal synchronization behind the G1 checkpoint in a G0-like state of quiescence', *Environmental Health Perspectives*, 114(4), pp. 553–559. doi: 10.1289/ehp.8026.

Anhang

Tabelle 15 – RT²-Profiler-Array zur Analyse tumorrelevanter Gene

Position	Unigene	Symbol	Description
A01	Hs.387567	ACLY	ATP citrate lyase
A02	Hs.268785	ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
A03	Hs.441047	ADM	Adrenomedullin
A04	Hs.369675	ANGPT1	Angiopoietin 1
A05	Hs.583870	ANGPT2	Angiopoietin 2
A06	Hs.552567	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
A07	Hs.632446	ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
A08	Hs.298280	ATP5A1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
A09	Hs.250822	AURKA	Aurora kinase A
A10	Hs.469658	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
A11	Hs.127799	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
A12	Hs.380403	BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene
B01	Hs.63287	CA9	Carbonic anhydrase IX
B02	Hs.368982	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
B03	Hs.9216	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
B04	Hs.329502	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
B05	Hs.303649	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
B06	Hs.376071	CCND2	Cyclin D2
B07	Hs.534307	CCND3	Cyclin D3
B08	Hs.524947	CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
B09	Hs.464829	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
B10	Hs.390736	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
B11	Hs.401903	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit Va
B12	Hs.713535	CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2
C01	Hs.700338	DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
C02	Hs.505777	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
C03	Hs.4747	DKC1	Dyskeratosis congenita 1, dyskerin
C04	Hs.519873	DSP	Desmoplakin
C05	Hs.108371	E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding
C06	Hs.2303	EPO	Erythropoietin
C07	Hs.469872	ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)
C08	Hs.258429	ERCC5	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5

C09	Hs.644231	ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)
C10	Hs.2007	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C11	Hs.284244	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
C12	Hs.594454	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
D01	Hs.436448	FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
D02	Hs.461047	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
D03	Hs.9701	GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
D04	Hs.512382	GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)
D05	Hs.440438	GSC	Goosecoid homeobox
D06	Hs.727017	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
D07	Hs.450230	IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
D08	Hs.607212	IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5
D09	Hs.691061	IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7
D10	Hs.479756	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
D11	Hs.654380	KRT14	Keratin 14
D12	Hs.2795	LDHA	Lactate dehydrogenase A
E01	Hs.166091	LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
E02	Hs.180878	LPL	Lipoprotein lipase
E03	Hs.145442	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
E04	Hs.514012	MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
E05	Hs.485233	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
E06	Hs.477481	MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2
E07	Hs.689823	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
E08	Hs.513667	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
E09	Hs.592605	OCLN	Occludin
E10	Hs.255093	PFKL	Phosphofructokinase, liver
E11	Hs.252820	PGF	Placental growth factor
E12	Hs.490991	PINX1	PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1
F01	Hs.661106	POLB	Polymerase (DNA directed), beta
F02	Hs.631593	PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
F03	Hs.594481	SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
F04	Hs.532768	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
F05	Hs.23348	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
F06	Hs.473721	SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
F07	Hs.48029	SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
F08	Hs.360174	SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
F09	Hs.673548	SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)
F10	Hs.443914	SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble
F11	Hs.376984	SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10

F12	Hs.209983	STMN1	Stathmin 1
G01	Hs.531085	TBX2	T-box 2
G02	Hs.89640	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
G03	Hs.508835	TEP1	Telomerase-associated protein 1
G04	Hs.442707	TERF1	Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1
G05	Hs.301419	TERF2IP	Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein
G06	Hs.496191	TINF2	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2
G07	Hs.370267	TNKS	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase
G08	Hs.329327	TNKS2	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
G09	Hs.743307	UQCRCFS1	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
G10	Hs.435215	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
G11	Hs.249441	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)
G12	Hs.356076	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
H01	Hs.520640	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	PPC	Positive PCR Control

Tabelle 16 – Functional Gene Grouping des RT² Profiler PCR Arrays Human Cancer PathwayFinder. aufgelistet sind 73 von 84 verfügbaren Genen fold change (FC) \pm SD (σ_{FC}) bzw. $\log_2(FC) \pm$ SD ($\sigma_{\log_2(FC)}$), (11 Gene konnten nicht detektiert werden): 52 Gene sind herabreguliert (rot), davon 6 signifikant; 21 sind hochreguliert (grün), davon 3 signifikant; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; FC: fold change, σ : Standardabweichung SD.

Symbol	fold change (FC)	σ_{FC}	$\log_2(FC)$	$\sigma_{\log_2(FC)}$	p-value
Angiogenese					
ANGPT1	0,958	$\pm 0,885$	-0,061	$\pm 0,057$	0,729
ANGPT2	0,792	$\pm 0,415$	-0,336	$\pm 0,176$	0,374
FGF2 (bFGF)	1,371	$\pm 0,569$	0,455	$\pm 0,189$	0,503
PGF	0,902	$\pm 0,499$	-0,149	$\pm 0,083$	0,374
SERPINF1	1,202	$\pm 0,353$	0,265	$\pm 0,078$	0,742
TEK (TIE2)	3,914	$\pm 2,246$	1,968	$\pm 1,130$	0,374
VEGFC	0,997	$\pm 0,101$	-0,004	$\pm 0,000$	0,984
Apoptose					
APAF1	0,332	$\pm 0,354$	-1,589	$\pm 3,207$	0,589

BCL2L11	0,423	±0,327	-1,240	±1,826	0,507
BIRC3 (c-IAP1)	1,005	±0,657	0,007	±0,657	0,724
CASP2	0,545	±0,469	-0,877	±1,581	0,825
CASP7	0,284	±0,234	-1,818	±2,905	0,284
CASP9	1,153	±0,152	0,206	±0,152	0,408
CFLAR (CASPER)	0,993	±0,435	-0,011	±0,442	0,938
NOL3	0,850	±0,192	-0,234	±0,266	0,622
XIAP	0,830	±0,615	-0,269	±0,894	0,913
DNA-Schaden & -Reparatur (DDR)					
DDB2	0,574	±0,198	-0,800	±0,599	0,283
DDIT3 (GADD153/CHOP)	1,736	±0,181	0,796	±0,181	*0,017
ERCC3 (XPB)	0,388	±0,321	-1,365	±2,129	0,486
ERCC5	1,051	±0,164	0,071	±0,164	0,794
GADD45G	1,550	±0,729	0,632	±0,729	0,378
LIG4	1,189	±0,299	0,250	±0,299	0,611
POLB	0,890	±0,141	-0,169	±0,178	0,692
PPP1R15A (GADD34)	0,482	±0,381	-1,054	±1,643	0,531
Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)					
CDH2 (N-cadherin)	0,340	±0,356	-1,558	±3,088	0,498
DSP	1,043	±0,746	0,060	±0,746	0,858
FOXC2	0,383	±0,427	-1,385	±2,913	0,473
KRT14	3,608	±1,135	1,851	±1,135	0,115
OCLN	1,078	±0,425	0,108	±0,425	0,808
SNAI2	1,449	±0,642	0,535	±0,642	0,386
SNAI3	1,067	±0,900	0,094	±0,900	0,846
Hypoxie					
ADM	0,613	±0,532	-0,707	±1,418	0,907
ARNT	0,906	±0,266	-0,142	±0,324	0,876
CA9	0,490	±0,135	-1,030	±0,562	0,068
HMOX1	0,757	±0,643	-0,402	±1,124	0,763
LDHA	0,624	±0,256	-0,680	±0,658	0,427
SLC2A1	0,559	±0,496	-0,839	±1,587	0,777
Metabolismus					
ACLY	0,519	±0,467	-0,947	±1,733	0,627
ACSL4	0,557	±0,383	-0,845	±1,234	0,631
ATP5A1	0,940	±0,087	-0,090	±0,098	0,648

COX5A	1,006	±0,041	0,009	±0,041	0,885
CPT2	0,232	±0,162	-2,105	±3,004	0,172
G6PD	0,670	±0,617	-0,578	±1,374	0,742
GP2D	0,786	±0,311	-0,347	±0,503	0,688
PFKL	0,528	±0,450	-0,922	±1,616	0,606
UQCRFS1	0,645	±0,125	-0,633	±0,301	0,133
Seneszenz					
BMI1 (PCGF4)	0,638	±0,188	-0,649	±0,462	0,318
ETS2	0,435	±0,349	-1,202	±1,844	0,481
IGFBP3	1,985	±2,647	0,989	±2,647	0,361
IGFBP7	1,596	±0,086	0,675	±0,086	**0,002
MAP2K1	0,412	±0,313	-1,279	±1,840	0,547
MAP2K3	1,086	±0,125	0,120	±0,125	0,554
MAPK14	0,660	±0,519	-0,600	±1,193	0,863
SERPINB2 (PAI-2)	14,562	±2,946	3,864	±2,946	*0,011
SOD1	1,182	±0,089	0,241	±0,089	0,157
TBX2	0,452	±0,069	-1,146	±0,336	*0,015
Telomere & Telomerase					
DKC1	0,736	±0,024	-0,442	±0,044	***0,001
PINX1	0,387	±0,203	-1,369	±1,358	0,235
TEP1	0,727	±0,419	-0,460	±0,792	0,879
TERF1	0,431	±0,249	-1,214	±1,343	0,293
TERF2IP	1,008	±0,361	0,012	±0,361	0,824
TINF2	0,538	±0,417	-0,894	±1,440	0,769
TNKS (TIN1)	0,779	±0,546	-0,361	±0,900	0,912
TNKS2	0,519	±0,476	-0,947	±1,769	0,757
Zellzyklus					
AURKA	0,250	±0,194	-2,002	±3,113	0,246
CCND3	0,766	±0,559	-0,384	±0,952	0,958
CDC20	0,345	±0,071	-1,537	±0,601	**0,009
E2F4	0,254	±0,237	-1,975	±3,656	0,361
MCM2	0,139	±0,087	-2,848	±4,501	*0,017
MKI67	0,234	±0,138	-2,096	±2,530	0,224
SKP2	0,348	±0,178	-1,522	±1,468	0,175
STMN1	0,408	±0,096	-1,292	±0,573	*0,026
WEE1	0,396	±0,083	-1,336	±0,531	*0,032

Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 der Promotionsordnung

Doktorandinnen/Doktoranden-Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

Name:

Zwar, Monique

Anschrift:

xxx, xxx

Ich habe eine Dissertation zum Thema

„Effekte einer Neutronenexposition auf gesunde humane Brustzellen“

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock und der Universitätsmedizin Rostock angefertigt. Dabei wurde ich von Herrn Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt betreut.

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den

