

Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen
Sektion Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung

**Der γ H2AX-Assay zur Bestimmung der individuellen
Fraktionierungsempfindlichkeit: Proof-of-Concept**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter, Christian Matthias

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Zips

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Singer

Tag der Disputation: 05.02.2026

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	8
1.1 Einführung in das Prostatakarzinom.....	8
1.2 Fraktionierung.....	9
1.3 Der γ H2AX-Assay	11
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Zelllinien.....	15
2.1.2 Inkubationsbedingungen.....	16
2.1.3 Antikörper.....	16
2.1.4 Chemikalien.....	16
2.1.5 Medium und Lösungen	18
2.1.6 Laborutensilien	19
2.1.7 Geräte.....	19
2.1.8 Software	20
2.1.9 Berechnungen für Immunfluoreszenzfärbungen	20
2.1.10 Berechnungen für Immunhistochemiefärbungen.....	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Allgemeine Zellkultur.....	22
2.2.2 Proliferation Assay	22
2.2.3 Berechnung Proliferation Assay	23
2.2.4 Cytospin und Fixierung	23
2.2.5 Übersicht Versuchsablauf <i>in vitro</i>	23
2.2.6 γ H2AX-Färbung <i>in vitro</i>	25
2.2.7 Bildgebung am Fluoreszenzmikroskop <i>in vitro</i>	25
2.2.8 Auswertung der γ H2AX-Foci.....	26
2.2.9 <i>Ex vivo</i> Assay für Patientenmaterial	28

2.2.10	Übersicht Versuchsablauf <i>ex vivo</i>	29
2.2.11	IHC-Färbung Gewebeschnitte	30
2.2.12	γ H2AX-Färbung Gewebeschnitte.....	31
2.2.13	Bildgebung am Floureszenzmikroskop <i>ex vivo</i>	31
2.2.14	Erhaltendes Patientenmaterial.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Wachstumseigenschaften der Zelllinien	33
3.2	Auswirkung des Zeitpunkts des Versuchsendes auf die Anzahl residueller Foci pro Nukleus	35
3.3	Residuelle Foci nach Bestrahlung <i>in vitro</i> in unterschiedlichen Fraktionierungen zeigen hohe Focizahlen bei geringer Fraktionierung	36
3.4	Residuelle Foci nach Bestrahlung von <i>ex vivo</i> Prostatagewebe in unterschiedlichen Fraktionierungen zeigen hohe Focizahlen bei geringer Fraktionierung	40
3.5	Lineare Regression der Focianzahl <i>ex vivo</i>	44
4	Diskussion	47
5	Zusammenfassung	56
6	Anhang	58
7	Literaturverzeichnis	62
8	Erklärung zum Eigenanteil	66
9	Danksagung	67

Abkürzungsverzeichnis

AR = Androgenrezeptor
BrdU = Bromdesoxyuridin
BSA = Bovines Serumalbumin
CgA = Chromogranin A
DAB = 3,3'-Diaminobenzidin
DAPI = 4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO = Dimethylsulfoxid
DNA = Desoxyribonukleinsäure
DSB = Doppelstrangbruch
ED = Einzeldosis
EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS = Fetales Bovines Serum
GD = Gesamtdosis
HE = Hämatoxylin-Eosin
HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFX = Hypofraktionierung
HR = Homologe Rekombination
HRP = Horseradish peroxidase
IGRT = Image-guided Radiation-Therapy
IHC = Immunhistochemie
IMRT = Intensity-modulated Radiation-Therapy
IRIF = Ionizing radiation induced focus
NEAA = Non-essential amino acids
NHEJ = Non-homologous End-Joining
NSE = Neuronenspezifische Enolase
PBS = Phosphate-buffered saline
PC = Prostatakarzinom
PSA = Prostata-spezifisches Antigen
ROI = Region of interest
RPMI = Roswell Park Memorial Institute
RPM = Rotations per minute
RT = Raumtemperatur
TSA = Tyramid-signal-amplification

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Arbeitsschritte <i>in vitro</i>	24
Abbildung 2: Auswertung der γ H2AX-Foci <i>in vitro</i>	27
Abbildung 3: Übersicht Experiment <i>ex vivo</i>	29
Abbildung 4: Erreichen der Konfluenz <i>in vitro</i> entlang eines sigmoidalen Wachstums.....	34
Abbildung 5: Vergleich der Focianzahl zwischen Ko. I und II sowie 1x 8 Gy I und II	35
Abbildung 6: Induktion von Foci nach fraktionierter Bestrahlung für FaDu, Du145, PC3 und LNCaP.....	38
Abbildung 7: <i>Ex vivo</i> Ergebnisse für Pat. 7 und Pat. 9.....	41
Abbildung 8: Normalisierte Foci-Anzahl für die Pat. 10, 11 und 12	42
Abbildung 9: Lineare Regression der residuellen Foci <i>ex vivo</i>	45
Abbildung 10: Steigung der γ H2AX-Foci gegenüber klinischen Daten	46
Abbildung 11: Ergebnisse des <i>Proliferation Assays</i> für FaDu, PC3 und LNCaP	58
Abbildung 12: Absolute Foci-Zahlen vor Normalisierung sowie Darstellung der Einzelwerte zur Veranschaulichung der Streubreite der normalisierten Anzahl residueller Foci für FaDu und Du145.....	59
Abbildung 13: Absolute Foci-Zahlen vor Normalisierung sowie Darstellung der Einzelwerte zur Veranschaulichung der Streubreite der normalisierten Anzahl residueller Foci für PC3 und LNCaP.....	60
Abbildung 14: Absolute Focizahlen <i>ex vivo</i>	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper	16
Tabelle 2: Chemikalien	17
Tabelle 3: Medium und Lösungen	18
Tabelle 4: Laborutensilien	19
Tabelle 5: Geräte	20
Tabelle 6: Software	20
Tabelle 7: Berechnungen für Immunfluoreszenzfärbungen	21
Tabelle 8: Berechnungen für Immunhistochemiefärbungen	22
Tabelle 9: Fraktionierte Bestrahlungsschemata <i>in vitro</i>	25
Tabelle 10: Fraktionierte Bestrahlungsschemata <i>ex vivo</i>	30
Tabelle 11: Patientenkollektiv	32
Tabelle 12: Ergebnisse der Signifikanzanalyse für die Bestrahlung <i>ex vivo</i>	43
Tabelle 13: Lineare Regression <i>ex vivo</i>	45

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PC) stellt mit etwa 25 % die häufigste Krebsneuerkrankung des Mannes dar, mit 12,3 % ist es die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern [1, 2]. Mehr als jeder 8. Mann erkrankt im Laufe seines Lebens an einem PC. Als Tumor des fortgeschrittenen Lebensalters liegt das mediane Erkrankungsalter bei 71 Jahren, rund 70% der Diagnosen werden nach dem 70. Lebensjahr gestellt [2].

Ab dem 45. Lebensjahr sind Anamnese und Tastuntersuchung Teil der gesetzlichen Früherkennung. Der Marker PSA (Prostata-spezifisches Antigen) spielt eine Rolle als Screening- und Verlaufsparemeter, wird aber auch durch benigne Ursachen beeinflusst [3]. Das PC verläuft meist initial symptomfrei, im weiteren Verlauf können Symptome wie Harnverhalt, Hämaturie oder Inkontinenz auftreten [4]. Bei fortgeschrittenen Erkrankungen kommt es am häufigsten zu einer ossären Metastasierung, welche zu Rücken- und Beckenschmerzen oder pathologischen Frakturen führen kann.

In über 90% der Fälle handelt es sich um Adenokarzinome. Das histopathologische Grading wird nach Drüsenmorphologie nach dem Gleason-Score vergeben [5, 6]. In der Praxis finden dabei Scores zwischen 6 und 10 Anwendung und zeigen eine direkte Korrelation zum Tumorverhalten und Krankheitsverlauf [7].

Die beiden bedeutendsten kurativen Therapieoptionen für lokal begrenzte und lokal fortgeschrittene PC sind die perkutane Radiotherapie (RT) und die operative Therapie [8]. Die RT wird intensitätsmoduliert (IMRT) und bildgestützt (IGRT) durchgeführt. Nach konventioneller Fraktionierung erfolgen fünf Bestrahlungen pro Woche mit 1,8 - 2 Gy für sieben bis neun Wochen bis zu einer Gesamtdosis von 74 - 80 Gy [9]. Darüber hinaus etablieren sich zunehmend hypofraktionierte Behandlungsschemata [10]. Die operative Therapie besteht aus der radikalen Prostatektomie ggf. mit pelviner Lymphadenektomie. Resektion und Strahlentherapie gelten als gleichwertig hinsichtlich der Tumorkontrolle, allerdings

zeigen sich für die Bestrahlung langfristig geringere Nebenwirkungen bei Kontinenz und Sexualfunktion [11, 12].

Bei mittlerem und hohem Risikoprofil soll (neo-)adjuvant eine hormonablative Therapie mit Androgendeprivation erfolgen [3]. Für frühe und niedrigmaligne PC kann die regelmäßige Überwachung („*Active Surveillance*“) angeboten werden, daneben ist auch die Brachytherapie eine Behandlungsoption. Bei weit fortgeschrittenem Tumorleiden ist ebenfalls ein kontrolliertes Zuwarten bis zu einem Symptomauftritt („*Watchful Waiting*“) möglich [3].

In den letzten Jahrzehnten ist die Mortalität des PC rückläufig, durch o.g. Therapieoptionen kann in vielen Fälle eine Kuration erreicht werden. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 91% [2].

1.2 Fraktionierung

Nach dem zeitlichen Auftreten von Bestrahlungsfolgen können Gewebe in früh- (stark proliferierende Gewebe) und spät-reagierend (z.B. Atemwege oder Urothel) unterteilt werden. Aufgrund einer Erholung der Zellen von sublethalen Strahlenschäden spielt die Fraktionierung der Gesamtdosis eine wichtige Rolle für die biologische Wirkung [13]. Generell ist der Fraktionierungseffekt, d.h. die Verringerung der Gewebereaktion durch Fraktionierung der Gesamtdosis in früh-reagierendem Gewebe gering und in spät-reagierendem Gewebe stark ausgeprägt [14, 15].

Die Fraktionierungsempfindlichkeit von Tumoren und Geweben kann durch das linear-quadratische Modell (LQ-Modell nach Kellerer und Rossi) beschrieben werden [16]. Zellüberlebenskurven nach Exposition gegenüber Strahlung zeigen im Niedrigdosisbereich eine abgeflachte Schulter und im Hochdosisbereich einen nahezu exponentiellen Verlauf. Diese Eigenschaft der Kurve wird durch zwei Anteile des Zellschadens durch Bestrahlung erklärt: einen α - und einen β -Teil [17]. Der α -Teil spiegelt die Wirkung eines einzelnen Sekundärelektrons als Bestrahlungsfolge und der resultierenden Doppelstrangbrüche (DSB) wider, die Wahrscheinlichkeit wächst linear mit der Dosis D (αD). Der β -Teil steht für die Interaktion zwischen zwei benachbarten DSB, die Wahrscheinlichkeit hierfür steigt

mit dem Quadrat der Dosis D (βD^2). Die Überlebenswahrscheinlichkeit S einer Zelle nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis D kann durch die Formel

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

angegeben werden.

Die Werte für α und β sind hierbei gewebspezifisch und beschreiben die Radiosensitivität der Zellen. Der Quotient bildet den α/β -Wert. Dieser stellt die Dosis dar, bei der beide Mechanismen einen gleich großen Anteil an der Zellschädigung haben und wird in Gray (Gy) angegeben. Gewebe mit einem hohen α/β -Wert sind weniger reparaturfähig und weniger fraktionierungsempfindlich, analog ist bei niedrigem α/β -Wert das Gewebe reparaturfähiger und fraktionierungsempfindlicher [18]. Die meisten Tumoren besitzen als stark proliferierende Gewebe einen hohen α/β -Wert.

Bei Erhöhung der Dosis pro Fraktion gegenüber der konventionellen Fraktionierung von 1,8 bis 2 Gy pro Tag wird von einer Hypofraktionierung (HFX) gesprochen [19]. Die HFX kann bei Tumoren mit niedrigem α/β -Wert einen Vorteil für die Tumorkontrolle durch die Bestrahlung bedeuten und eine Verbreiterung des therapeutischen Fensters ermöglichen. Allerdings erhöht sich dadurch aber auch das Risiko für dosislimitierende Nebenwirkungen des umliegenden Normalgewebes (für das PC vor allem Rektum und Blase). Dieses Risiko kann durch eine verringerte Gesamtstrahlendosis reduziert werden. Für Tumoren mit hohen α/β -Werten würde diese Reduktion der Gesamtdosis auch eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit des Therapieerfolgs bedeuten, sodass nur Patienten mit Tumoren mit einem α/β -Wert, der niedriger als der des dosislimitierenden Normalgewebes ist, potenziell von einer HFX profitieren würden [20]. Des Weiteren kann die HFX eine verkürzte Behandlungsdauer, sozioökonomische Vorteile sowie einen höheren Patientenkomfort bieten [21].

Für das PC als langsam wachsender Tumor wurde, aus klinischen Daten abgeleitet, erstmals ein niedriger α/β -Wert von Brenner und Hall 1999 postuliert [22]. Meta-Analysen vermuten einen α/β -Wert für das PC um etwa 1,5 Gy [23]. Daraus ergibt sich die Rationale, dass bei der Behandlung von PC die HFX einen Vorteil bietet. Mehrere randomisierte Phase-III-Studien [24-27] zeigen eine

Nicht-Unterlegenheit der HFX beim PC gegenüber der konventionellen Fraktionierung bei keiner oder nur geringer Zunahme der Toxizität gastrointestinal und urogenital. Bislang veröffentlichte Follow-Up-Studien nach 10 - 12 Jahren bestätigen diese Ergebnisse [28-30].

Die statistischen Näherungen des α/β -Werts für das PC suggerieren auch eine deutliche intertumorale Variabilität mit einem Konfidenzintervall von 0,1 - 4 Gy [31]. Auch der Einfluss des Zeit-Faktors durch die verkürzte Behandlungsdauer und dadurch eine Unterschätzung des α/β -Werts für das PC wird diskutiert [32]. Aus dieser Variabilität ergibt sich, dass vermutlich nicht alle Patienten von HFX im gleichen Maße profitieren. Zur Anpassung der Therapie für HFX oder die konventionelle Fraktionierung müsste für Patienten die individuelle Fraktionierungsempfindlichkeit prätherapeutisch bestimmt werden können.

Die derzeitigen Kenntnisse über α/β -Werte von Tumoren stammen aus mathematischen Modellierungen großer klinischer Studien und experimentell aus Xenograft-Tumoren [33]. Aus dem Vergleich verschiedener Fraktionierungsschemata von Patientenkollektiven kann durch mathematische Modellierung ein α/β -Wert ermittelt werden [23, 25].

Vorarbeiten haben gezeigt, dass eine ausgeprägte Variabilität der Strahlenempfindlichkeit des PC zwischen verschiedenen Patienten besteht, die *ex vivo* nachgewiesen werden kann [34]. Eine analoge Bestimmung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit wurde bislang noch nicht durchgeführt. Ob der für die Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit etablierte *ex vivo* Assay auch die Bestimmung der Fraktionierungsempfindlichkeit eines individuellen Tumors vor Beginn der Therapie ermöglicht ist bislang noch nicht untersucht worden.

1.3 Der γ H2AX-Assay

Ionisierende Strahlung löst in der DNA Doppelstrangbrüche (DSB) aus, die unrepariert potenziell letal sind [35]. Am Ort eines DSB liegt das Histon H2AX in phosphorylierter Form vor (= γ H2AX) [36]. In der Folge binden weitere Proteine am Ort des γ H2AX und es entsteht ein *ionizing radiation induced focus* (IRIF) [37,

38]. Mit Hilfe eines Immunfluoreszenz-Assays kann dieser Focus sichtbar gemacht werden. Dabei bildet ein γ H2AX-Focus einen DSB ab [38].

Die zelluläre Antwort zur Beseitigung von DSB erfolgt in der Regel innerhalb weniger Stunden. Dabei kann die Reparatur von DSB über zwei Reparaturmechanismen, das *non homologous End-Joining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) erfolgen. Dabei ist das NHEJ die vorherrschende Variante, hierbei wird ohne Notwendigkeit einer Matrize durch eine Proteinkaskade der DSB wiederhergestellt. Die HR basiert auf der Reparatur entlang der Schwesterchromatiden und ist daher weniger fehleranfällig.

Im Rahmen der Zellreparaturmechanismen werden DSB beseitigt und γ H2AX dephosphoryliert, sodass die Anzahl der Foci sinkt [39]. Residuelle Foci repräsentieren damit unreparierte, potenziell letale DSB als Ausdruck der Strahlenwirkung [35, 40].

Für eine zuverlässige Foci-Bestimmung müssen normoxische Bedingungen sichergestellt sein [41, 42]. In Vorarbeiten mit dem γ H2AX-Assay wurden hierfür Pimonidazol- und BrdU-Färbungen genutzt, um zu gewährleisten, dass ausschließlich ausreichend oxygenierte und proliferierende Gewebeabschnitte ausgewertet werden. Des Weiteren können unabhängig von der Bestrahlung *Microfoci* auftreten, die zu Ungenauigkeiten in der Auswertung führen können [43]. Außerdem wurde eine Abhängigkeit vom Zellzyklus gezeigt [44, 45] sowie eine deutliche Überexpression von Foci bei Zellen in Apoptose [46]. γ H2AX-Foci sind nicht bestahlungsspezifisch, verschiedene Noxen können zur Foci-Ausbildung führen [47].

Der γ H2AX-Assay konnte in den vergangenen Jahren als sensitives Verfahren zur Quantifizierung der Strahlenempfindlichkeit *in vitro* und *ex vivo* etabliert werden. Menegakis et al. konnten 2015 erstmalig mit Hilfe des γ H2AX-Assays die Strahlensensitivität *ex vivo* an einem weitreichenden Kollektiv aus 25 Patienten und zehn verschiedenen Tumorentitäten bestimmen [48, 49]. Die nachgewiesenen Foci pro applizierte Dosis waren dabei konsistent gegenüber der erwarteten Strahlenwirkung mit einer hohen Anzahl für strahlensensitive und einer niedrigen Anzahl für strahlenresistente Tumoren. Das PC zählte hierbei zu den intermediär sensiblen Tumoren [48]. In der Arbeit von Menegakis et al. zeigten sich

im Vergleich mehrerer Tumorentitäten die höchsten intertumoralen Unterschiede für das PC [49].

Auch in der darauffolgenden Arbeit von De-Colle et al. konnte mit Hilfe des γ H2AX-Assays *ex vivo* beim Vergleich von PC von 21 Patienten eine erhebliche Heterogenität der Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden mit Werten zwischen 0,8 und 3,2 Foci/Gy [34]. Dabei wurde auch die intratumorale Variabilität des PC mit dem γ H2AX-Assay untersucht. Diese zeigt sich gegenüber der intertumoralen Heterogenität wesentlich geringer ausgeprägt, sodass eine klinische Anwendung basierend auf Tumorbiopsien möglich erscheint.

Die Ergebnisse dieser Vorarbeiten sowie die einfache Anwendbarkeit und vergleichsweise schnelle Auswertbarkeit des Assays machen den γ H2AX-Assay zu einer vielversprechenden Methode für die Bestimmung der intrinsischen Radiosensitivität für eine individualisierte Behandlung.

Vergleichbare Experimente zur Bestimmung der Fraktionierungsempfindlichkeit des PC mit Hilfe des γ H2AX-Assays *ex vivo* wurden bislang noch nicht durchgeführt.

In vitro kann der Fraktionierungseffekt für Zellkulturen auch mit Hilfe von Kolonie-Bildungs-Assays experimentell untersucht werden [50]. *In vivo* ist keine individuelle Bestimmung möglich, hier können lediglich posttherapeutisch Patientengruppen, die in unterschiedlichen Fraktionierungen behandelt wurden, verglichen werden, um Rückschlüsse auf die Fraktionierungsempfindlichkeit zu ziehen [25, 51]. Es besteht somit bislang keine klinisch einsetzbare Methode für die Bestimmung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit vor Therapiedurchführung. Die prinzipielle Machbarkeit eines solchen Tests durch den γ H2AX-Assay ist Gegenstand dieses Projekts.

Aus den dargestellten Sachverhalten leiten sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielstellungen ab:

1. Quantifizierung des Fraktionierungseffekts durch den γ H2AX-Assay *in vitro* und Darstellung unterschiedlicher Fraktionierungssensitivitäten zwischen Zelllinien.

2. Quantifizierung des individuellen Fraktionierungseffekts *ex vivo* an PC-Gewebe.

3. Evaluation einer potenziellen Nutzbarkeit des γ H2AX-Assays für die Bestimmung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit prätherapeutisch *ex vivo*.

Die Etablierung eines zuverlässigen Testsystems hätte klinische Relevanz für die zielgerichtete, individuelle Therapie nach den spezifischen Tumoreigenschaften, um die bestmögliche, personalisierte Behandlung zu erreichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Für die *in vitro* Experimente wurden vier Zelllinien verwendet, Du145, PC3, LNCaP und FaDu. Die ersten drei genannten sind PC-Zelllinien, FaDu hingegen ist eine Zelllinie, die aus einem Kopf-Hals-Plattenzellkarzinom gewonnen wurde.

Du145 war die weltweit erste PC-Zelllinie, die etabliert werden konnte [52]. Sie wurde im Jahre 1975 von K. R. Stone et al. (Duke University Medical Center, Durham, USA) aus einer Hirnmetastase eines Prostata-Adenokarzinoms eines 69-jährigen Patienten kultiviert [53]. Die Zelllinie gilt als schwach Androgenrezeptor (AR)-positiv [54, 55], aber als nicht hormonsensitiv [56-58].

PC3 wurde 1979 von M. E. Kaighn et al. (Laboratory of Human Carcinogenesis, National Cancer Institute, Bethesda, USA) aus einer Knochenmetastase der Wirbelsäule eines 62-jährigen Patienten etabliert [59]. PC3 gilt als nicht hormonsensitiv [57, 60] und zeigt ebenfalls eine geringe Expression des AR [54]. Die Zelllinie zeigt auch Charakteristika von neuroendokrinen Tumoren wie die Expression von Chromogranin A (CgA) und neuronenspezifischer Enolase (NSE) [61, 62].

LNCaP wurde 1977 von J. S. Horoszewicz et al. (Roswell Park Memorial Institute, New York, USA) aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata eines 50-jährigen Patienten etabliert [63]. LNCaP exprimiert AR und PSA und zeigt ein stärkeres Wachstum unter Androgenen [61, 63]. Aber auch unter Abwesenheit von Androgenen zeigt sich ein Zellwachstum, sodass LNCaP nicht völlig Androgen-abhängig ist [58].

FaDu ist eine Plattenzellkarzinom-Zelllinie, die 1972 aus einem Hypopharynx-Karzinom von S. R. S. Rangan et al. (Johns Hopkins University Center for Medical Research and Training, Baltimore, USA und S.S.K.M. Hospital, Kalkutta, Indien) etabliert wurde [64]. Die Zelllinie ist in der Arbeitsgruppe gut bekannt, gilt als moderat radiosensitiv und wurde als Referenz in die Experimente eingeschlossen [65-67].

2.1.2 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationsbedingungen lagen bei 37 °C, 4 % CO₂ und 21 % O₂.

Die Zellen wurden regelmäßig bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90 % gesplittet. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium mit zusätzlich 10 % FBS. Es wurde darauf geachtet, möglichst niedrige Passagierungszahlen für Experimente zu benutzen (< 25). Einzig für LNCaP lag die maximale Passagierungsanzahl aufgrund der Ausstattung der Arbeitsgruppe und unzureichendem Anwachsen von aufgetauten Zellen mit niedriger Passagierungszahl bei 35.

Ex vivo Gewebe wurde in DMEM inkubiert mit zusätzlich FBS, Penicillin Streptomycin, NEAA und HEPES-Puffer (Rezeptur siehe 2.1.5).

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Isotyp	Klon	Block	Verdünnung	Hersteller
Anti-Phospho-Histon H2AX	Maus IgG1, monoklonal	JBW 301	BSA	1:1000	Merck KGaA, Deutschland
Alexa Flour TM 488 Tyramid	Ziege anti-Maus IgG		BSA	1:400	Life Technologies (Invitrogen), USA
Anti-Pimonidazol	Maus IgG1, monoklonal	NPI 4.3.1 1.3	PBS	1:50	Hypoxyprobe Inc., USA
Anti-BrdU	Maus IgG1, monoklonal	Bu 20a	PBS	1:50	BioRad, USA

Tabelle 1: Antikörper

2.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
ARK TM Kit	Dako Deutschland GmbH, Deutschland
ABC-Kit	Vectastain, Vector
AEC-Kit	Sigma Aldrich Co., USA
Agarose	Sigma Aldrich Co., USA
BrdU	SERVA Electrophoresis, Deutschland

BSA	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Deutschland
DAB Chromogen	Dako Deutschland GmbH, Deutschland
Dako Faramount Medium	Dako Deutschland GmbH, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich Co., USA
DMEM	Biochrom GmbH, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich Co., USA
Ethanol	SAV Liquid Production
FBS	Biochrom GmbH, Deutschland
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Deutschland
Formaldehydlösung 4%	SAV Liquid Production GmbH, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma Aldrich, USA
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Deutschland
HEPES-Puffer	Biochrom GmbH, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich Co., USA
KCl	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich Co., USA
NaCl	VWR Chemicals International, Belgien
Natriumpyruvat	Biochrom GmbH, Deutschland
NEAA	Biochrom GmbH, Deutschland
NiCl ₂	Sigma Aldrich Co., USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Deutschland
Pimonidazol	Natural Pharmacia International, USA
RPMI	Life Technologies (Gibco), USA
Triton X100	Merck KGaA, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma Aldrich Co., USA
Trypsin	Life Technologies (Gibco), USA
TSA SuperBoost™ Kit	Life Technologies (Invitrogen), USA
Xylol	AppliChem GmbH, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma Aldrich Co., USA

Tabelle 2: Chemikalien

2.1.5 Medium und Lösungen

Name	Bestandteile	Menge
RPMI + 10 % FBS (550 ml)	RPMI-Medium	500 ml
	FBS	50 ml
DMEM complete (587 ml)	DMEM-Medium	500 ml
	FBS	58 ml
	HEPES-Puffer	11,6 ml
	NEAA	5,8 ml
	Natriumpyruvat	5,8 ml
	Penicillin/Streptomycin	5,8 ml
DMEM complete + Pimonidazol/BrdU	DMEM complete	587 ml
	Pimonidazol	336,6 µl
	BrdU	178,1 µl
PBS (1 l)	NaCl	8 g
	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	1,44 g
	KCl	0,2 g
	K ₂ HPO ₄	0,2 g
	Aqua dest.	1 l
Citratpuffer (1 l)	0,1 mol/l Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	82 ml
	0,1 mol/l Citronensäure-Monohydrat	18 ml
	Aqua dest.	900 ml
BSA-Lösung (10 ml)	BSA	0,1 g
	PBS	10 ml
Agarose-Gel	Agarose	1,5 %
	DMEM	98,5 %
Hämatoxylin (1 l)	Natriumiodat	0,2 g
	Kristallines Hämatoxylin	1 g
	Zitronensäuremonohydrat	1 g
	Chloralhydrat	50 g
	Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	50 g
Epitope Retrieval A (0,1M)	Zitronensäuremonohydrat	21,01 g in 1 l Aqua dest.
Epitope Retrieval B (0,1M)	Tri-Natrium-Zitrat-Dihydrat	29,44 g in 1 l Aqua dest.
Zitrat-Puffer	Epitope Retrieval A (0,1M)	82 ml
	Epitope Retrieval B (0,1M)	18 ml
	Aqua dest.	900 ml

Tabelle 3: Medium und Lösungen

2.1.6 Laborutensilien

Utensil	Hersteller
Adhäsionsobjektträger SuperFrost	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
IHC-Objektträger TOMO Adhesive Glass Slides	Matsunami Glass Ind., Japan
HE-Objektträger	R. Langenbrinck, Deutschland
Deckgläser	R. Langenbrinck, Deutschland
BD-Falcon T-25-Flaschen	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
BD-Falcon T-75-Flaschen	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Petrischalen klein/groß	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Falcon-Röhrchen 10 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Falcon-Röhrchen 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Kryotubes	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
Eppendorftubes	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland Eppendorf AG, Deutschland
Filterkarten Cytospin	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Neubauer-Zählkammer	NanoEnTek Inc., USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Stripetten Costar 2/5/10/25/50 ml	Corning Inc., USA
Einbettkästchen	Engelbrecht GmbH, Deutschland
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Pinzette	Aesculap AG, Deutschland

Tabelle 4: Laborutensilien

2.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Axio Imager Z1 Apotome Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss AG, Deutschland
Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Deutschland
AxioCamMRm Monochrome Digitalkamera	Carl Zeiss AG, Deutschland
Objektiv für Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop (40x, 1,6 Öl, Neofluar)	Carl Zeiss AG, Deutschland
Lichtmikroskop Weilovert S	Hund, Deutschland
Inkubator HERA Cell 240	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Nanozoomer	Hamamatsu, Japan
Zentrifuge 5804R und 5417R	Eppendorf, Deutschland
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C) Liebherr-Comfort	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C) Herafreezer	Heraeus, Deutschland
Cryo 1 Freezing Container	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	Integra Biosciences, Deutschland
Pipetten 10 µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf AG, Deutschland
Mikrotom	Carl Zeiss, Deutschland
LINAC 6 MV-Photonen	Elekta, Schweden

Tabelle 5: Geräte

2.1.8 Software

Name	Hersteller
ZEN lite blue edition <i>Version 2.5.75.0</i>	Carl Zeiss AG, Deutschland
NDP.view2 <i>Version 2.7.25</i>	Hamamatsu Photonics, Japan
ImageJ <i>Version 1.54g</i>	NIH, USA
GraphPad Prism <i>Version 5.04</i>	GraphPad Software, USA

Tabelle 6: Software

2.1.9 Berechnungen für Immunfluoreszenzfärbungen

Die Herstellung des Gesamtvolumens der Lösungen für die Färbungen erfolgte je nach Anzahl n der zu färbenden Schnitte bzw. für *in vitro* für die zu färbenden Zell-Spots (zwei pro Objektträger). Je Schnitt bzw. Spot wurde ein Volumen von 100 µl vorgesehen.

Reagenz	Zielgröße	Formel
	Gesamtvolumen V_{ges}	$= n \times 100 \mu\text{l}$
γ H2AX-Antikörper	Verdünnung anti- γ H2AX	1:1000
	Volumen Antikörper V_{AK}	$= V_{\text{ges}} / 1000$
	Volumen Block-Reagenz V_{Block}	$= V_{\text{ges}} - V_{\text{AK}}$
Stopp-Lösung	Verdünnung Stopp-Lösung	1:11
	Volumen Stopp- Stammlösung V_{Stopp}	$= V_{\text{ges}} \times (1:11)$

	Volumen PBS V_{PBS}	$= V_{\text{ges}} - V_{\text{Stopp}}$
DAPI	Verdünnung DAPI	1:1000
	Volumen DAPI V_{DAPI}	$= V_{\text{ges}} / 1000$
	Volumen PBS V_{PBS}	$= V_{\text{ges}} - V_{\text{DAPI}}$
Tyramid Amplifikation	Volumen 100X Tyramid Stammlösung	$= n \times 1 \mu\text{l}$
	Volumen 100X H ₂ O ₂ - Lösung	$= n \times 1 \mu\text{l}$
	Volumen X Reaktionspuffer	$= n \times 100 \mu\text{l}$

Tabelle 7: Berechnungen für Immunfluoreszenzfärbungen

2.1.10 Berechnungen für Immunhistochemiefärbungen

Reagenz	Zielgröße	Formel
	Gesamtvolumen V_{ges}	$= n \times 100 \mu\text{l}$
BrdU-Antikörper und ARK	Anti-BrdU-Konzentration	262 $\mu\text{g/ml}$
	Antikörper-Verdünnung	1:50
	Volumen BrdU-Antikörper V_{AK}	$= V_{\text{ges}} / 50$
	Volumen Biotinylierung V_{Bio}	$= (262 \mu\text{g/ml} / 100 \mu\text{g/ml}) \times V_{\text{AK}}$
	Volumen Block-Reagenz V_{Block}	$= V_{\text{ges}} / 25$
	Volumen PBS V_{PBS}	$= V_{\text{ges}} - (V_{\text{AK}} + V_{\text{Bio}} + V_{\text{Block}})$
DAB-Chromogen	Volumen DAB-Substrat V_{Sub}	$= n / 10$
	Volumen DAB- Chromogen	1 Tropfen je ml V_{Sub}
	Volumen Nickelchlorid	2,5 μl je ml V_{Sub}
Peroxidase Löschpuffer	Konzentration H ₂ O ₂ - Grundlösung	30 %
	Volumen H ₂ O ₂ V_{H2O2}	$= V_{\text{ges}} / 100$
	Volumen PBS V_{PBS}	$= V_{\text{ges}} - V_{\text{H2O2}}$
Pimonidazol- Antikörper	Anti-Pimonidazol- Konzentration	500 $\mu\text{g/ml}$
	Verdünnung Anti- Pimonidazol	1/100
	Volumen Antikörper V_{AK}	$= V_{\text{ges}} / 100$
	Volumen Block Serum V_{S}	$= V_{\text{ges}} - V_{\text{AK}}$
	Volumen PBS	10 ml

Biotinylierter Antikörper ABC Kit	Volumen Serum	150 µl
	Volumen Biotinylierungsantikörper	50 µl
Vectastain ABC Elite Reagenz	Volumen PBS	5 ml
	Volumen Reagenz A	100 µl
	Volumen Reagenz B	100 µl
AEC-Kit	Aqua dest.	4 ml
	Acetat Puffer	2 Tropfen
	AEC Chromogen	1 Tropfen
	H ₂ O ₂ 3%	3 Tropfen

Tabelle 8: Berechnungen für Immunhistochemiefärbungen

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurden die Zellen aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -160 °C aufgetaut und in RPMI-Medium ausgesät. Die Zellen wurden frühestens zwei Passagierungen nach Auftauen für Experimente verwendet.

Zur Erhaltung wurden die Zellen beim Erreichen von Subkonfluenz gesplittet. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden durch Inkubation mit Trypsin, Vermengung mit frischem Medium und die Zentrifugation bei 1200 G und RT für fünf Minuten. Das *Zell-Pellet* wurde mit frischem Medium vermengt, die Gesamtzellzahl mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern abgeschätzt und die Menge an Zellsuspension für 100 000 Zellen in einer T75-Flasche ausgesät.

2.2.2 Proliferation Assay

Für alle verwendeten Zelllinien wurden *Proliferation Assays* durchgeführt und einmal wiederholt. Dafür wurden in zehn T25-Flaschen jeweils 100 000 Zellen ausgesät und nach 24 Stunden das Medium einmalig gewechselt. Nach der Aussaat erfolgte in den darauffolgenden zehn (für Du145, PC3 und FaDu) bzw. 14 Tagen (für LNCaP) im Abstand von 24 h jeweils eine Auszählung einer Flasche mittels Zählkammern und eine Beurteilung des Grades der Konfluenz. Aus den täglichen

Zählungen wurde eine Wachstumskurve erstellt und eine Verdopplungszeit ermittelt.

2.2.3 Berechnung Proliferation Assay

Aus den Ergebnissen des *Proliferation Assay* wurde mit folgenden Formeln für exponentielles Wachstum die Verdopplungszeit t_v errechnet. Aufgrund der Begrenzung des Wachstums ab Erreichen der Subkonfluenz wurden hierbei nur die ersten sechs Tage, für LNCaP die ersten zehn Tage berücksichtigt.

$$y(t) = y(0) \cdot e^{(k \cdot t)}$$

$y(0)$ stellt den Startwert der 100 000 ausgesäten Zellen dar, t die Zeit nach Aussaat in Tagen und k die Wachstumskonstante. Daraus kann die Verdopplungszeit t_v errechnet werden.

$$t_v = \frac{\ln 2}{k}$$

2.2.4 Cytospin und Fixierung

Die Zellen wurden aus der Zellkulturflasche mit Hilfe von Trypsin gelöst und gezählt. Die daraus errechnete Menge für 500 000 Zellen wurde mit PBS gewaschen. Für die Zentrifugation mit dem *Cytospin* wurden 125 μ L der Zellsuspension pro Spot entnommen, sodass jeweils ca. 62 500 Zellen auf einem Spot vorhanden sind. Die Zentrifugation erfolgte für zwei Minuten bei 200 RPM in RT. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten in 4-prozentigem Formalin fixiert und entweder sofort gefärbt oder bis zur Färbung bei 4 °C und Dunkelheit in PBS aufbewahrt.

2.2.5 Übersicht Versuchsablauf in vitro

Für die *in vitro* Bestrahlungsexperimente wurden jeweils 100 000 Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium gewechselt, anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert, bis die Subkonfluenz bei ca. 90 % erreicht war (Du145, PC3 und FaDu drei Tage, LNCaP sieben Tage). Die Inkubationsdauer basierte auf den Ergebnissen der zuvor durchgeführten

Proliferation Assays der Zelllinien. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Zellen innerhalb von 96 Stunden und weitere 24 Stunden Inkubation (siehe **Tabelle 9**). Dann wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen gelöst und mittels *Cytospin* auf Objektträger übertragen und die Immunfluoreszenzfärbung für γ H2AX durchgeführt (siehe **Abbildung 1**).

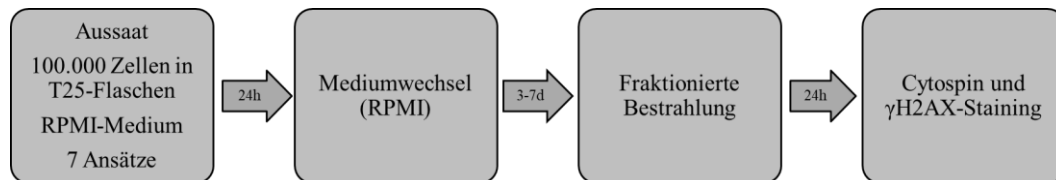


Abbildung 1: Übersicht der Arbeitsschritte *in vitro*
Für die Bestrahlung von Du145, PC3, LNCaP und FaDu.

Alle bestrahlten Zellen erhielten dieselbe Gesamtdosis von 8 Gy. Allerdings unterschieden sich die Fraktionierung und somit die Einzeldosen der Bestrahlungen (siehe **Tabelle 9: Fraktionierte Bestrahlungsschemata *in vitro***). Für die Vergleichbarkeit des unreparierten DNA-Schadens nach Bestrahlung wurde dieselbe Dauer von 24 Stunden zwischen der letzten Bestrahlung und dem Abstoppen der Zellen angestrebt.

Eine Erfüllung beider Kriterien aus derselben Dauer zwischen erster und letzter Bestrahlung und dem gleichmäßigen Abstoppen nach 24 Stunden nach Bestrahlung war für die einmalige Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 8 Gy nicht möglich. Daher wurde dieser Versuchsarm gedoppelt: Im Versuchsarm 1x 8 Gy I wurden die Zellen nach 24 Stunden abgestoppt und damit 72 Stunden vor dem Ende des Experiments. Bei 1x 8 Gy II wurde die Experimentdauer identisch mit den anderen Gruppen gehalten, allerdings lag dadurch die Dauer zwischen der Bestrahlung und dem Abstoppen bei 96 Stunden. Ebenso wurden für die zwei unterschiedlichen Zeitpunkte des Abstoppens die unbestrahlte Kontrolle gedoppelt (siehe **Tabelle 9**).

	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 5
	8 Uhr	14 Uhr	8 Uhr	14 Uhr	8 Uhr	14 Uhr	8 Uhr	14 Uhr	14 Uhr
Ko. I	-	-	-	STOP					
Ko. II	-	-	-	-	-	-	-	-	STOP
8x 1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	STOP
4x 2 Gy	-	2 Gy	-	2 Gy	-	2 Gy	-	2 Gy	STOP
2x 4 Gy	-	4 Gy	-	-	-	-	-	4 Gy	STOP
1 x 8 Gy I	-	8 Gy	-	STOP					
1x 8 Gy II	-	8 Gy	-	-	-	-	-	-	STOP

Tabelle 9: Fraktionierte Bestrahlungsschemata *in vitro*

Applikation der Gesamtdosis von 8 Gy über 96 Stunden. Nach dem Abstoppen erfolgt unmittelbar die γ H2AX-Färbung.

2.2.6 γ H2AX-Färbung *in vitro*

Die γ H2AX-Färbung erfolgte analog zum etablierten und publizierten Protokoll [66, 69]. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit Triton X100 permeabilisiert und anschließend BSA-Lösung inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Primärantikörper gegen das phosphorylierte H2AX-Histon bebrütet. Die anschließende EGFP-Floureszenzmarkierung erfolgte durch Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa 488. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit DAPI durchgeführt. Abschließend wurden die Slides mit Fluoreszenz-Eindeckmedium konserviert und bis zur Untersuchung am Mikroskop bei 4 °C und Dunkelheit gelagert. Die Zellen wurden zwischen den Behandlungsschritten in PBS gewaschen.

2.2.7 *Bildgebung am Floureszenzmikroskop in vitro*

Für die Auswertung wurden die Schnitte an einem ZEISS Floureszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung mit Hilfe der Software *ZEN Blue* beurteilt und Bilder aufgenommen. Dabei wurden in Z-Richtung fünf einzelne Bilder im Abstand von 0,5 μ m aufgenommen. Die *Regions of Interest* (ROI) wurden durch den

Untersucher zufällig ausgewählt. Dabei wurden die Zellen nur unter Belichtung der Zellkerne (DAPI, Anregungswellenlänge: 353 nm, Filter: 335 - 383 nm. Emissionswellenlänge: 465 nm, Filter: 420 - 470 nm) aufgesucht und ausgewählt. Für EGFP lag die Anregungswellenlänge bei 488 nm bei einem Filter von 450 - 490 nm und die Emissionswellenlänge bei 509 nm mit Filter von 500 - 550 nm. Die fünf Einzelbilder wurden mit Hilfe des Programms *ZEN Blue* zu einer 2D-Projektion maximaler Intensität zusammengeführt. Es wurden Bilder einer Zelllinie und eines Experiments immer am selben Tag und unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Belichtungszeit lag für DAPI bei 5 ms und für EGFP bei 800 ms.

2.2.8 Auswertung der γ H2AX-Foci

Das Ziel waren für die Auswertung jeder Bedingung und jeder Zelllinie mindestens 150 Zellen, in Einzelfällen konnte dies nicht erreicht werden. Zur Auswertung wurden die Bilder gleichmäßig mit Hilfe des Programms *ZEN Blue* zur Kontrasterhöhung bearbeitet und manuell ausgezählt. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe des Programms *Image J* auf den Bildern ausgewählt, markiert und die Größe und die Fläche des Zellkerns bestimmt. Die Markierung der Zellkerne erfolgt über eine *Image-J-Macro*, die über die Funktionen der Wasserscheidentransformation, Lückenfüllung und Partikelerkennung die Zellkerne erkennt, umrandet und die Kernfläche berechnet.

Die Anzahl der γ H2AX-Foci wurde manuell ausgezählt und tabellarisch festgehalten (siehe **Abbildung 2**).

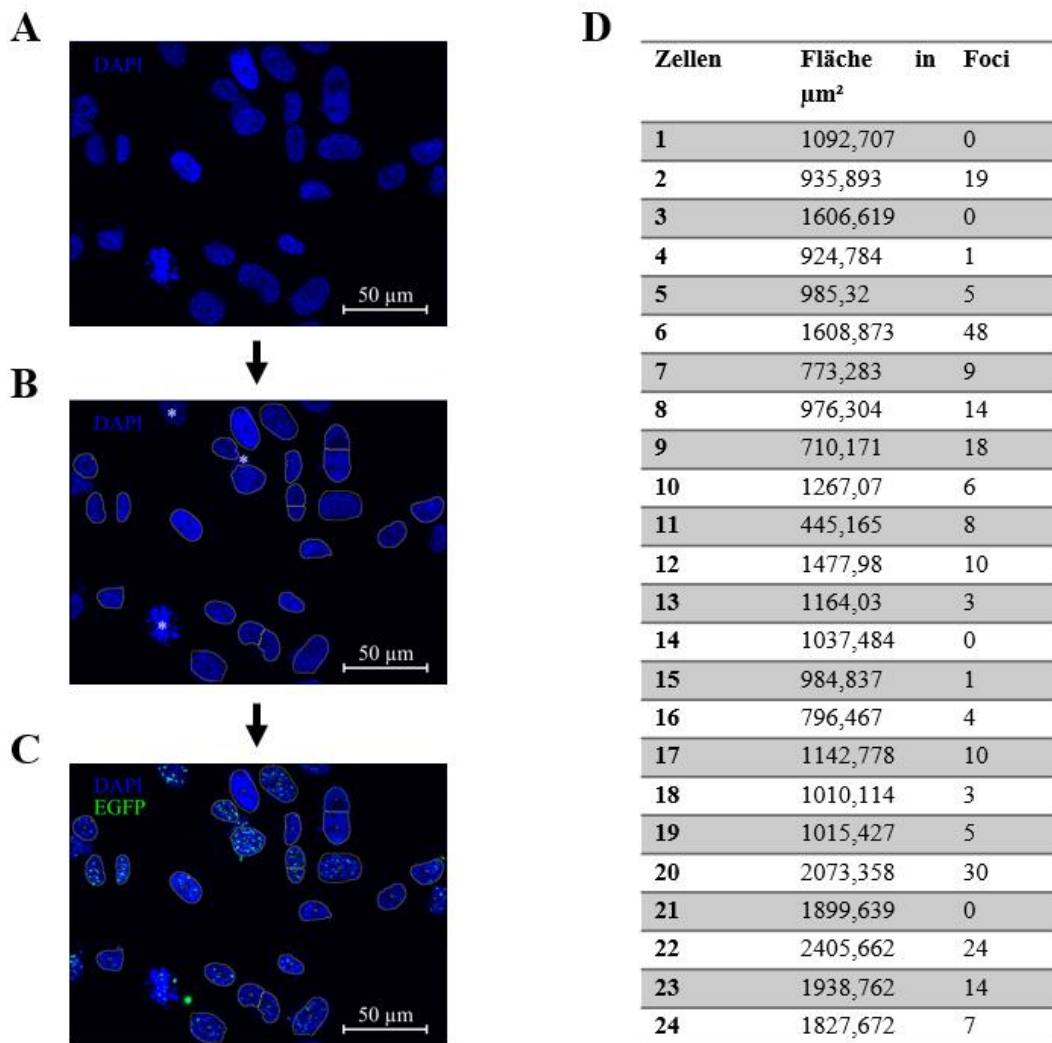


Abbildung 2: Auswertung der γ H2AX-Foci *in vitro*

Am Beispiel für die Zelllinie PC3 und Bestrahlung mit 1x 8 Gy. **A)** DAPI-Aufnahme der Zellkerne. Am Programm ZEN Blue können selektiv nur einzelne Kanäle gezeigt werden. **B)** Die Umrandung der Zellen erfolgt am DAPI-Bild mittels automatischer Zellkernererkennung. Apoptotische, nur teilweise erfasste oder überlagerte Zellen (*) werden manuell aus der Auswertung entfernt. **C)** Am Fusionsbild aus DAPI und EGFP werden für die markierten Zellen die Foci ausgezählt. **D)** Die Foci-Anzahl wird mit der Fläche der Zellen in einer Tabelle festgehalten. Um die Zielanzahl von 150 Zellen zu erreichen, werden mehrere Ausschnitte der Zellsots auf diese Weise ausgewertet.

Analog zur Normalisierung in vorausgegangenen Arbeiten [68, 70] wurde die Anzahl der Foci mit der Kerngröße in Relation gesetzt. Dafür wurde die Anzahl der gezählten Foci N_{foci} mit dem Verhältnis der Größe des jeweiligen Kerns $Area_i$ gegenüber der durchschnittlichen Kerngröße der Zelllinie bzw. der *ex vivo* Zellen $Area_m$ multipliziert.

$$cfoci = \left(\frac{Area_m}{Area_i} \right) \cdot N_{foci}$$

Darüber hinaus wurde die Foci-Anzahl der unbestrahlten Kontrolle ($cfoci_{0Gy}$) abgezogen. Wenn diese Subtraktion ein negatives Ergebnis zur Folge hatte wurde die Foci-Anzahl mit 0 angegeben. Daraus ergibt sich für die normalisierte Anzahl der Foci $nfoci$:

$$nfoci = \left(\frac{Area_m}{Area_i} \right) \cdot Nfoci - cfoci_{0Gy}$$

Für die Prüfung der statischen Signifikanz wurde die Bonferroni-Korrektur für die multiplen Tests der ANOVA-Analyse genutzt. Dabei wurden p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

2.2.9 Ex vivo Assay für Patientenmaterial

Für das Vorgehen mit Patientenmaterial und -daten lag eine positive Bewertung durch die Ethikkommission vor (135/2019BO2, 022/2016B01, 426/2013B01).

Das *ex vivo* Material wurde direkt aus dem Operationssaal in DMEM-Medium erhalten und unmittelbar aufgearbeitet. Dafür wurde das erhaltene Gewebe in mehrere kleine, möglichst dünne Stücke zerteilt, welche dann auf Agarosebeschichtete Petrischalen verteilt wurden. Die Petrischalen mit den Gewebestücken wurden anschließend mit DMEM aufgefüllt, sodass das Material vollständig bedeckt war. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert und 24 Stunden nach Erhalt zum ersten Mal bestrahlt (siehe **Abbildung 3** sowie **Tabelle 10**).

Vier Stunden vor der ersten Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt zu DMEM + Pimonidazol/BrdU. Nach erfolgter Bestrahlung wurde das Medium wieder zu DMEM gewechselt.

Für die Fixierung wurden die Gewebestücke aus den Petrischalen in Einbettkästchen gelegt und für mindestens 72 Stunden in 4-prozentigem Formalin bei RT gelagert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Aus dem eingebetteten Material wurden mit Hilfe eines Mikrotoms Schnitte mit einer Dicke vom 3 µm angefertigt. Es wurden jeweils drei konsekutive Schnitte für je eine HE-, IHC- und γH2AX-Färbung genutzt, sodass dieselben Zellen angeschnitten waren.

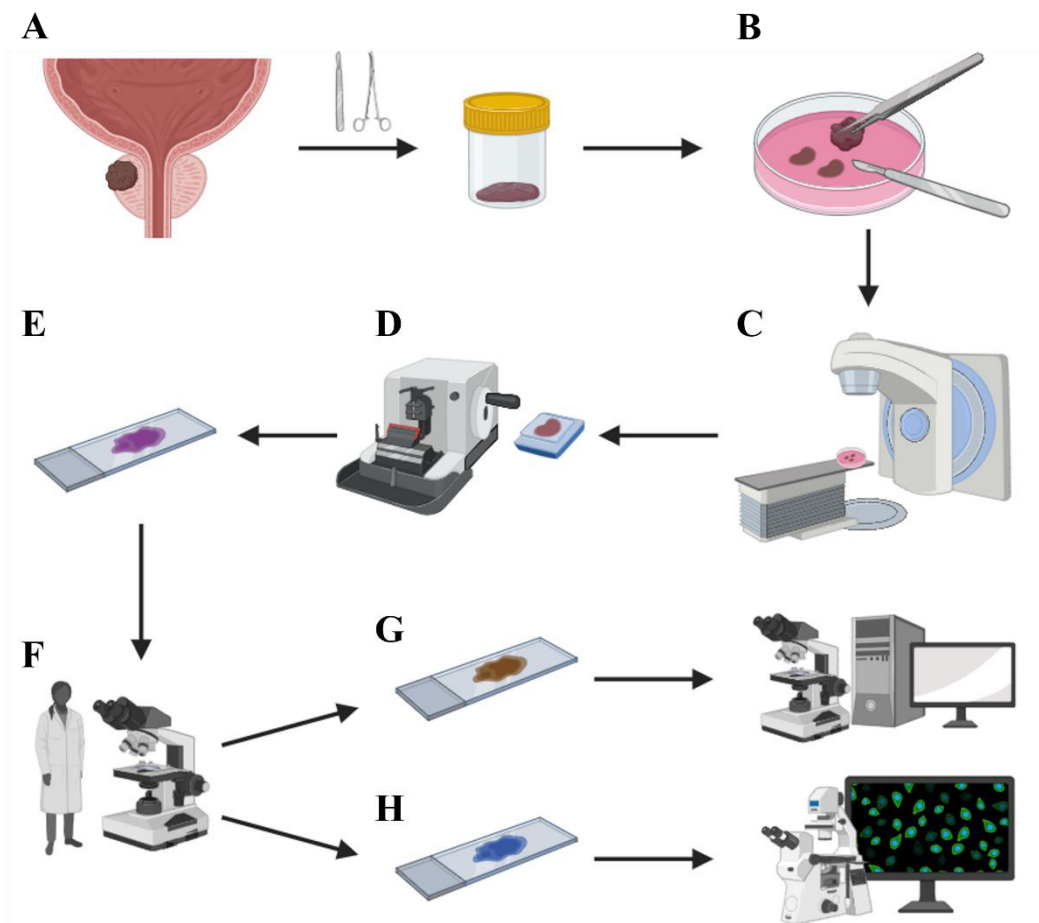


Abbildung 3: Übersicht Experiment *ex vivo*

A) Erhalt der Proben aus dem OP nach Prostatektomie. B) Zuschneiden und Verteilen auf die verschiedenen Versuchsarme, Inkubation auf DMEM und Agar, vor Bestrahlung Mediumwechsel (DMEM + BrdU/Pimonidazol, hier nicht gezeigt). C) Bestrahlung innerhalb von 48 h. D) Einbetten in Paraffin und drei konsekutive Schnitte am Mikrotom. E) HE-Färbung eines der drei Schnitte. F) Bewertung durch einen Pathologen bzgl. des Tumorgehalts der Schnitte. Bei positiver Tumorbewertung G) IHC-Färbung auf BrdU und Pimonidazol und H) γ H2AX-Färbung sowie anschließende Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. *Abbildung erstellt auf BioRender.com*

2.2.10 Übersicht Versuchsablauf *ex vivo*

Für die Experimente mit *ex vivo* Prostata-Gewebeproben wurde ein ähnliches Design im Vergleich zu den *in vitro* Experimenten gewählt. Als minimale Dauer zwischen den einzelnen Bestrahlungen wurden sechs Stunden gewählt. Analog zum *in vitro* Ablauf wurden die Proben nach Erhalt für 24 Stunden inkubiert. Anders als bei den *in vitro* Experimenten wurde der Zeitraum zwischen den einzelnen Bestrahlungen für alle Bedingungen konstant bei sechs Stunden gehalten. Alle Proben wurden sechs Stunden nach der letzten Bestrahlung abgestoppt und fixiert.

Daraus ergeben sich unterschiedlich lange Behandlungszeiten (siehe **Tabelle 10**). Die unbestrahlte Kontrolle wurde zusammen mit dem längsten dauernden Versuchsarm fixiert. Die Fixierung in Formalin erfolgte für mindestens 72 Stunden und anschließend die Einbettung in Paraffin.

Zeit nach Probenerhalt	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h	54 h	60 h	66 h	72 h
Ko.	-	-	-	-	-	-	-	-	STOP
8x 1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	1 Gy	STOP
4x 2 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	STOP				
2x 4 Gy	4 Gy	4 Gy	STOP						
1x 8 Gy	8 Gy	STOP							

Tabelle 10: Fraktionierte Bestrahlungsschemata *ex vivo*

Beginn der Bestrahlung nach Inkubation für 24 h einschließlich Mediumwechsel auf DMEM + Pimonidazol/BrdU vier Stunden vor der ersten Bestrahlung. Applikation der Gesamtdosis von 8 Gy. Abstoppen durch Fixierung in Formalin.

2.2.11 IHC-Färbung Gewebeschnitte

Die Färbung wurde entlang etablierter Protokolle durchgeführt [68]. Vor der Färbung erfolgte die Entparaffinierung mit Xylol und die Rehydratisierung mit einer Ethanolreihe mit absteigender Konzentration. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung durch Kochen in Citratpuffer. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte in PBS gewaschen.

Für die BrdU-Färbung wurde zunächst das ARKTM-Kit verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte die Applikation des im Kit enthaltenen Peroxidase-Block. Der Anti-BrdU-Antikörper wurde zunächst mit dem Biotinylierungsreagenz inkubiert, bevor das Block-Reagenz hinzugegeben wurde. Mit dieser vorbereiteten Antikörperlösung wurden die Schnitte bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der im Kit enthaltenen Lösung von Streptavidin/Peroxidase. Als letzter Schritt der BrdU-Färbung dann die Applikation des DAB-Chromogen.

Anschließend wurde erneut die endogene Peroxidase-Aktivität durch Applikation von H₂O₂-Lösung gedämpft. Daraufhin wurde für die Pimonidazol-Färbung das Vectastain ABC-Kit verwendet. Die Schnitte wurden zunächst mit der Block-Lösung inkubiert. Ohne einen Waschschrift wurde dann der Primärantikörper gegen Pimonidazol appliziert. Daraufhin erfolgte die Inkubation

mit dem im Kit enthaltenen biotinylierten Sekundärantikörper und anschließend mit dem Vectastain Elite ABC-Reagenz. Für das Chromogen wurde das AEC-Kit von Sigma Aldrich verwendet. Die drei im Kit enthaltenen Substanzen wurden vermischt und mit den Schnitten inkubiert. Abschließend erfolgte die Applikation von Hämatoxylin und ein Spülen in Leitungswasser. Die Schnitte wurden mit Hilfe von Dako Faramount Abdeckmedium mit Abdeckgläsern bedeckt.

2.2.12 γ H2AX-Färbung Gewebeschnitte

Die Schnitte wurden analog zu etablierten Protokollen gefärbt [68]. Für die Immunfluoreszenzfärbung der phosphorylierten H2AX-Histone wurde das TSA-*SuperBoost*-Kit von Thermo Fisher verwendet. Wie bei der IHC-Färbung beschrieben wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert, rehydriert und die Epitope desmaskiert.

Zu Beginn wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Applikation von H₂O₂ gedämpft. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem im Kit enthaltenen Block-Reagenz. Ohne Waschen wurde daraufhin der Primärantikörper appliziert und inkubiert. Daraufhin wurden das im Kit enthaltenen HRP-konjugierten Streptavidin hinzugegeben. Dann erfolgte die Tyramid-Markierung mit der vorbereiteten TSA-Lösung. Alle verwendeten Chemikalien sind im Kit enthalten. Nach der Inkubation erfolgte ohne Waschen die Applikation der Stopp-Lösung und Inkubation. Abschließend wurde die Färbung mit DAPI zugegeben. Die Schnitte wurden mit Hilfe von Dako Fluoreszenz Abdeckmedium mit Abdeckgläsern bedeckt.

2.2.13 Bildgebung am Fluoreszenzmikroskop ex vivo

Analog zur Auswertung der *in vitro* Experimente (vgl. 2.2.8) wurden die Schnitte am ZEISS Fluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die *ex vivo* Schnitte wurden entlang der Z-Achse 17 Einzelbilder im Abstand von 0,25 μ m aufgenommen. Die Belichtungszeiten lagen für DAPI (Anregungswellenlänge 353 nm) bei 8 ms und für EGFP (Anregungswellenlänge

488 nm) bei 200 ms. Auch hier erfolgte die digitale Zusammenführung der Bilder zu einer Maximum-Intensität-Projektion.

2.2.14 Erhaltendes Patientenmaterial

Für die Untersuchung der Fraktionierungsempfindlichkeit durch den γ H2AX-Assay wurden Teile von Prostatektomiepräparaten mit verschiedenen Fraktionierungsschemata bestrahlt. Es wurde Material von insgesamt zwölf Patienten aufbereitet und behandelt. Nach der pathologischen Begutachtung liegen fünf Proben vor, bei denen in ausreichend vielen Versuchsarmen Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, sodass die Immunfluoreszenz-Färbung stattfinden und die Auswertung erfolgen kann. Für Patient 7 konnte im Tumorstück, das mit 4x 2 Gy bestrahlt wurde, kein Tumor nachgewiesen werden, sodass dieser Wert fehlt.

Patient	Alter (Jahre)	Gleason-Score	ISUP-Gruppe	T und N Stadium	Histologie	PSA-Wert (ng/ml)
7	63	4+3	3	T3b N0	Adenokarzinom	34
9	55	4+4	5	T3a N0	Adenokarzinom	18
10	49	4+5	5	T3b N1	Adenokarzinom	5,2
11	67	4+3	3	T3b N1	Adenokarzinom	10
12	64	4+3	3	T2c N0	Adenokarzinom	9,5

Tabelle 11: Patientenkollektiv

Histologische und klinische Daten zu den fünf Patienten, deren Material ausgewertet werden konnte. Für die Patienten 1 bis 6 sowie Patient 8 lag kein oder nicht ausreichend Tumormaterial vor.

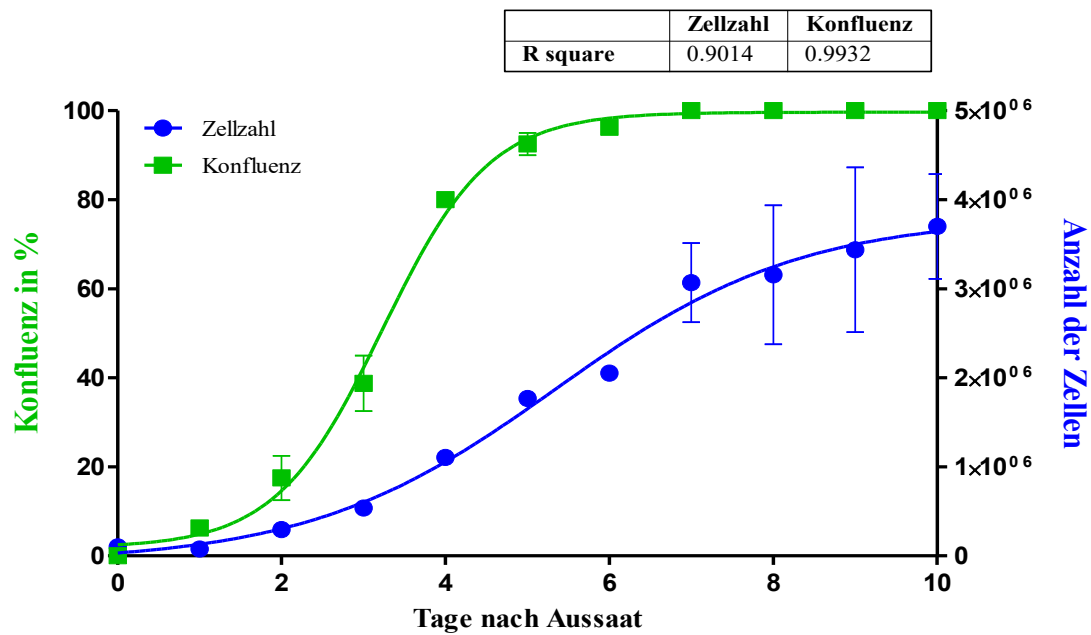
3 Ergebnisse

3.1 Wachstumseigenschaften der Zelllinien

Vor der Durchführung der Bestrahlungsexperimente *in vitro* wurden für alle Zelllinien *Proliferation Assays* durchgeführt. **Abbildung 4** zeigt eine Übersicht dieser Ergebnisse.

Für die Konfluenz sowie für die absolute Zellzahl zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von zehn Tagen für die Zelllinien FaDu, Du145 (siehe **Abbildung 4A**, **Abbildung 11** (Anhang)) und PC3 sowie 14 Tagen für LNCaP ein Verlauf, der am ehesten einem sigmoidalen Wachstum entspricht. Die Subkonfluenz wurde für die drei erstgenannten Zelllinien allesamt nach vier Tagen erreicht, für die langsamer wachsende Zellreihe LNCaP nach sieben Tagen. Im Anschluss zeigte sich rasch das Erreichen der Konfluenz und Stagnation auf diesem Level für den Rest der Beobachtungsdauer. Auch die absolut gezählte Zellzahl verhielt sich entsprechend einem sigmoidalen Wachstum mit zunächst exponentiellem Wachstum für sechs bis sieben Tage bzw. zehn Tage für LNCaP und anschließend regredienten Wachstumsraten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Feststellung der Verdopplungszeit nur der Zeitabschnitt, während dessen ein ungebremsten Wachstum der Zellzahl beobachtet wurde, berücksichtigt. Für FaDu, Du145 und PC3 entspricht das sechs Tage, für LNCaP zehn Tage (**Abbildung 4B**). Daraus konnte für FaDu eine Verdopplungszeit von 0,98 Tagen, für Du145 von 1,32 Tagen, für PC3 von 1,25 Tagen und für LNCaP von 2,06 Tagen ermittelt werden. Der Unterschied der Verdopplungszeiten weist keine statistische Signifikanz auf ($p=0,39$).

A



B

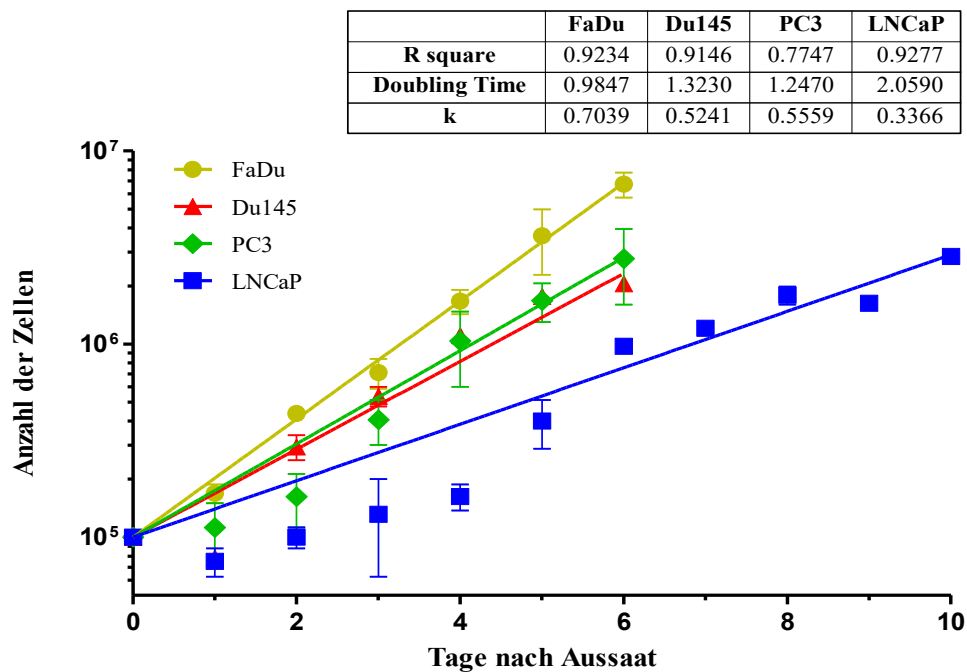


Abbildung 4: Erreichen der Konfluenz *in vitro* entlang eines sigmoidalen Wachstums

A) Beispielhafte Darstellung für die Zelllinie Du145. Die absolute Zellzahl (rechte Y-Achse, blau) zeigt ebenso wie die Konfluenz (linke Y-Achse, grün) ein sigmoidales Wachstum. *R square* gibt den *Fit* für die sigmoidale Wachstumskurve an. B) Ermittlung der Verdopplungszeit und exponentieller *Fit* eines ausgewählten Zeitraums für FaDu, Du145, PC3 und LNCaP. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

3.2 Auswirkung des Zeitpunkts des Versuchsendes auf die Anzahl residueller Foci pro Nukleus

Die Versuchsbedingungen für die unbestrahlte Kontrolle sowie die Einmalbestrahlung mit 8 Gy mit unterschiedlichen Stopp-Zeitpunkten wurden gedoppelt. **Abbildung 5** zeigt den Vergleich dieser beiden Versuchsarme für die drei untersuchten PC-Zelllinien.

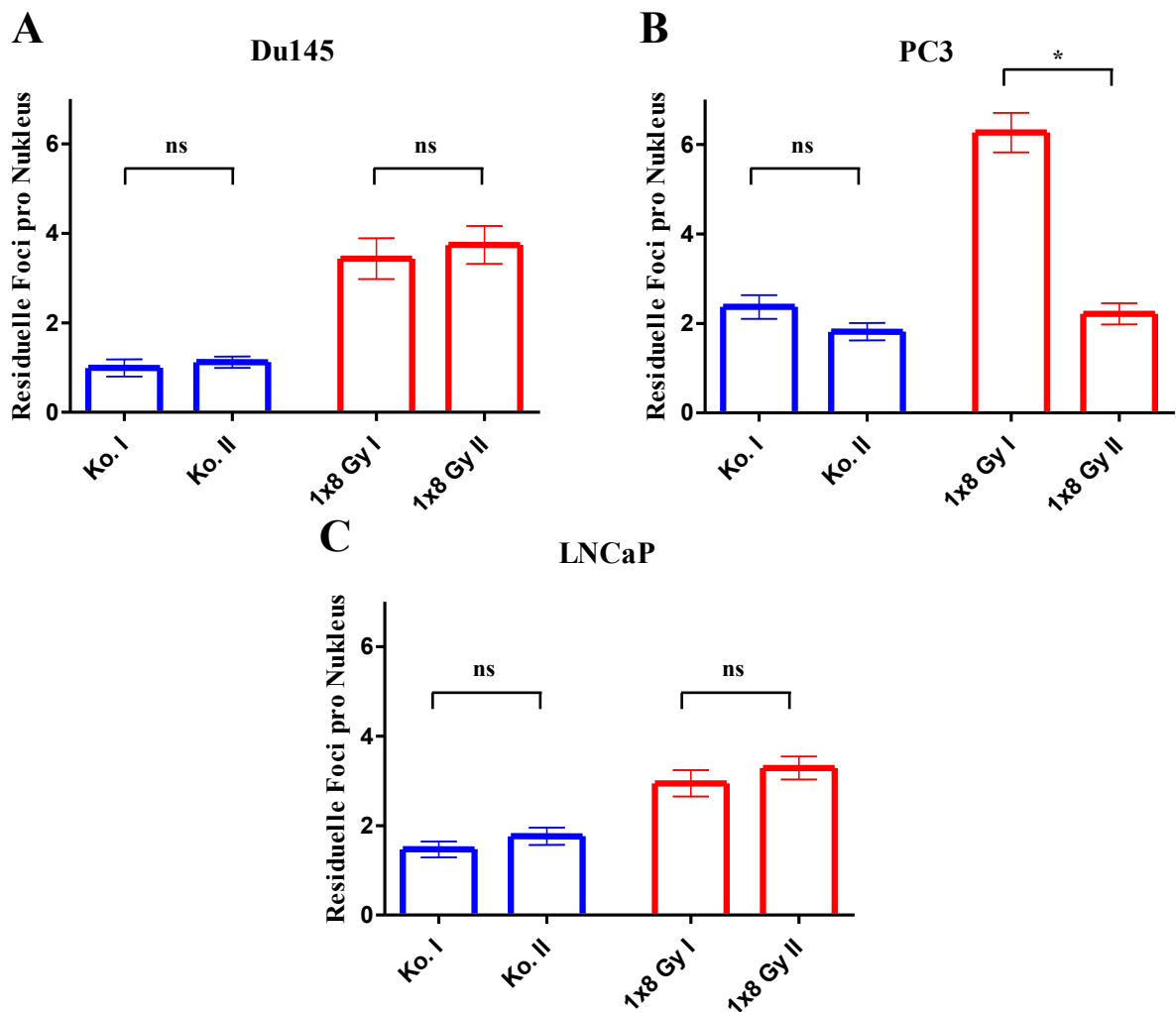


Abbildung 5: Vergleich der Focianzahl zwischen Ko. I und II sowie 1x 8 Gy I und II

Für Du145 sowie LNCaP zeigt sich zwischen den beiden Kontrollen sowie Einmalbestrahlungen mit 8 Gy kein signifikanter Unterschied. Zwischen den beiden Bestrahlungen mit 8 Gy Einzeldosis ergibt sich für PC3 ein deutlicher Unterschied mit höherer Foci-Anzahl für die früher abgestoppten Nuklei.

Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Kennzeichnung „*“ steht für ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$), „ns“ für ein nicht signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$).

Hierbei zeigte sich für alle Vergleiche der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied durch den Zeitpunkt des Abstoppens. Für die Einmalbestrahlung mit 8 Gy ergab sich für die Linien Du145 und LNCaP ebenfalls kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 5A, C**) durch die unterschiedliche Dauer zwischen Bestrahlung und Abstoppen. Einzig für die Zelllinie PC3 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Bedingungen (MW: 6,3 [SD: 9,2] vs. MW: 2,2 [SD: 4,9]; $p < 0,0001$) (**Abbildung 5B**).

In der Folge wurde der Versuchsablauf für die *ex vivo* Experiment festgelegt. Aufgrund begrenzter Ressourcen im Hinblick auf das Patientengewebe und wurden hierfür keine Versuchsarme gedoppelt. Es wurde sich für ein Abstoppen der Kontrolle gemeinsam mit der am längsten dauernden Bestrahlung (8x 1 Gy) gewählt, entsprechend Ko. II im *in vitro* Versuch sowie für ein Abstoppen aller bestrahlten Proben mit demselben Abstand zur letzten Bestrahlung (hier entsprechend 1x 8 Gy I). Im Folgenden werden für die weiteren *in vitro* Ergebnisse aufgrund der besseren Übersicht die Ergebnisse von Ko. II und 1x 8 Gy I dargestellt und mit „Ko.“, respektive „1x 8 Gy“ benannt.

3.3 Residuelle Foci nach Bestrahlung *in vitro* in unterschiedlichen Fraktionierungen zeigen hohe Focizahlen bei geringer Fraktionierung

Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse *in vitro* für die fraktionierte Bestrahlung der vier in die Experimente eingeschlossenen Zelllinien sowie Beispielbilder der Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung mit den blau dargestellten Zellkernen nach DAPI-Färbung und den leuchtend grünen γ H2AX-Foci.

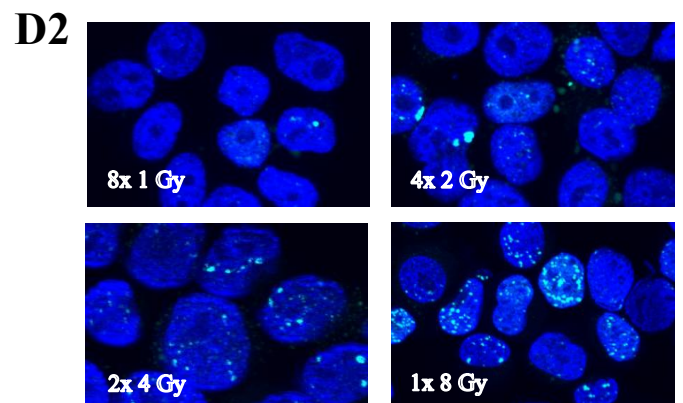
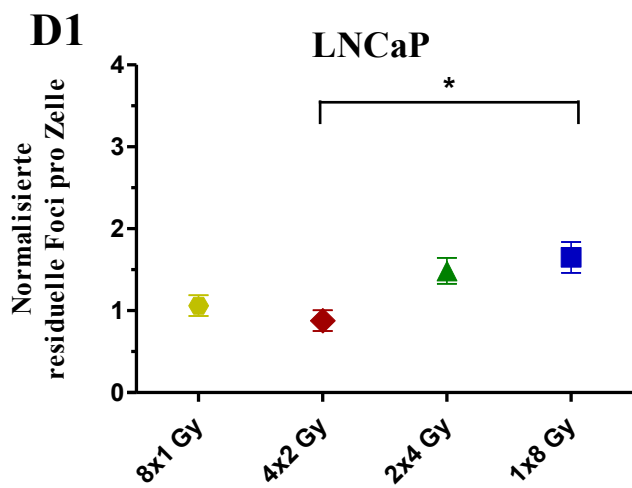
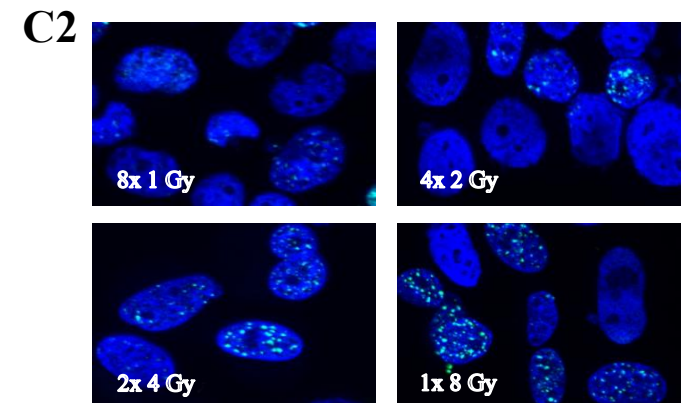
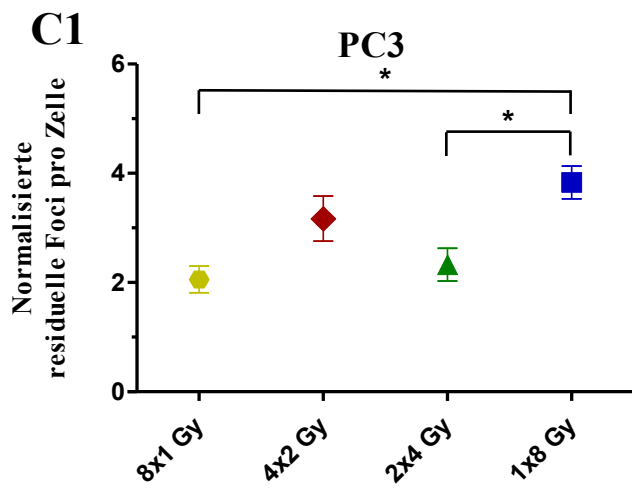
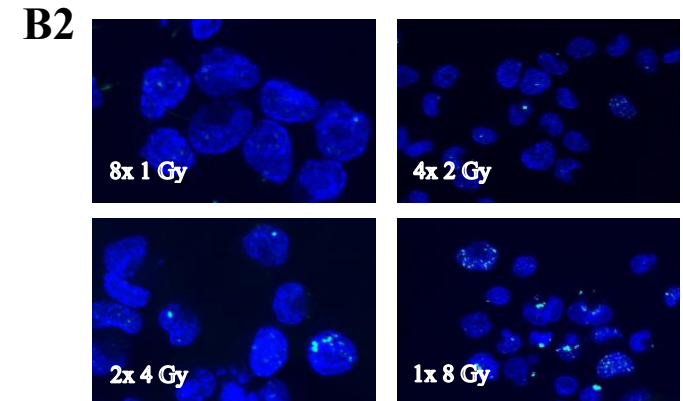
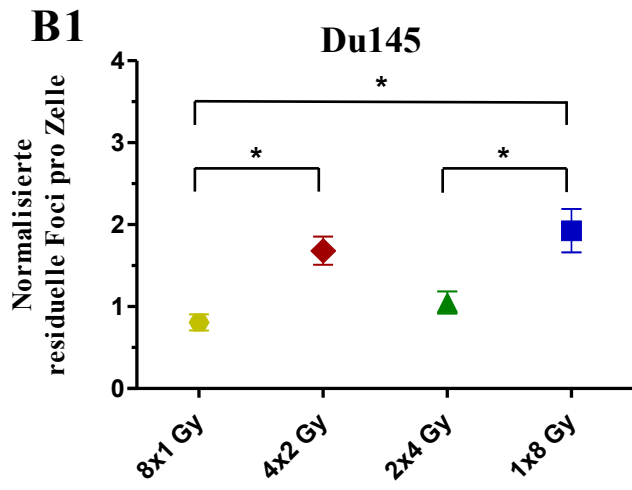
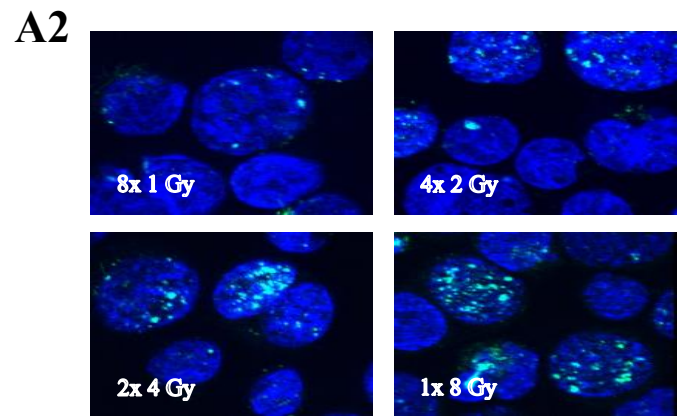
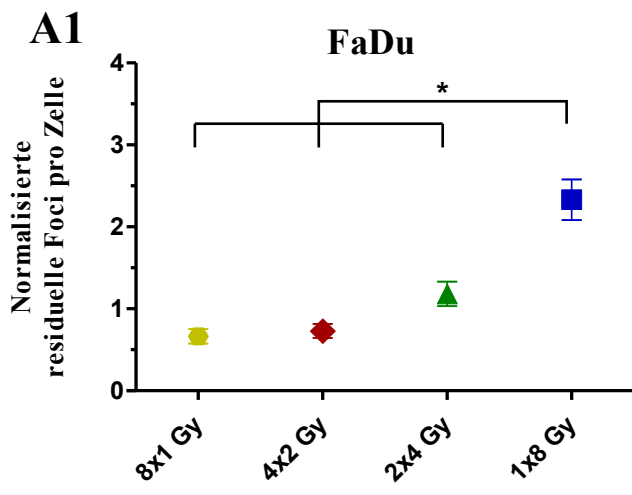


Abbildung 6: Induktion von Foci nach fraktionierter Bestrahlung für FaDu, Du145, PC3 und LNCaP

Für alle Experimente wurde die gleiche Gesamtdosis bei unterschiedlicher Fraktionierung verwendet.

A1-D1) Mittelwerte der normalisierten Anzahl der residuellen Foci. Normalisierung auf Fläche nach o.g. Formel. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

A2-D2) Beispielbilder der Fluoreszenzaufnahmen für die unterschiedlichen Fraktionierungen aus denen die Foci ausgewertet wurden. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Für die Kopf-Hals-Zelllinie FaDu zeigte sich bei gleicher Gesamtdosis (GD) von 8 Gy im Mittel eine höhere Anzahl an normalisierten residuellen Foci pro Zelle bei Bestrahlungsschemata mit hoher Einzeldosis (ED) (**Abbildung 6A:** 1x 8 Gy: 2,33 Foci/Nukleus; 2x 4 Gy: 1,18 Foci/Nukleus). Für Bestrahlungsschemata mit geringerer ED zeigten sich deutlich geringere Werte (4x 2 Gy: 0,73 Foci/Nukleus; 8x 1 Gy: 0,66 Foci/Nukleus). Die Unterschiede zwischen der Foci-Anzahl für Bestrahlung mit 1x 8 Gy gegenüber den anderen Fraktionierungen sind statistisch signifikant: 1x 8 Gy vs. 8x 1 Gy: $p < 0,0001$; 1x 8 Gy vs. 4x 2 Gy: $p < 0,0001$; 1x 8 Gy vs. 2x 4 Gy: $p < 0,0001$.

Die Anzahl der gesamt ausgezählten Zellkerne lag für die Kontrolle (Ko.) bei 399, für 8x 1 Gy bei 384, für 4x 2 Gy bei 479, für 2x 4 Gy bei 405 und für 1x 8 Gy bei 473 Zellkernen (vgl. auch **Abbildung 12A** (Anhang)).

Die Zelllinie Du145 zeigte ebenso eine höhere Anzahl residueller Foci/Nukleus mit höherer ED, der höchste Wert zeigte sich für das Schema mit 1x 8 Gy, der niedrigste unter den bestrahlten Zellen für 8x 1 Gy (**Abbildung 6B:** 1x 8 Gy: 1,93 Foci/Nukleus; 8x 1 Gy: 0,81 Foci/Nukleus).

Eine Ausnahme hiervon bildete die Bestrahlung mit 2x 4 Gy, welche trotz höherer ED eine geringere Menge residueller Foci/Nukleus auswies als 4x 2 Gy. (**Abbildung 6B:** 2x 4 Gy: 1,05 Foci/Nukleus; 4x 2 Gy: 1,68 Foci/Nukleus). Der Unterschied für 1x 8 Gy gegenüber 2x 4 Gy ($p = 0,0032$) sowie gegenüber 8x 1 Gy ($p < 0,0001$) zeigte sich statistisch signifikant, genauso wie 1x 8 Gy vs. 4x 2 Gy ($p = 0,0028$). Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen 4x 2 Gy und 2x 4 Gy ($p = 0,0942$) oder 1x 8 Gy ($p > 0,9999$).

Die Anzahl der gesamt ausgezählten Zellkerne lag für Ko. bei 386, für 8x 1 Gy bei 490; für 4x 2 Gy bei 448; für 2x 4 Gy bei 464 und für 1x 8 Gy bei 452 (vgl. auch **Abbildung 12B** (Anhang)).

Die Ergebnisse der zweiten der drei PC-Zelllinien PC3 zeigten mit derselben Ausnahme eine höhere Anzahl residueller Foci je Nukleus mit höherer Einzeldosis. So wurde für 1x 8 Gy die größte Anzahl residueller Foci pro Zelle ausgezählt, gefolgt von 4x 2 Gy und 8x 1 Gy (**Abbildung 6** Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **C**: 1x 8 Gy: 3,83 Foci/Nukleus; 4x 2 Gy: 3,17 Foci/Nukleus; 8x 1 Gy: 2,06 Foci/Nukleus). Eine Abweichung von diesem Muster zeigte sich für 2x 4 Gy mit dem zweitgeringsten Foci-Wert trotz der zweithöchsten Einzeldosis (**Abbildung 6C**: 2x 4 Gy: 2,33 Foci/Nukleus).

Die Ergebnisse zwischen 1x 8 Gy gegenüber 1x 8 Gy ($p=0,0003$) sowie gegenüber 2x 4 Gy ($p=0,0085$) zeigten statistische Signifikanz.

Die Anzahl der ausgezählten Zellen lag für 1x 8 Gy bei 434, für 2x 4 Gy bei 393, für 4x 2 Gy bei 482, für 8x 1 Gy bei 510 und für die Kontrolle bei 451 (vgl. auch **Abbildung 13C** (Anhang)).

Als dritte Prostatazelllinie wurde LNCaP bestrahlt und ausgewertet. Diese Zelllinie zeigte insgesamt eine niedrige Anzahl residueller Foci pro Nukleus. Die höchsten Werte wurden auch hier für eine hohe Einzeldosis beobachtet (**Abbildung 6D**: 1x 8 Gy: 1,65 Foci/Nukleus; 2x 4 Gy: 1,49 Foci/Nukleus). Bei geringerer Einzeldosis zeigten sich eine niedrigere Anzahl residueller Foci/Nukleus (**Abbildung 6D**: 4x 2 Gy: 0,88 Foci/Nukleus; 8x 1 Gy: 1,06 Foci/Nukleus) ohne statistische Signifikanz. Lediglich das Ergebnis von 1x 8 Gy vs. 4x 2 Gy zeigte statistisch Signifikanz ($p=0,0277$).

Die Anzahl der ausgewerteten Zellen lag für 1x 8 Gy bei 443 Zellen, für 2x 4 Gy bei 439, für 4x 2 Gy bei 477, für 8x 1 Gy bei 438 und für die Kontrolle bei 473 Zellen (vgl. auch **Abbildung 13D** (Anhang)).

3.4 Residuelle Foci nach Bestrahlung von *ex vivo* Prostatagewebe in unterschiedlichen Fraktionierungen zeigen hohe Focizahlen bei geringer Fraktionierung

Analog zu den Experimenten in Zellkultur wurde das Prostatagewebe aus den Prostatektomiepräparaten mit der gleichen Gesamtdosis von 8 Gy in unterschiedlichen Fraktionierungen bestrahlt. **Abbildung 7** zeigt beispielhaft für Patient 7 und Patient 9 HE-, IHC- und Immunfluoreszenzbilder sowie die Anzahl der normalisierten ausgezählten Foci/Nukleus. Für Patient 7 konnte aufgrund fehlender Tumorzellen im mit 4x 2 Gy bestrahlten Gewebe hierfür kein Datenpunkt ermittelt werden.

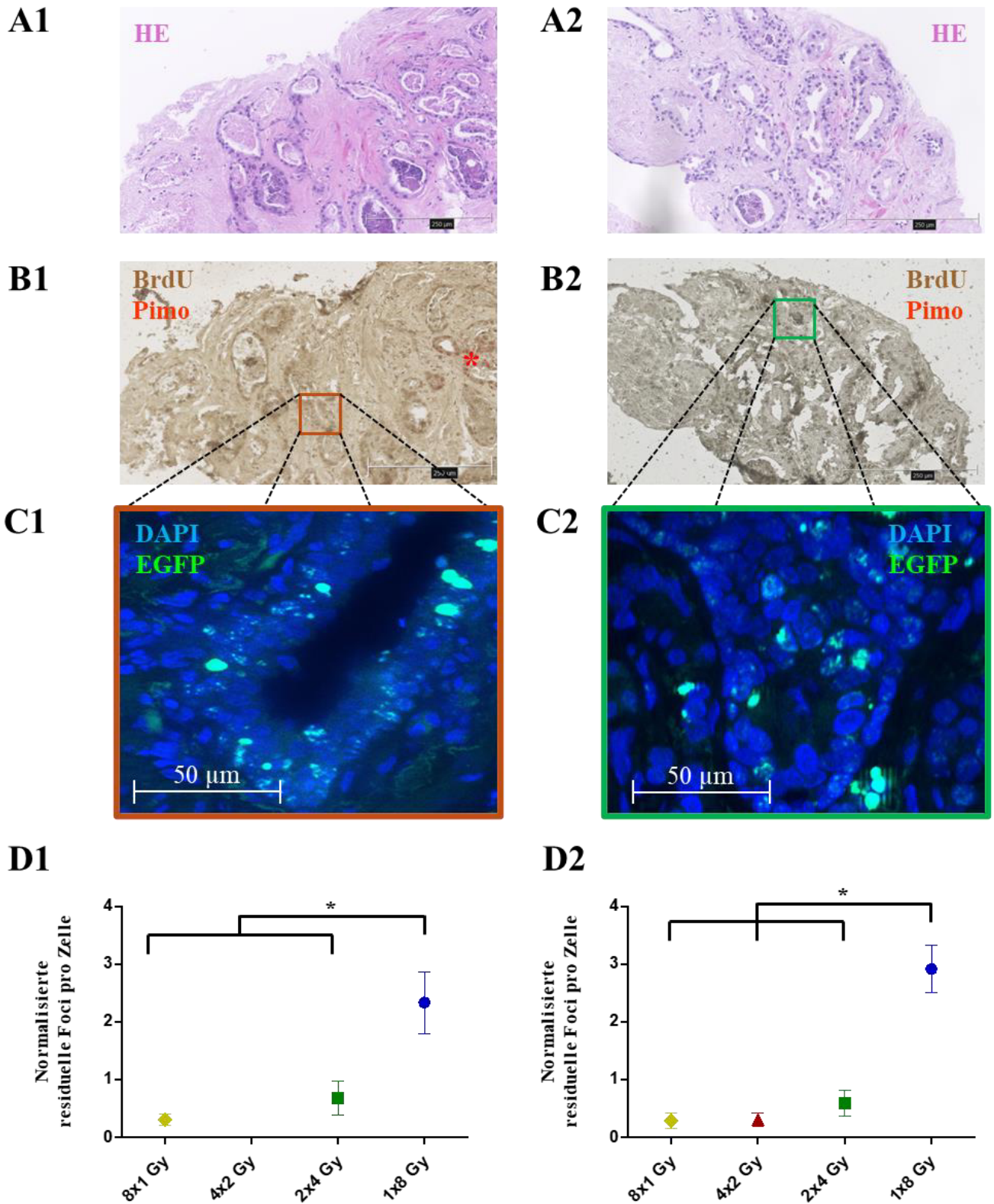


Abbildung 7: Ex vivo Ergebnisse für Pat. 7 und Pat. 9

A1 bis D1 zeigen Bilder und Graphen für Patient 7, A2 bis D2 zeigen Daten für Patient 9.

A) Beispielbilder für HE-gefärbte Schnitte aus den PC-positiven Bereichen nach pathologischer Begutachtung.

B) Die anschließende IHC-Färbung mit BrdU und Pimonidazol zeigt zum einen proliferierende Zellen an (BrdU positiv, braun) und kann hypoxische Zellen detektieren (Pimonidazol-positiv, rot). Die Markierung in B1 zeigt einen schwach Pimonidazol-positiven Bereich (*), der für die Auswertung nicht berücksichtigt wurde. **C)** Beispielbilder für die γ H2AX-IF-Färbung. **D)** zeigt die normalisierte Anzahl der residuellen Foci für die bestrahlten Proben. Für Patient 7 konnten im Gewebe für 4x 2 Gy keine Tumorzellen nachgewiesen werden, daher fehlt dieser Wert (D1). Fehlerbalken zeigten den Standardfehler.

Für die *ex vivo* Experimente zeigt sich grundsätzlich ein kontinuierlicher Anstieg der Anzahl der residuellen Foci/Nukleus mit verringerter Fraktionierung. Die niedrigsten Werte lagen für die sehr stark fraktionierten Bestrahlungsschemata mit 8x 1 Gy vor (Pat. 7: 0,31 Foci/Nukleus; Pat. 9: 0,29 Foci/Nukleus; Pat. 10: 0,57 Foci/Nukleus; Pat. 11: 0,23 Foci/Nukleus; Pat. 12: 0,61 Foci/Nukleus). Für die unfraktionierte Einmalbestrahlung ergaben sich die höchsten Foci-Werte mit 2,38 Foci/Nukleus für Pat. 7, 2,92 Foci/Nukleus für Pat. 9, 2,3 Foci/Nukleus für Pat. 10, 2,01 Foci/Nukleus für Pat. 11 und 4,36 Foci/Nukleus für Pat. 12.

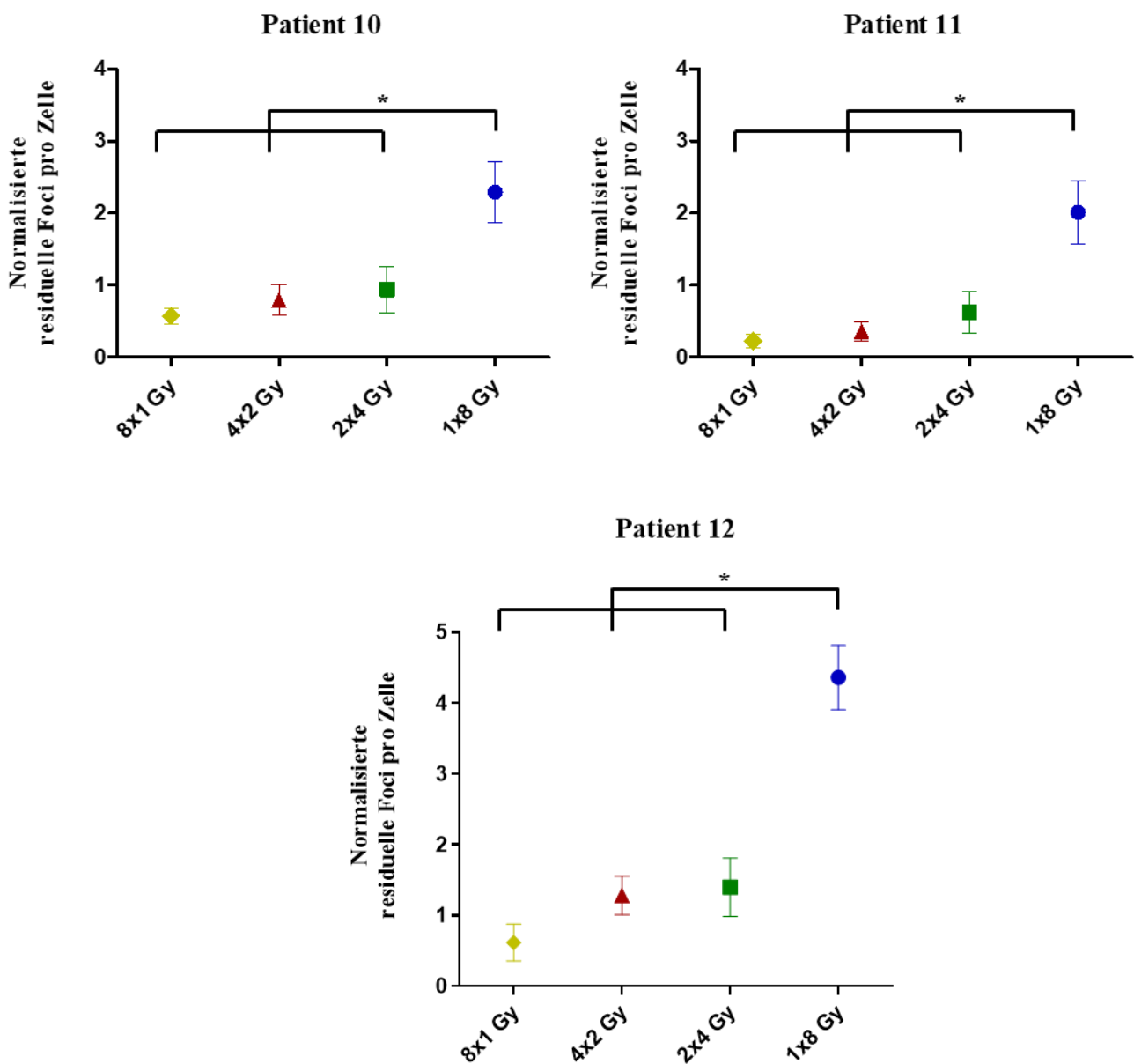


Abbildung 8: Normalisierte Foci-Anzahl für die Pat. 10, 11 und 12

Es zeigt sich eine steigende Anzahl der residuellen Foci mit sinkender Fraktionierung und höherer Einzeldosis bei Bestrahlung (vgl. auch **Abbildung 6**). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Patient	Vergleichs- werte	Differenz des Mittelwerts	Signifikanz	Korrigiertes p
7	8x1 Gy vs. 2x4 Gy	-0,372	ns	
	8x1 Gy vs. 1x8 Gy	-2,03	**	0,0021
	2x4 Gy vs. 1x8 Gy	-1,66	**	0,0032
9	8x1 Gy vs. 4x2 Gy	-0,0190	ns	
	8x1 Gy vs. 2x4 Gy	-0,298	ns	
	8x1 Gy vs. 1x8 Gy	-2,63	****	<0,0001
	4x2 Gy vs. 2x4 Gy	-0,279	ns	
	4x2 Gy vs. 1x8 Gy	-2,61	****	<0,0001
	2x4 Gy vs. 1x8 Gy	-2,33	****	<0,0001
10	8x1 Gy vs. 4x2 Gy	-0,219	ns	
	8x1 Gy vs. 2x4 Gy	-0,370	ns	
	8x1 Gy vs. 1x8 Gy	-1,72	****	<0,0001
	4x2 Gy vs. 2x4 Gy	-0,151	ns	
	4x2 Gy vs. 1x8 Gy	-1,50	***	0,0006
	2x4 Gy vs. 1x8 Gy	-1,35	**	0,0054
11	8x1 Gy vs. 4x2 Gy	-0,134	ns	
	8x1 Gy vs. 2x4 Gy	-0,399	ns	
	8x1 Gy vs. 1x8 Gy	-1,79	***	0,0001
	4x2 Gy vs. 2x4 Gy	-0,265	ns	
	4x2 Gy vs. 1x8 Gy	-1,65	***	0,0002
	2x4 Gy vs. 1x8 Gy	-1,39	**	0,0020
12	8x1 Gy vs. 4x2 Gy	-0,664	ns	
	8x1 Gy vs. 2x4 Gy	-0,780	ns	
	8x1 Gy vs. 1x8 Gy	-3,74	****	<0,0001
	4x2 Gy vs. 2x4 Gy	-0,116	ns	
	4x2 Gy vs. 1x8 Gy	-3,08	****	<0,0001
	2x4 Gy vs. 1x8 Gy	-2,96	****	<0,0001

Tabelle 12: Ergebnisse der Signifikanzanalyse für die Bestrahlung *ex vivo*

Durchgeführt mittels ANOVA-Tests mit Bonferroni-Korrektur. Signifikante Abweichungen zwischen 1x 8 Gy gegenüber den anderen Fraktionierungen für alle Patienten.

Für alle fünf Patienten zeigt sich ein signifikanter Unterschied für die Werte nach 1x 8 Gy Bestrahlung gegenüber allen anderen Testbedingungen (siehe **Tabelle 12**). Für alle anderen Versuchsarme zeigt sich jeweils der Unterschied auf keinem signifikanten Niveau.

3.5 Lineare Regression der Focianzahl *ex vivo*

Die Datenpunkte wurden an eine lineare Regression angepasst und analysiert (**Abbildung 9**).

Die lineare Regression für die Werte der residuellen γ H2AX-Werte zeigt unterschiedlich starke Steigungen der Foci-Zahlen nach geringerer Fraktionierung. Die Steigungen bewegen sich zwischen 0,24 (Patient 10) bis maximal 0,52 (Patient 12). Die Anpassungsgüte der linearen Regression ist für alle Patienten hoch (**Tabelle 13**). Ein Vergleich der Steigungen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Patienten ($p = 0,121$ bzw. $p = 0,086$ für die vier vollständigen Datensätze).

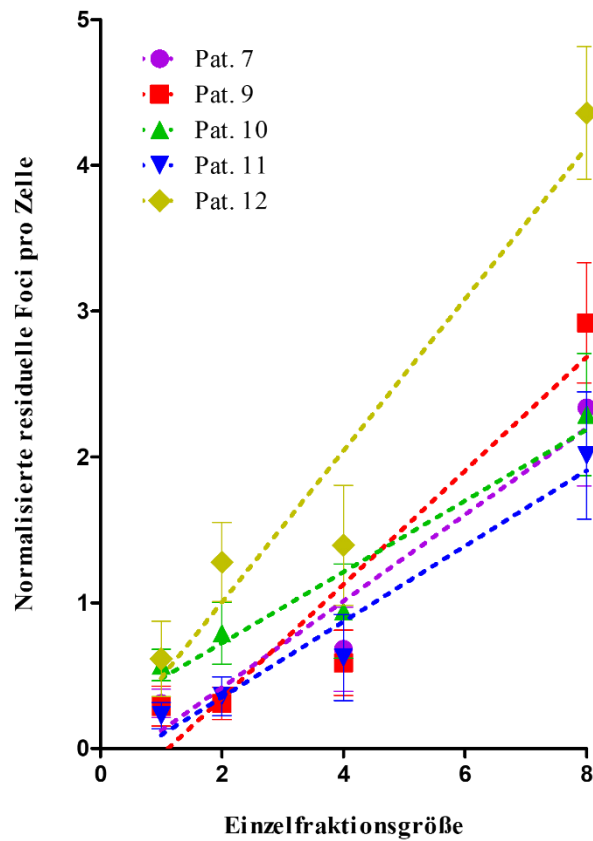


Abbildung 9: Lineare Regression der residuellen Foci *ex vivo*

Für die lineare Regression zeigt sich für Pat. 12 der steilste Anstieg der Focianzahl mit geringerer Fraktionierung, gefolgt von Pat. 9 und 7. Pat 10 und 11 weisen eine annähernd gleiche Steigung auf. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Patient	Lineare Regression (Steigung)	95%-Konfidenzintervall	r ²	Sign. Abweichung von einer Nulllinie?
7	0,30	-0,74 – 1,33	0,93	Nein (p = 0,17)
9	0,39	0,01 – 0,77	0,90	Ja (p = 0,05)
10	0,24	0,07 – 0,42	0,95	Ja (p = 0,03)
11	0,26	0,09 – 0,43	0,96	Ja (p = 0,02)
12	0,52	0,09 – 0,95	0,93	Ja (p = 0,03)

Tabelle 13: Lineare Regression *ex vivo*

Für die Patienten 9 bis 12 zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Regression gegenüber einer Nulllinie. Für Patient 7 wird das Signifikanzlevel nicht erreicht, hier liegen allerdings auch nur drei Werte vor aufgrund des fehlenden Datenpunkts für die Bestrahlung mit 4x 2 Gy.

Eine Korrelation der Steigungen der linearen Regression der residuellen γ H2AX-Foci als Indikator der Fraktionierungsempfindlichkeit mit den vorliegenden klinischen Daten konnte für den präoperativ bestimmten PSA-Wert sowie das Patientenalter durchgeführt werden (siehe **Abbildung 10**). Für diese Parameter zeigte sich keine Korrelation (PSA: $p=0,95$; $r^2=0,01$, Alter: $p=0,67$; $r^2=0,07$).

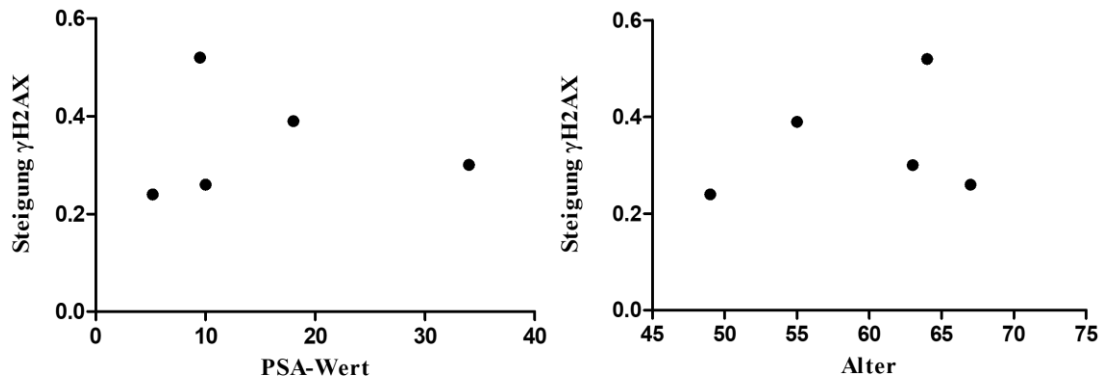


Abbildung 10: Steigung der γ H2AX-Foci gegenüber klinischen Daten

Es zeigt sich keine Korrelation der γ H2AX-Steigung gegenüber PSA-Wert und Alter.

4 Diskussion

Die HFX stellt für die Therapie des PC eine Behandlungsoption mit immer größer werdender Bedeutung dar, wenngleich aufgrund intertumoraler Variabilität nicht alle Patienten von der HFX profitieren würden [31, 32]. Unter der Grundhypothese, dass der γ H2AX-Assay geeignet ist, um die individuelle Fraktionierungsempfindlichkeit zu bestimmen, war das Ziel des Projekts die Evaluation des γ H2AX-Assays als möglicher prätherapeutischer Marker der tumorspezifischen Fraktionierungsempfindlichkeit. Solch eine Evaluation dieses Assays wurde bislang noch nicht durchgeführt, hier stellt diese Arbeit ein Novum dar. Im Rahmen der Experimente konnte mit dieser Methode ein signifikanter Unterschied der Anzahl der residuellen Foci zwischen sehr großen Abweichungen der Fraktionierung für das PC *in vitro* und *ex vivo* gezeigt werden. Allerdings konnte zwischen moderaten und geringen Unterschieden der Fraktionierung sowie zwischen verschiedenen Patienten kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese insgesamt nur in geringem Maße.

Als Vorläuferexperimente zur Festlegung des Studiendesigns wurde der Assay zunächst *in vitro* evaluiert. Neben den drei verwendeten PC-Zelllinien Du145, PC3 und LNCaP wurde die Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie FaDu in die Experimente eingeschlossen. Als Gesamtdosis der Bestrahlung wurde 8 Gy festgelegt, eine Dosis, die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe genutzt wurde [41, 48, 49, 68]. Diese Dosis wurde auf eine, zwei, vier oder acht Einzeldosen verteilt und dadurch ein breites Spektrum zwischen extremer Hypofraktionierung bis hin zur Hyperfraktionierung abgebildet. Alle Experimente *in vitro* wurden bei Subkonfluenz der Zellkultur begonnen, um Effekte des Zellzyklus auf die γ H2AX-Expression zu minimieren [43, 69]. Die *Proliferation Assays* hatten hier für die Zelllinien FaDu, Du145 und PC3 ein Zeitraum von 96 h und für LNCaP von 168 h gezeigt (vgl. **Abbildung 4, Anhang Abbildung 11**). DSB, die nach 24 Stunden noch bestehen gelten als residuell und potenziell letal [35, 40], daher wurde dieser Zeitpunkt nach der letzten Bestrahlung als Abstopp-Punkt gewählt.

Aufgrund des Experimentdesigns mit unterschiedlich häufigen Bestrahlungen ergeben sich Unterschiede entweder in der Gesamtdauer des Experiments oder dem Zeitraum zwischen der letzten Bestrahlung und dem Abstoppen. Für den Sonderfall der Einmalbestrahlung mit 8 Gy wurde dieser Versuchsarm gemeinsam mit dem Kontrollarm gedoppelt um einen Vergleich zwischen einem Abstoppen nach 24 h gegenüber derselben Gesamtversuchsdauer, aber damit einem Abstoppen nach 96 h zu haben (vgl. **Abbildung 5**). Für alle Zelllinien liegt zwischen den unbestrahlten Kontrollen kein Unterschied vor, entsprechend konstanter Hintergrund-Foci, die zeit- und strahlenunabhängig vorliegen [43]. Diese Hintergrund-Foci wurden ebenfalls in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beobachtet [48, 49, 68] und zeigen große Unterschiede zwischen Tumoren derselben Entität [67, 70]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die etablierte Normalisierung mit Berücksichtigung der individuellen Hintergrund-Foci jeder Zelllinie bzw. jedes Tumors durchgeführt [42]. Für Du145 und LNCaP zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Focizahlen nach Bestrahlung mit 1x 8 Gy. Mehrere Vorarbeiten haben eine starke Foci-Induktion direkt nach Bestrahlung und die anschließende Abnahme in Form eines exponentiellen Abfalls der Foci-Zahlen als Folge der Zellreparaturmechanismen gezeigt [71-74] und das anschließende Erreichen eines Plateaus einer konstanten Anzahl residueller Foci. Die Anzahl der residuellen Foci für Du145 und LNCaP, die nach 24 h und 96 h keine signifikanten Unterschiede zeigen, passen hier zum postulierten Plateau der Vorarbeiten. Für die Zelllinie PC3 zeigt sich allerdings ein Unterschied der Foci-Anzahl mit signifikant niedrigeren Werten nach 96 h. Eine mutmaßliche Erklärung hierfür könnte eine außergewöhnlich lang dauernde Reparaturzeit der Zelllinie über 24 h hinaus sein. In den Ergebnissen des *Proliferation Assays* zeigte PC3 die geringste Verdopplungszeit, eine mögliche Hypothese wäre also auch die höchste Repopulation der PC3-Zellen bis zum Abstoppen und damit Minderung des Mittelwerts der residuellen Foci pro Zelle. Der Grund dieser Differenz für diese Zelllinie bleibt aber ungeklärt.

Die Ausprägung des Unterschieds der residuellen Foci zwischen niedrigen und hohen Fraktionierungen kann ein Indikator dafür sein, wie viel letaler Zellschaden durch die Bestrahlung hervorgerufen wurde [75] und damit wie

fraktionierungsempfindlich der jeweilige Tumor ist. Es zeigte sich insgesamt der Trend von höheren Focizahlen bei niedrigerer Fraktionierung. Für alle vier Zellreihen lag die Anzahl der residuellen Foci für die Bestrahlung mit 1x 8 Gy am höchsten. Dem gegenüber stehen für drei von vier Zelllinien die niedrigsten Focizahlen für 8x 1 Gy, eine Ausnahme zeigte sich für LNCaP mit der niedrigsten Focizahl für 4x 2 Gy. Statistische Signifikanz erreichten diese Unterschiede nicht in allen Fällen, so sind die Unterschiede beispielsweise für FaDu von 1x 8 Gy gegenüber allen anderen Fraktionierungen signifikant, allerdings zeigte sich zwischen 4x 2 Gy, 2x 4 Gy und 8x 1 Gy keine Signifikanz (vgl. **Abbildung 6**). Letztlich kann hier also nur der Unterschied zwischen der Einzeldosis und den fraktionierten Bestrahlungen nachgewiesen werden, zwischen moderater Hypo-, Normo- und Hyperfraktionierung zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Für die PC-Zelllinien Du145 und PC3 wurden signifikante Unterschiede zwischen 1x 8 Gy und jeweils 2x 4 Gy und 8x 1 Gy nachgewiesen, für die Zelllinie LNCaP lediglich zwischen 1x 8 Gy und 4x 2 Gy. Hier gelang also der Nachweis eines Einflusses der Fraktionierung auf die Anzahl der residuellen Foci, allerdings nur für große Fraktionierungs-Unterschiede. Zwischen beispielsweise hypofraktionierter Bestrahlung mit 2x 4 Gy gegenüber hyperfraktionierter Bestrahlung mit 8x 1 Gy konnte kein signifikanter Unterschied der Focianzahl nachgewiesen werden. Im Rahmen der Auswertung zeigte sich eine hohe Variabilität der Foci-Zahlen. Für alle Versuchsbedingungen zeigten viele Zellkerne keinerlei Foci. Dem gegenüber stehen einige wenige Zellkerne mit sehr hohen Foci-Zahlen (>50 Foci, vgl. **Anhang Abbildung 12 und Abbildung 13**). Die Selektion der Zellkerne kann einen wesentlichen Einfluss auf die Focizahl haben und sollte stets verblindet und zufällig erfolgen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse *in vitro* ist ein Vergleich mit Daten derselben Arbeitsgruppe möglich. In Vorarbeiten waren FaDu-Zellen auf residuelle γ H2AX-Foci untersucht worden [41, 48]. Hierbei wurden Einzeldosen und keine fraktionierte Dosis appliziert, daher ist nur der direkte Vergleich für 1x 8 Gy möglich. Die Autoren und Autorinnen weisen hier für die Anzahl der Foci im Mittel 1,7 Foci/Gy und 1,6 Foci/Gy aus und dementsprechend Werte für die Bestrahlung mit 8 Gy um etwa 12 - 14 Foci pro Zellkern. In der hier vorliegenden Arbeit liegen

die residuellen Foci im Vergleich deutlich niedriger mit 2,3 Foci/Nukleus im Mittel für die Bestrahlung mit 8 Gy. Ein möglicher Grund können subjektive Faktoren bei der Auswertung des Assays sein, die zu großen untersucherabhängigen Unterschieden führen können [76]. Europaweite Vergleiche verschiedener Labore zum γ H2AX-Assay ergaben teilweise sehr starke Ergebnisdifferenzen zwischen verschiedenen Einrichtungen und Untersuchenden [77-79]. Für die Arbeit mit Zellen oder Patientenmaterial kommen mehrere Faktoren in Betracht, die die individuellen Unterschiede erklären können. Dazu zählen beispielsweise Differenzen bei Material und Durchführung der Färbungen, vor allem aber Faktoren rund um die Bildaufnahme und Auszählung der Zellen. Mit Belichtungszeiten und Kontrastnachbearbeitung der Bilder sowie Auszählung der Foci direkt am Mikroskop, am Computermonitor oder am Ausdruck stehen für die Generierung des visuell ausgewerteten Bildes mehrere mögliche Herangehensweisen zur Auswahl. Die gezeigten Beispielbilder der o.g. Arbeiten [49, 68] zeigen beispielsweise einen deutlich höheren EGFP-Hintergrund außerhalb der Zellkerne als die Bilder, die für diese Arbeit erzeugt und ausgewertet wurden, was zu einer stärkeren Darstellung von Foci führen und quantitative Unterschiede in der Auswertung erklären kann. Darüber hinaus unterliegt auch die Auswahl der Zellen, welche ausgewertet werden, teilweise subjektiven Kriterien, ebenso wie die Interpretation von teilweise überlappenden Foci. Auch die Identifikation und Exklusion von *Microfoci* [43] oder Zellen mit Überexpression von Foci aufgrund Seneszenz oder Apoptose [46, 80] unterliegen untersucherabhängigen Kriterien. Darüber hinaus ist die Verblindung der Auswertung wichtig zum Ausschluss eines Untersucher-Bias [45]. Nichtsdestotrotz kann der γ H2AX-Assay auch bei verschiedenen Untersuchern und Untersucherinnen mit verschiedener absoluter Foci-Anzahl die relativen Unterschiede zwischen hoher und niedriger Foci-Induktion unterscheiden [77]. Ein Vergleich der absoluten Anzahl zwischen mehreren Untersuchenden oder Arbeitsgruppen sollte aber aufgrund der o.g. Faktoren differenziert betrachtet werden. So zeigen Marinescu et al. [81] nach γ H2AX-Assay und Auswertung nach Vorbild von Menegakis et al. [48] für 18 Prostata-Tumoren nach Einmalbestrahlung mit 4 Gy ein Median von 3,12 Foci/Nukleus. Für die Zelllinien Du145 und LNCaP werden von van Oorschot et

al. [82] 2,9 Foci bzw. 2,7 Foci/Nukleus nach Bestrahlung mit 2 Gy angegeben und damit Werte einer vergleichsweise konservativeren Auswertung.

Zudem fällt für die *in vitro* Ergebnisse für die Zelllinien Du145 und PC3 eine geringere Anzahl an Foci für die Bestrahlung mit 2x 4 Gy gegenüber der stärker fraktionierten Bestrahlung mit 4x 2 Gy auf. Wenngleich hier kein signifikanter Unterschied besteht, ist dies ein Abweichen vom sonst beobachteten Muster mit steigender Foci-Zahl bei höherer Einzeldosis. Ein mutmaßlicher Grund hierfür könnte an der Versuchskonzeption liegen mit einem Einfluss der unterschiedlichen Dauer zwischen den Bestrahlungen. Während für 4x 2 Gy alle 24 h mit 2 Gy bestrahlt wurde, lagen bei 2x 4 Gy zwischen den beiden Bestrahlung 72 Stunden. Wie beim Vergleich der unterschiedlichen Abstoppszeiten bei 8-Gy-Einzelbestrahlung könnte dies ein Hinweis für einen Einfluss des Zeitfaktors auf die Foci-Zahlen sein. Bei fehlender Signifikanz der Unterschiede der Focianzahl zwischen 2x 4 Gy und 4x 2 Gy fehlt dieser Beobachtung allerdings die statistische Relevanz und bleibt daher von geringer Bedeutung.

Die Kopf-Hals-Zelllinie FaDu wird als moderat radiosensitiv beschrieben [66, 83]. In den Vorarbeiten von Menegakis et al. wird ein Vergleich der Foci-Anzahl nach Einzeldosis zwischen PC-Zellen aus Patientenmaterial und FaDu-Xenograft-Zellen angestellt [48]. Dabei zeigen sich von den drei untersuchten Prostatatumoren für zwei eine geringere und für einen eine höhere Strahlenempfindlichkeit. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein ähnliches Bild. Für die Einzelbestrahlung mit 8 Gy lagen die residuellen Foci pro Zelle für FaDu bei 2,33 Foci/Nukleus, für die Prostatazelllinien Du145 bei 1,93 Foci/Nukleus, PC3 bei 3,83 Foci/Nukleus und LNCaP bei 1,65 Foci/Nukleus. Damit liegen *in vitro* zwei der drei Zelllinien unter der Strahlenempfindlichkeit der FaDu-Zellen, eine darüber. Damit zeigt sich ein kohärentes Bild gegenüber den Vorarbeiten, wenngleich sich die absolute Foci-Anzahl unterscheidet.

Nach Durchführung der *in vitro* Experimente erfolgte die Bestimmung des Versuchsdesigns *ex vivo*. Aufgrund des möglichen Einflusses eines unterschiedlichen Zeitraumes zwischen den Bestrahlungen bzw. der letzten

Bestrahlung und dem Abstoppen wurde dieser konstant festgelegt. Bei unterschiedlicher Anzahl der Fraktionen ergibt sich daraus eine unterschiedlich lange Experimentdauer. Um diese Differenz so gering wie möglich zu halten, wurden die Zeiträume ebenfalls möglichst gering gewählt. In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass keine signifikante Dynamik zwischen den Foci-Zahlen 12 h und 24 h nach Bestrahlung besteht [48]. Die non-lineare Regression der Daten suggeriert ein Erreichen des Plateaus mit konstant bleibenden residuellen Foci nach sechs Stunden [48]. Daher wurde dieser Zeitraum zwischen den Bestrahlungen sowie dem Abstoppen gewählt. Aus dem Studiendesign mit einer Fraktionsanzahl von einer, zwei, vier und acht ergeben sich daraus unterschiedliche Gesamtdauern zwischen sechs und 48 Stunden. Die variable Gesamtdauer der verschiedenen Versuchsarme stellt einen möglichen Störfaktor für die Experimente dar.

Für alle fünf *ex vivo* untersuchten Tumore wurde eine unterschiedliche Anzahl an residuellen Foci nach Bestrahlung in verschiedenen Fraktionierungen beobachtet. Dabei zeigte sich für alle dasselbe Muster: eine höhere Anzahl residueller Foci bei geringerer Fraktionierung mit einem Anstieg der Mittelwerte von 8x 1 Gy zu 4x 2 Gy zu 2x 4 Gy und 1x 8 Gy (vgl. **Abbildung 7 und Abbildung 8**). Die Ergebnisse zeigten *ex vivo* einen signifikanten Unterschied einer extrem hypofraktionierten Bestrahlung mit 1x 8 Gy gegenüber moderat hypofraktionierter bzw. sogar hyperfraktionierter Bestrahlung. Zwischen den Fraktionierungen mit 2x 4 Gy, 4x 2 Gy und 8x 1 Gy zeigten sich für alle Patienten tendenziell eine jeweils höhere Anzahl der residuellen Foci bei höherer Einzeldosis. Die Unterschiede erreichten aber nicht das statistische Signifikanzniveau. Für den Nachweis geringerer Unterschiede in der Fraktionierung konnte für den Assay auf Basis der Daten dieser Arbeit keine ausreichende Sensitivität nachgewiesen werden.

Ein möglicher Grund hierfür kann eine zu niedrige Anzahl der ausgezählten Zellen für einen statistischen Nachweis der eher gering ausgeprägten Unterschiede bei höherer Fraktionierung sein. Wie auch *in vitro* zeigten sich für alle Auswertungen sehr hohe Unterschiede zwischen den Focizahlen der Zellen. Aufgrund der hohen Variabilität der Foci-Werte zwischen einzelnen Zellen, die

dieselbe Bestrahlung erfahren haben, ergibt sich erst mit hoher Anzahl ausgezählter Zellen ein zuverlässiger Datenpunkt.

Die Größe des Einflusses der unterschiedlichen Gesamtversuchsdauer *ex vivo* kann aus diesen Experimenten nicht geklärt werden. Neben der o.g. Vorarbeit von Menegakis et al. [48] konnte für *ex vivo* PC-Gewebe auch eine Reparaturzeit von acht Stunden gezeigt werden [84]. Falls nach sechs Stunden die Reparatur *ex vivo* noch nicht abgeschlossen ist, könnten falsch-hohe Focizahlen für 1x 8 Gy eine Folge sein. Auch in der klinischen Strahlentherapie des PC gilt die Therapiedauer als Faktor für den Therapieerfolg [85, 86]. Ursächlich hierfür wird die Repopulation durch Krebs-Stammzellen während des Therapiezeitraums gesehen [87, 88].

Für die *ex vivo* Ergebnisse zeigten die mit 2x 4 Gy bestrahlten Zellen bei allen Patienten eine höhere Anzahl normalisierter Foci als die mit 4x 2 Gy oder 8x 1 Gy bestrahlten Zellen. Auch hier besteht für diese Unterschiede keine Signifikanz, im direkten Vergleich mit den *in vitro* Ergebnissen könnte dies als leichter Hinweis dafür gesehen werden, dass die erniedrigte Anzahl *in vitro* tatsächlich durch das Studiendesign mit langer Pause zwischen den beiden Bestrahlungen verursacht ist.

Für die *ex vivo* Daten kann ebenfalls der Vergleich zu Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezogen werden [48, 49, 68]. Als direkter Vergleich sind die Foci-Zahlen zwischen 1x 8 Gy in dieser Arbeit mit 1x 8 Gy in der Arbeit von De-Colle et al. möglich [68]. Für die *ex vivo* Bestrahlung wurden hierbei im Wesentlichen Ergebnisse zwischen 0,8 und 2,2 Foci/Gy erhoben. Entsprechend wären für 8 Gy Foci-Werte zwischen ca. 6,5 und 17,5 zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für die 8-Gy-Einmaldosis zwischen 2,0 und 4,4 Foci/Zellkern. Damit weicht die Foci-Anzahl weniger stark ab als *in vitro*, zeigt aber dennoch eine deutlich niedrigere Anzahl. Wie bei der Betrachtung der *in vitro* Ergebnisse diskutiert sind Unterschiede in der Durchführung von Färbung, Bildaufnahme und Auswertung mögliche Gründe hierfür. Eine Möglichkeit dieser Variabilität und Subjektivität der Foci-Zahlen zu begegnen ist die Automatisierung des Färbe- und Auswertungsprozesses. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Programme und Algorithmen zur Bestimmung der Foci-Zahlen entwickelt [76, 89-92]. Diese

Entwicklungen sind eine notwendige Grundlage für einen möglichen breiten klinischen Einsatz, da eine manuelle Auszählung neben den untersucherabhängigen Faktoren der Auswertung auch äußerst zeit- und arbeitsaufwändig ist [92].

Für die Übertragung des Assays in einen klinischen, prätherapeutischen Alltag wäre die zuverlässige Darstellung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit notwendig. Die Modellierung der Daten entlang einer linearen Regression zeigt für die vier Patienten, für die ein vollständiger Datensatz vorliegt, zwar eine signifikante Abweichung von einer Nulllinie, allerdings keine signifikanten Unterschiede der Patienten untereinander (vgl. **Abbildung 9**). Beim kleinen Kollektiv von vier vollständigen Datensätzen ist zwar eine zufällig geringe Verteilungsbreite der Fraktionierungseigenschaften denkbar, allerdings kann dies auch als Hinweis einer mangelnden Fähigkeit, die individuelle Fraktionierungsempfindlichkeit ausreichend darzustellen gewertet werden. Die geringe Stichprobengröße aus lediglich fünf Patienten, wobei ein Datensatz durch das Fehlen eines Datenpunkts unvollständig ist, schränkt hier die Aussagekraft dieser Arbeit ein. Insgesamt wurde Gewebe nach Prostatektomie von zwölf Patienten aufgearbeitet, bestrahlt und von einem erfahrenen Pathologen bewertet. In fünf hiervon war kein Tumor nachweisbar, in zwei weiteren nur für Tumorzellen im Gewebe von max. zwei der fünf Versuchsbedingungen. Durch diese Limitierung aufgrund der Materialgewinnung wird hier auch eine Bedingung für die zuverlässige Etablierung des Assays für den klinischen Alltag ersichtlich. Das Patientengewebe, prätherapeutisch in Form von Biopsien, muss zuverlässig die tumorhaltigen Läsionen widerspiegeln.

Für die Angabe der Fraktionierungsempfindlichkeit hat sich radiobiologisch der α/β -Wert durchgesetzt [10, 20]. Die γ H2AX-Foci stellen einen Surrogatparameter für den zellulären Bestrahlungsschaden dar [35, 47], wenngleich Vorarbeiten auch den Zusammenhang zwischen klonogenem Zellüberleben und γ H2AX-Foci zeigen konnten [41, 65, 73, 82]. Im Falle einer erfolgreichen individuellen Quantifizierung der Fraktionierungsempfindlichkeit durch den γ H2AX-Assay wäre auch eine Übersetzung in den individuellen α/β -Werts wünschenswert.

Marinescu et al. konnten mit 18 PC-Proben einen signifikant höheren PSA-Wert für eine Gruppe der radiosensitiven Prostatakarzinome mit hoher Anzahl an residuellen γ H2AX-Foci nachweisen, kein Unterschied wurde für das Patientenalter gezeigt [81]. Gegenüber den ermittelten Steigungen der Regressionen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation für klinische Parameter wie den präoperativen PSA-Wert oder das Patientenalter (vgl. **Abbildung 10**).

In der Gesamtschau unterstützt die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass der γ H2AX-Assay für eine mögliche prätherapeutische Bestimmung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit für das Prostatakarzinom geeignet ist, nur gering. Zwar konnten signifikante Unterschiede bei starken Fraktionierungsunterschieden gezeigt werden, eine ausreichende Sensitivität der Methode, um geringere Fraktionierungsunterschiede und individuelle Fraktionierungsempfindlichkeitsunterschiede aufzuzeigen konnte nicht nachgewiesen werden. Mögliche weiterführende Arbeiten sollten eine höhere Anzahl ausgezählter Zellkerne, möglichst in standardisierter und automatisierter Technik beinhalten, sowie ein größeres Patientenkollektiv und perspektivisch die *ex vivo* Arbeit an Prostata-Biopsiematerial.

5 Zusammenfassung

Prostatakarzinome gelten als fraktionierungsempfindliche Tumoren, das heißt die Wirkung der Strahlentherapie gegen den Tumor steigt im Durchschnitt bei Hypofraktionierung, also einer höheren Einzeldosis als bei der konventionellen Fraktionierung. Mehrere Studien konnten in den letzten Jahren Vorteile der Hypofraktionierung zeigen, sodass diese Behandlungsform unter bestimmten Rahmenbedingungen Einzug in nationale und internationale Leitlinien gefunden hat. Allerdings birgt die Hypofraktionierung auch ein erhöhtes Risiko einer dosislimitierenden Toxizität des umliegenden Normalgewebes. Vorarbeiten suggerieren eine deutliche Variabilität der Fraktionierungsempfindlichkeit für das Prostatakarzinom, sodass nicht alle Patienten von einer Hypofraktionierung profitieren würden.

Der *ex vivo* γ H2AX-Assay ist ein etabliertes Verfahren zur Evaluation der zellulären Radiosensitivität. Die prinzipielle Machbarkeit einer Etablierung des Assays auch für die Bestimmung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit ist Gegenstand dieser Arbeit.

Dafür wurden Tumorzellen mit derselben Gesamtdosis von 8 Gy in unterschiedlicher Fraktionierung von 1, 2, 4 oder 8 Fraktionen behandelt. Der γ H2AX-Assay *in vitro* an den drei Prostatazelllinien Du145, PC3 und LNCaP sowie der Kopf-Hals-Tumorzelllinie FaDu und *ex vivo* am Prostatakarzinomen von fünf Patienten angewendet und ausgewertet.

Hierbei zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* eine erhöhte Anzahl residueller Foci bei geringerer Fraktionierung mit der maximalen Foci-Zahl für Bestrahlung in Einzeldosis. Die Ergebnisse erreichten in der Regel nur für den Vergleich zwischen sehr deutlichen Fraktionierungsunterschieden statistische Signifikanz. Für die vorliegenden Patienten konnte keine signifikante individuelle Fraktionierungsempfindlichkeit bestimmt werden. Dieses Ergebnis sind in den Kontext der geringen Stichprobengröße zu setzen. Des Weiteren wurde an den Ergebnissen die Untersucherabhängigkeit des Assays für absolute Foci-Zahlen deutlich.

Insgesamt konnte eine ausreichende Sensitivität der Methode, um statistisch signifikant Unterschiede der Fraktionierungsempfindlichkeit aufzuzeigen nicht nachgewiesen werden. Damit unterstützt die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass der γ H2AX-Assay für eine mögliche prätherapeutische Bestimmung der individuellen Fraktionierungsempfindlichkeit für das Prostatakarzinom geeignet ist, nur geringgradig.

6 Anhang

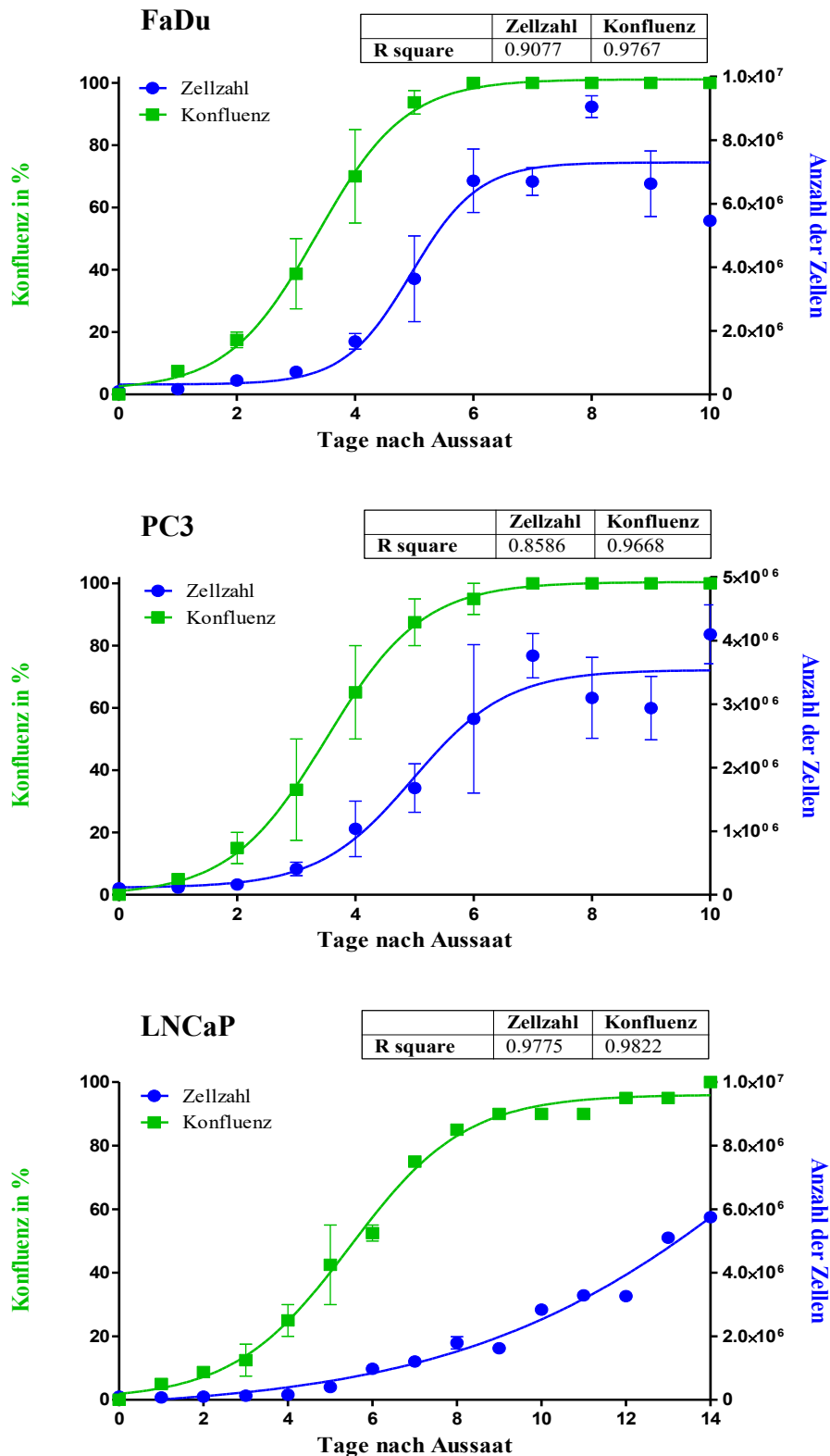


Abbildung 11: Ergebnisse des *Proliferation Assays* für FaDu, PC3 und LNCaP

Die absolute Zellzahl (rechte Y-Achse, blau) zeigt ebenso wie die Konfluenz (linke Y-Achse, grün) ein sigmoidales Wachstum. *R square* gibt den *Fit* für die sigmoidale Wachstumskurve an.

Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

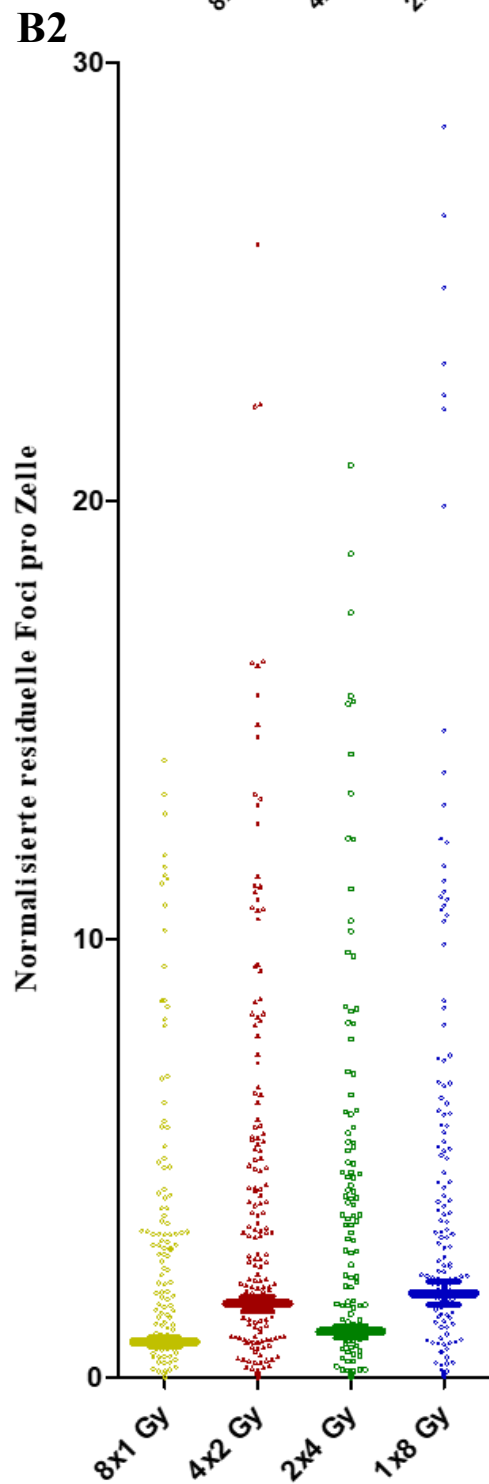
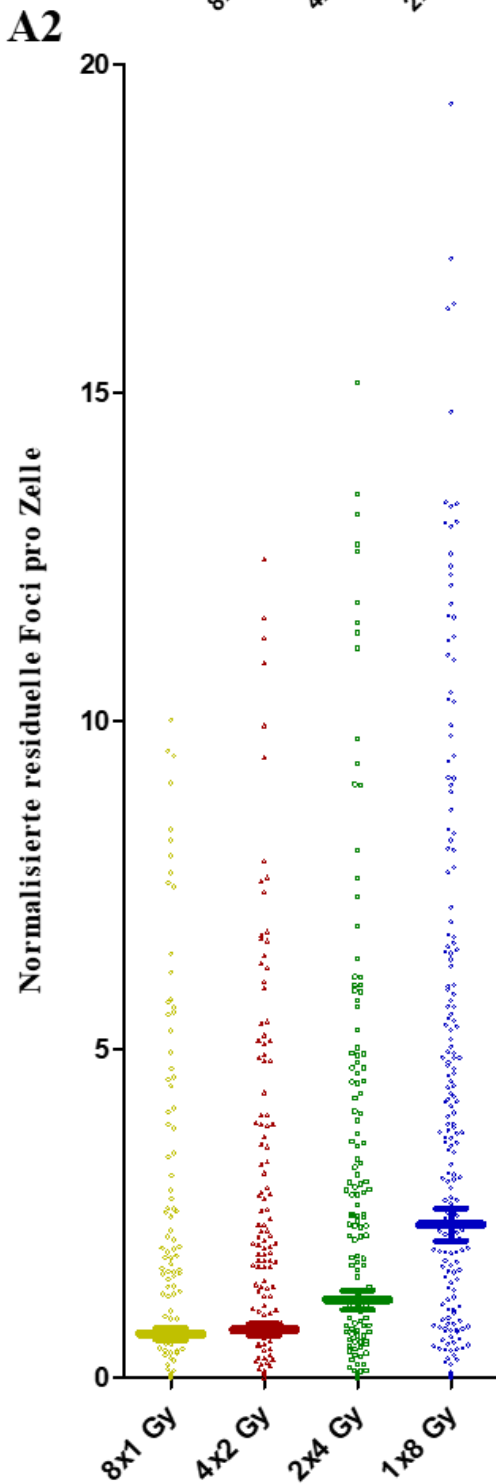
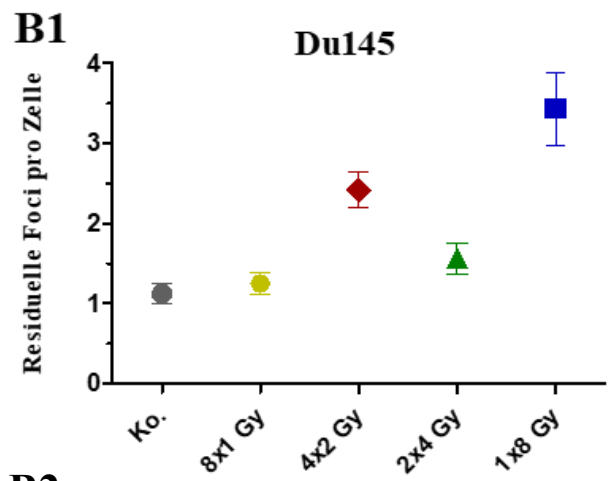
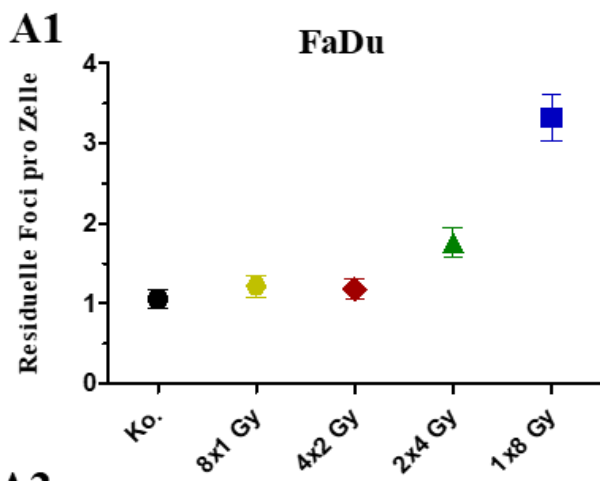


Abbildung 12: Absolute Foci-Zahlen vor Normalisierung sowie Darstellung der Einzelwerte zur Veranschaulichung der Streubreite der normalisierten Anzahl residueller Foci für FaDu und Du145

Folgende Werte sind aufgrund der Anpassung der Y-Achse zur übersichtlicheren Darstellung nicht abgebildet: Für FaDu: 2x 4 Gy: 35,1; 1x 8 Gy: 28,02; 29,69; 45,99; 47,77; 53,06. Für Du145 1x 8 Gy: 30,57; 38,29; 40,12; 41,93; 51,3.

Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

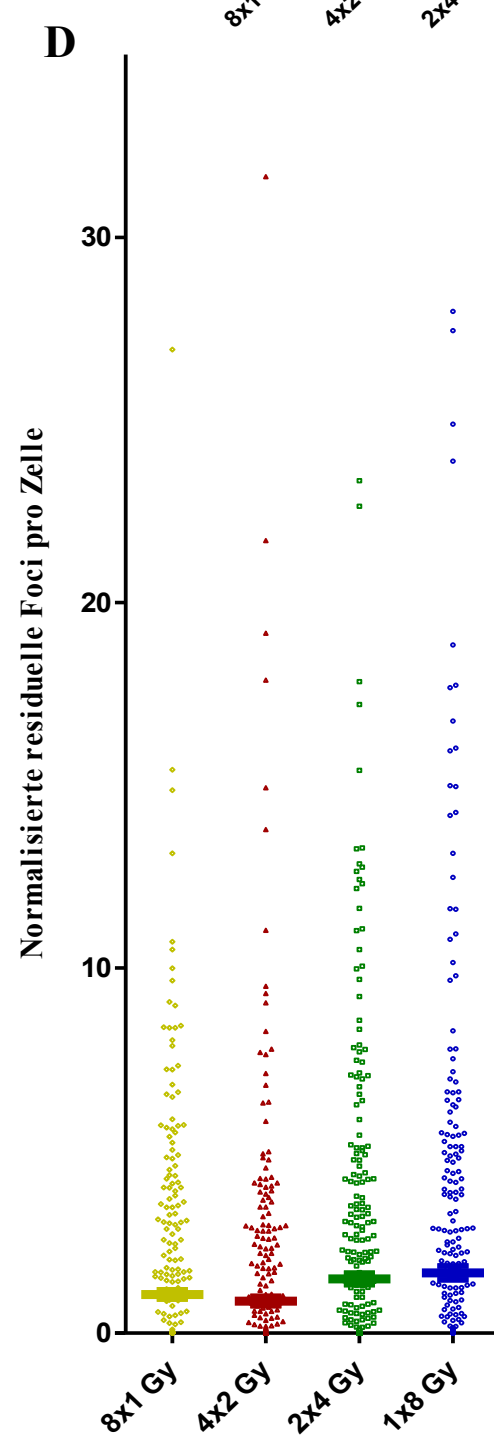
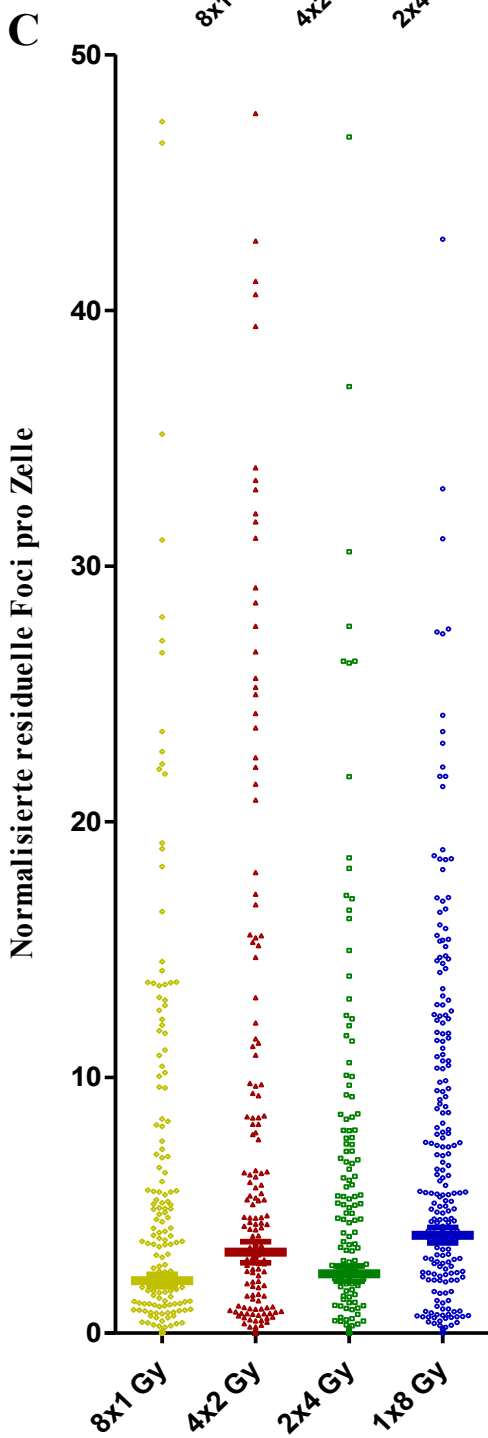
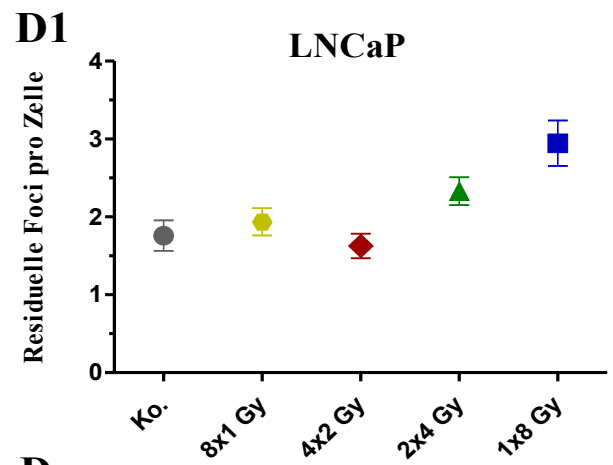
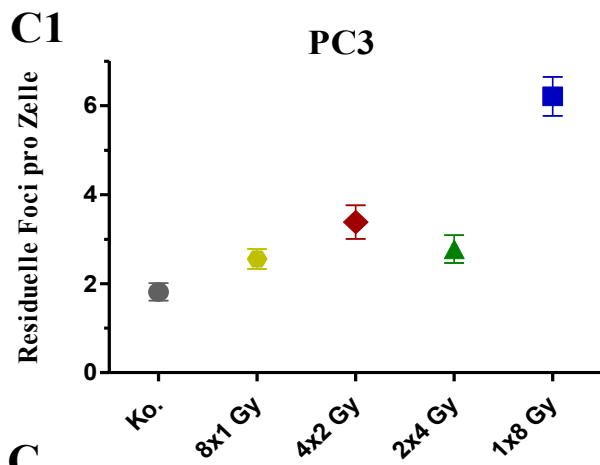


Abbildung 13: Absolute Foci-Zahlen vor Normalisierung sowie Darstellung der Einzelwerte zur Veranschaulichung der Streubreite der normalisierten Anzahl residueller Foci für PC3 und LNCaP

Folgende Werte sind aufgrund der Anpassung der Y-Achse zur übersichtlicheren Darstellung nicht abgebildet: Für PC3: 2x 4 Gy: 35,1; 1x 8 Gy: 28,02; 29,69; 45,99; 47,77; 53,06.

Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

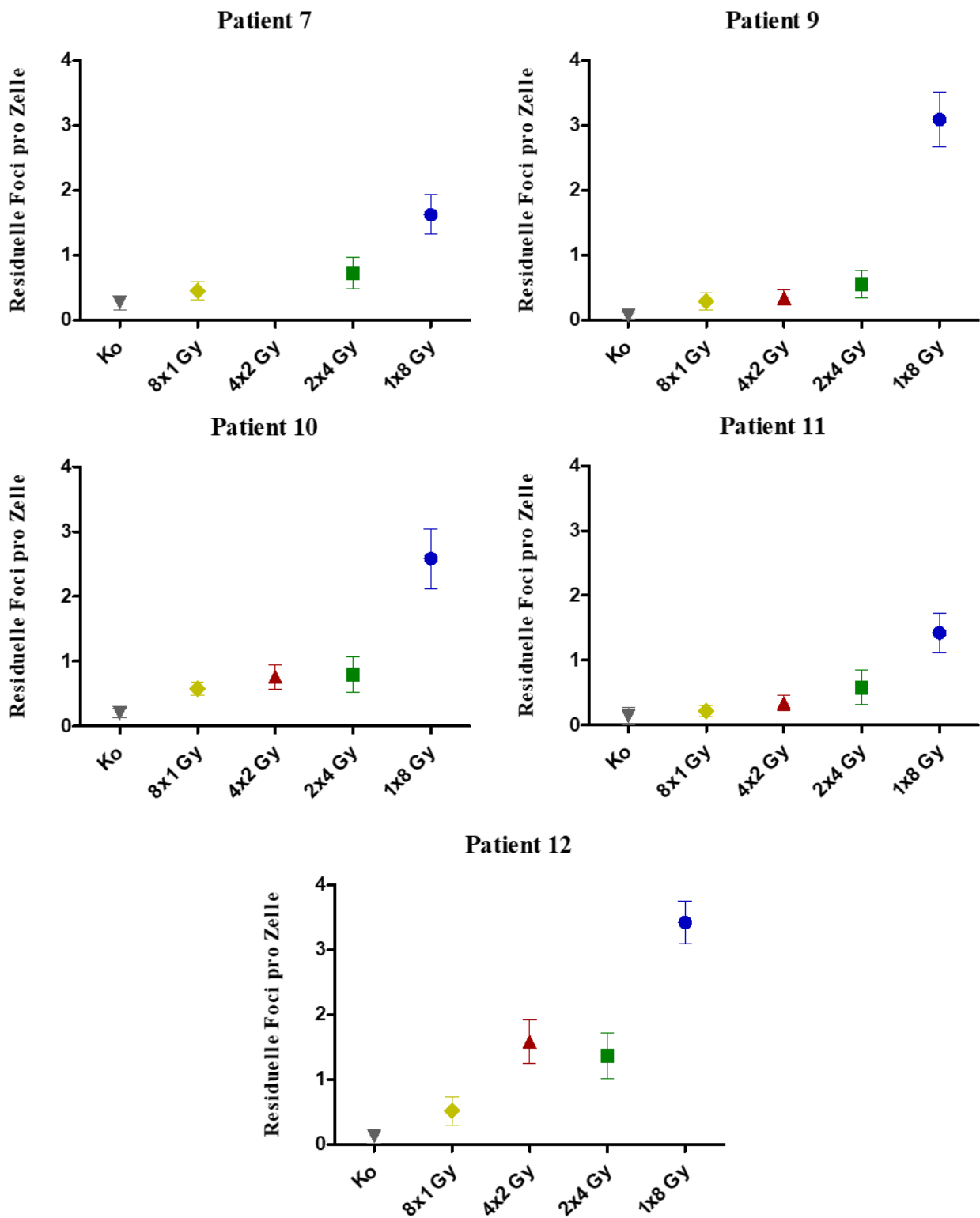


Abbildung 14: Absolute Focizahlen *ex vivo*

Auch für diese Patienten zeigt sich eine steigende Anzahl der residuellen Foci mit sinkender Fraktionierung und höherer Einzeldosis bei Bestrahlung. Die einzige Ausnahme hierfür stellt Pat .12 dar, hier lag eine leicht geringe Anzahl an Foci für 2x4 Gy vor. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

7 Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. CA Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
2. *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. 14. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin, 2023. p. 16-22, 98-101.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AMWF), *S3-Leitlinie Prostatakarzinom*. (Langversion 6.2, 2021).
4. Thomas Gasser, D.E., Christian Thomas, *Basiswissen Urologie*. 2023, Springer Berlin, Heidelberg. p. 83-91.
5. Gleason, D.F., *Histologic grading of prostate cancer: a perspective*. Hum Pathol, 1992. **23**(3): p. 273-9.
6. J. Köllermann, T.S., F.K.-H.Chun, M. Graefen, H. Huland, *Onkologische Kennzeichen des Prostatakarzinoms*, in *Uroonkologie*. 2014, Herbert Rübben: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. p. 532-544.
7. Baretton, G.B., Sommer, U., *Prostatakarzinom: Histopathologie*, in *Die Urologie*, M.S. Michel, W. Thüroff, J., Janetschek, G., Wirth, M.P., Editor. 2023, Springer, Berlin, Heidelberg. p. 1547–1569.
8. M. Wirth, M.F., *Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms*, in *Uroonkologie*. 2014, Herbert Rübben: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. p. 570-584.
9. Fröhner, M., et al., *Prostatakarzinom: kurative Therapie*, in *Die Urologie: in 3 Bänden*, M.S. Michel, et al., Editors. 2023, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1571-1592.
10. Hocht, S., et al., *Hypofractionated radiotherapy for localized prostate cancer*. Strahlenther Onkol, 2017. **193**(1): p. 1-12.
11. Hamdy, F.C., et al., *10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(15): p. 1415-1424.
12. Donovan, J.L., et al., *Patient-Reported Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(15): p. 1425-1437.
13. Dörr, W., *Radiobiology of tissue reactions*. Ann ICRP, 2015. **44**(1 Suppl): p. 58-68.
14. Joiner, S.B.a.M., *The linear-quadratic approach in clinical practice*, in *Basic Clinical Radiobiology*, A.v.d.K. Michael Joiner, Editor. 2009, Edward Arnold. p. 120-134.
15. Bentzen, M.J.a.S., *Fractionation: the linear-quadratic approach*, in *Basic Clinical Radiobiology*, A.v.d.K. Michael Joiner, Editor. 2009, Edward Arnold. p. 102-118.
16. Kellerer, A.M. and H.H. Rossi. *THEORY OF DUAL RADIATION ACTION*. 1972.
17. McMahon, S.J., *The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges*. Phys Med Biol, 2018. **64**(1): p. 01TR01.
18. Hegemann, N.S., et al., *Hypofractionated radiotherapy for prostate cancer*. Radiat Oncol, 2014. **9**: p. 275.
19. Th. Herrmann, M.B., W. Dörr, *Therapeutische Breite der Strahlentherapie*, in *Klinische Strahlenbiologie*. 2006, Elsevier GmbH: München. p. 129-137.
20. Michael Baumann, V.G., *Modified fractionation*, in *Basic Clinical Radiobiology*, A.v.d.K. Michael Joiner, Editor. 2009, Edward Arnold. p. 135-148.
21. Abreha, S.K., *Model-based cost-effectiveness analysis of external beam radiation therapy for the treatment of localized prostate cancer: a systematic review*. Cost Eff Resour Alloc, 2019. **17**: p. 10.
22. Brenner, D.J. and E.J. Hall, *Fractionation and protraction for radiotherapy of prostate carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999. **43**(5): p. 1095-101.
23. Dasu, A. and I. Toma-Dasu, *Prostate alpha/beta revisited -- an analysis of clinical results from 14 168 patients*. Acta Oncol, 2012. **51**(8): p. 963-74.
24. Lee, W.R., et al., *Randomized Phase III Noninferiority Study Comparing Two Radiotherapy Fractionation Schedules in Patients With Low-Risk Prostate Cancer*. J Clin Oncol, 2016. **34**(20): p. 2325-32.
25. Dearnaley, D., et al., *Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial*. The Lancet Oncology, 2016. **17**(8): p. 1047-1060.

26. Incrocci, L., et al., *Hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with localised prostate cancer (HYPRO): final efficacy results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial*. *The Lancet Oncology*, 2016. **17**(8): p. 1061-1069.
27. Catton, C.N., et al., *Randomized Trial of a Hypofractionated Radiation Regimen for the Treatment of Localized Prostate Cancer*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(17): p. 1884-1890.
28. Syndikus, I., et al., *10-Year efficacy and co-morbidity outcomes of a phase III randomised trial of conventional vs. hypofractionated high dose intensity modulated radiotherapy for prostate cancer (CHHiP; CRUK/06/016)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2023. **41**(6_suppl): p. 304-304.
29. Lee, W.R., et al., *Long-Term Follow-Up Analysis of NRG Oncology RTOG 0415: A Randomized Phase III Non-Inferiority Study Comparing Two Fractionation Schedules in Patients with Favorable-Risk Prostate Cancer*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2023. **117**(2): p. S3-S4.
30. de Vries, K.C., et al., *Hypofractionated Versus Conventionally Fractionated Radiation Therapy for Patients with Intermediate- or High-Risk, Localized, Prostate Cancer: 7-Year Outcomes From the Randomized, Multicenter, Open-Label, Phase 3 HYPRO Trial*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020. **106**(1): p. 108-115.
31. Vogelius, I.R. and S.M. Bentzen, *Meta-analysis of the alpha/beta ratio for prostate cancer in the presence of an overall time factor: bad news, good news, or no news?* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013. **85**(1): p. 89-94.
32. Vogelius, I.R. and S.M. Bentzen, *Dose Response and Fractionation Sensitivity of Prostate Cancer After External Beam Radiation Therapy: A Meta-analysis of Randomized Trials*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018. **100**(4): p. 858-865.
33. Petersen, C., et al., *Recovery from sublethal damage during fractionated irradiation of human FaDu SCC*. *Radiother Oncol*, 2005. **74**(3): p. 331-6.
34. De-Colle, C., et al., *Ex vivo gammaH2AX radiation sensitivity assay in prostate cancer: Inter-patient and intra-patient heterogeneity*. *Radiother Oncol*, 2017. **124**(3): p. 386-394.
35. Olive, P.L., *Retention of gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA damage*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 18-23.
36. Rogakou, E.P., et al., *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(5): p. 905-16.
37. Brady Wouters, A.B., *Irradiation-induced damage and the DNA damage response*, in *Basic Clinical Radiobiology*, A.v.d.K. Michael Joiner, Editor. 2009, Edward Arnold. p. 11-26.
38. Sedelnikova, O.A., et al., *Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody*. *Radiat Res*, 2002. **158**(4): p. 486-92.
39. Keogh, M.C., et al., *A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery*. *Nature*, 2006. **439**(7075): p. 497-501.
40. Banáth, J.P., et al., *Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 4.
41. Hauth, F., et al., *Cell-line dependent effects of hypoxia prior to irradiation in squamous cell carcinoma lines*. *Clin Transl Radiat Oncol*, 2017. **5**: p. 12-19.
42. Menegakis, A., et al., *Residual DNA double strand breaks in perfused but not in unperfused areas determine different radiosensitivity of tumours*. *Radiother Oncol*, 2011. **100**(1): p. 137-44.
43. McManus, K.J. and M.J. Hendzel, *ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(10): p. 5013-25.
44. Goodarzi, A.A., et al., *ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin*. *Mol Cell*, 2008. **31**(2): p. 167-77.
45. Löbrich, M., et al., *gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(4): p. 662-9.
46. Rogakou, E.P., et al., *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(13): p. 9390-5.
47. Banáth, J.P. and P.L. Olive, *Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4347-50.

48. Menegakis, A., et al., *γ H2AX assay in ex vivo irradiated tumour specimens: A novel method to determine tumour radiation sensitivity in patient-derived material*. *Radiother Oncol*, 2015. **116**(3): p. 473-9.
49. Menegakis, A., et al., *Residual γ H2AX foci after ex vivo irradiation of patient samples with known tumour-type specific differences in radio-responsiveness*. *Radiother Oncol*, 2015. **116**(3): p. 480-5.
50. Elkind, M.M. and H. Sutton, *X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture*. *Nature*, 1959. **184**: p. 1293-5.
51. Tucker, S.L., et al., *Estimation of α/β for late rectal toxicity based on RTOG 94-06*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **81**(2): p. 600-5.
52. Namekawa, T., et al., *Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells*. *Cells*, 2019. **8**(1).
53. Stone, K.R., et al., *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*. *Int J Cancer*, 1978. **21**(3): p. 274-81.
54. Alimirah, F., et al., *DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(9): p. 2294-300.
55. Brodin, J., L. Skoog, and P. Ekman, *Immunohistochemistry and biochemistry in detection of androgen, progesterone, and estrogen receptors in benign and malignant human prostatic tissue*. *Prostate*, 1992. **20**(4): p. 281-95.
56. Webber, M.M., D. Bello, and S. Quader, *Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications. Part 3. Oncogenes, suppressor genes, and applications*. *Prostate*, 1997. **30**(2): p. 136-42.
57. Webber, M.M., D. Bello, and S. Quader, *Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines*. *Prostate*, 1997. **30**(1): p. 58-64.
58. Webber, M.M., D. Bello, and S. Quader, *Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications. Part I. Cell markers and immortalized nontumorigenic cell lines*. *Prostate*, 1996. **29**(6): p. 386-94.
59. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. *Invest Urol*, 1979. **17**(1): p. 16-23.
60. Tai, S., et al., *PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma*. *Prostate*, 2011. **71**(15): p. 1668-79.
61. van Bokhoven, A., et al., *Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines*. *Prostate*, 2003. **57**(3): p. 205-25.
62. Wang, M. and M.E. Stearns, *Isolation and characterization of PC-3 human prostatic tumor sublines which preferentially metastasize to select organs in S.C.I.D. mice*. *Differentiation*, 1991. **48**(2): p. 115-25.
63. Horoszewicz, J.S., et al., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. *Cancer Res*, 1983. **43**(4): p. 1809-18.
64. Rangan, S.R., *A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma*. *Cancer*, 1972. **29**(1): p. 117-21.
65. Menegakis, A., et al., *Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by gammaH2AX staining*. *Int J Radiat Biol*, 2009. **85**(11): p. 1032-41.
66. Kasten-Pisula, U., et al., *The extreme radiosensitivity of the squamous cell carcinoma SKX is due to a defect in double-strand break repair*. *Radiother Oncol*, 2009. **90**(2): p. 257-64.
67. Koch, U., et al., *Residual γ H2AX foci predict local tumour control after radiotherapy*. *Radiother Oncol*, 2013. **108**(3): p. 434-9.
68. De-Colle, C., et al., *Ex vivo γ H2AX radiation sensitivity assay in prostate cancer: Inter-patient and intra-patient heterogeneity*. *Radiother Oncol*, 2017. **124**(3): p. 386-394.
69. Kinner, A., et al., *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(17): p. 5678-94.
70. Yu, T., et al., *Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability*. *DNA Repair*, 2006. **5**(8): p. 935-946.

71. Svetlova, M.P., L.V. Solovjeva, and N.V. Tomilin, *Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks*. *Mutat Res*, 2010. **685**(1-2): p. 54-60.
72. Klokov, D., et al., *Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays*. *Radiother Oncol*, 2006. **80**(2): p. 223-9.
73. Banáth, J.P., S.H. Macphail, and P.L. Olive, *Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7144-9.
74. Wada, S., et al., *Prediction of Cellular Radiosensitivity from DNA Damage Induced by γ -Rays and Carbon Ion Irradiation in Canine Tumor Cells*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2005. **67**(11): p. 1089-1095.
75. Zahnreich, S., et al., *Biodosimetry Based on γ -H2AX Quantification and Cytogenetics after Partial- and Total-Body Irradiation during Fractionated Radiotherapy*. *Radiation Research*, 2015. **183**(4): p. 432-446.
76. Runge, R., et al., *Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®*. *International Journal of Radiation Biology*, 2012. **88**(5): p. 439-447.
77. Rothkamm, K., et al., *Laboratory Intercomparison on the γ -H2AX Foci Assay*. *Radiation Research*, 2013. **180**(2): p. 149-155, 7.
78. Moquet, J., et al., *The second gamma-H2AX assay inter-comparison exercise carried out in the framework of the European biodosimetry network (RENEB)*. *International Journal of Radiation Biology*, 2017. **93**(1): p. 58-64.
79. Barnard, S., et al., *The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEB*. *Radiation Protection Dosimetry*, 2014. **164**(3): p. 265-270.
80. Sedelnikova, O.A., et al., *Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks*. *Nature Cell Biology*, 2004. **6**(2): p. 168-170.
81. Marinescu, I.M., et al., *Ex vivo γ H2AX assay for tumor radiosensitivity in primary prostate cancer patients and correlation with clinical parameters*. *Radiat Oncol*, 2022. **17**(1): p. 163.
82. van Oorschot, B., et al., *Decay of γ -H2AX foci correlates with potentially lethal damage repair in prostate cancer cells*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(6): p. 2175-80.
83. Suit, H.D., et al., *Radiation response of xenografts of a human squamous cell carcinoma and a glioblastoma multiforme: a progress report*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990. **18**(2): p. 365-73.
84. Gilbreath, C., et al., *Dynamic differences between DNA damage repair responses in primary tumors and cell lines*. *Transl Oncol*, 2021. **14**(1): p. 100898.
85. Baumann, M., T. Hölscher, and J. Denham, *Fractionation in prostate cancer--is it time after all?* *Radiother Oncol*, 2010. **96**(1): p. 1-5.
86. Thames, H.D., et al., *The role of overall treatment time in the outcome of radiotherapy of prostate cancer: an analysis of biochemical failure in 4839 men treated between 1987 and 1995*. *Radiother Oncol*, 2010. **96**(1): p. 6-12.
87. Trott, K.R. and J. Kummermehr, *Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. Accelerated repopulation in tumours and normal tissues*. *Radiother Oncol*, 1991. **22**(3): p. 159-60.
88. Withers, H.R., J.M. Taylor, and B. Maciejewski, *The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy*. *Acta Oncol*, 1988. **27**(2): p. 131-46.
89. Herbert, A.D., A.M. Carr, and E. Hoffmann, *FindFoci: A Focus Detection Algorithm with Automated Parameter Training That Closely Matches Human Assignments, Reduces Human Inconsistencies and Increases Speed of Analysis*. *PLOS ONE*, 2014. **9**(12): p. e114749.
90. Hopp, N., et al., *Automated High-Content Screening of γ -H2AX Expression in HeLa Cells*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1554**: p. 273-283.
91. Hou, Y.N., et al., *Development of an automated gamma-H2AX immunocytochemistry assay*. *Radiat Res*, 2009. **171**(3): p. 360-7.
92. Wanotayan, R., et al., *A deep learning model (FociRad) for automated detection of γ -H2AX foci and radiation dose estimation*. *Scientific Reports*, 2022. **12**(1): p. 5527.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Daniel Zips und Frau Dr. Franziska Hausmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Zips, Doktorvater.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder Frau Dr. Chiara De-Colle, Herrn Lukas Klumpp, Herrn Andreas Riedel und Heidrun Faltin von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich und nach Anleitung von Frau Dr. Chiara De-Colle und Frau Dr. Franziska Hausmann.

Die Bereitstellung der Proben erfolgte durch die Universitätsklinik für Urologie Tübingen durch Herrn Dr. Jörg Hennenlotter.

Die pathologische Bewertung erfolgte durch Herrn Dr. Marcus Scharpf, Institut für Pathologie Universitätsklinikum Tübingen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 05.08.2025

Christian Dieter

9 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Daniel Zips für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung über das gesamte Projekt hinweg ganz herzlich danken. Des Weiteren gilt Frau Dr. Franziska Hausmann mein Dank für die Betreuung und die immerwährende Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt auch der AG Huber, Prof. Dr. Stephan Huber für ein stets offenes Ohr und die Leitung einer einzigartigen Arbeitsgruppe, Heidi Faltin für die Einarbeitung in den Laboralltag sowie dem gesamten Team der Arbeitsgruppe, Andreas Riedel, Anna-Lena Müller, Katrin Ganser, Lukas Klumpp und Nicolai Stransky für die praktische Hilfe in der täglichen Laborarbeit und eine außergewöhnlich schöne Zeit im Labor und weit darüber hinaus.

Außerdem danken möchte ich Frau Dr. Chiara De-Colle für die Einarbeitung in die Durchführung und Auswertung des γ H2AX-Assays, Herrn Dr. Jörg Hennenlotter für die Organisation und Bereitstellung des Patientenmaterials und Herrn Dr. Marcus Scharpf für die pathologische Beurteilung der *ex vivo* Gewebeproben.

Mein Dank gilt außerdem dem IZKF-Promotionskolleg für die wissenschaftliche und finanzielle Förderung dieses Projekts sowie dem Promotionsbüro Tübingen, insbesondere Frau Dr. Inka Montero für die anhaltende Unterstützung der Promotion.

Großer Dank gilt darüber hinaus meiner Familie, meiner Freundin sowie allen Freundinnen und Freunden, die mich über den gesamten Zeitraum hinweg unterstützt und begleitet haben.