

# Auswirkungen von $\alpha$ -Strahlung auf Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Lungenepithels

vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt



GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

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

genehmigte

**Dissertation**  
**von Kim Carola Röder**

Erstgutachter: Prof. Dr. Marco Durante  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Darmstadt 2021

---

Röder, Kim Carola: Stem Cell Differentiation and Cytogenetics im Bereich  
Biophysik am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH  
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt, 2021  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2021  
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2022

Bitte zitieren Sie dieses Dokument als:

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-195197

URL: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/id/eprint/19519>

Dieses Dokument wird bereitgestellt von tuprints,

E-Publishing-Service der TU Darmstadt

<http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de>

[tuprints@ulb.tu-darmstadt.de](mailto:tuprints@ulb.tu-darmstadt.de)



Die Veröffentlichung steht unter folgender Creative Commons Lizenz:

Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung – Keine Bearbeitung 4.0 International

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung:**

---

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

*Kim Röder*

---

Kim Röder Darmstadt, den 30.09.2021

---

---

## Zusammenfassung

---

Das Bronchialepithel der Lunge gilt als besonders strahlungssensitiv und besteht aus verschiedenen Zelltypen, die durch Mutationen zur Tumorgenese von Lungenkrebs entarten können. Als Auslöser für Lungenkrebs sind hauptsächlich Rauchen und Radon verantwortlich. Auf der anderen Seite wird Radon auch zur Therapie von verschiedenen chronischen entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus von Radon ist noch nicht geklärt, der zum einen krebsinduzierend sein kann und zum anderen chronisch entzündliche Krankheiten therapiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkung von  $\alpha$ -Partikeln im Vergleich zu Röntgenstrahlung auf die Stammzellen des humanen Bronchialepithels untersucht. Hierzu wurde die Kultivierung der undifferenzierten primären humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) und deren Differenzierung in der *Air Liquid Interface* (ALI) Kultur zu einem organotypischen Bronchialepithel etabliert. Um interindividuelle Unterschiede von Strahlungseffekten zu untersuchen, wurden die NHBE von zwei Spendern verwendet. Die undifferenzierten Zellen wurden mit  $\alpha$ -Partikel (0,25 - 1,00 Gy) und Röntgenstrahlen (0,5 - 4,0 Gy) bestrahlt und auf das Zellüberleben, die Proliferation, Genexpression (zelltypspezifisch, Seneszenz- und Entzündungsmarker) und ihre Differenzierungseigenschaften analysiert. Das aus bestrahlten NHBE (0,25 und 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel und 0,5 und 2,0 Gy Röntgenstrahlung) resultierende Bronchialepithel wurde anschließend auf seine Funktionalität in Bezug auf Selbstreinigungseigenschaften und Integrität der Barriereigenschaften untersucht.

Die  $\alpha$ -Partikel und Röntgenbestrahlung führt bei den undifferenzierten NHBE zu einer reduzierten Koloniebildung, reduzierten Proliferation, Induktion der p21 Seneszenz und einer verstärkten Differenzierung der Basalzellen in Becherzellen, verglichen mit den scheinbestrahlten NHBE. Dabei bewirkten  $\alpha$ -Partikel einen drei bis fünfmal stärkeren Effekt als die gleiche Dosis an Röntgenstrahlung. Eine deutlich vermehrte Apoptose oder Autophagie der NHBE wurde nach Strahlenexposition nicht beobachtet. Die NHBE beider Spender unterschieden sich in ihren Wachstumseigenschaften, aber nicht in der Strahlenantwort, mit Ausnahme des Zellüberlebens nach Röntgenstrahlung.

Wurden die NHBE nach Bestrahlung in der ALI Kultur in Epithelien differenziert zeigte sich im Verlauf der Differenzierung eine gestiegene Expression des Becherzellmarkers MUC5AC und des proinflammatorischen Interleukins IL1 $\beta$ , sowie eine verspätete Expression des Markers FOXJ1 für ziliotragende Zellen, im Vergleich zur Kontrolle. Bei dem Einfluss auf die Expression der verschiedenen Marker im Laufe der Differenzierung führten 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel zu einer geringeren oder gar keiner Veränderung als 2,0 Gy Röntgenstrahlung. Interindividuelle Unterschiede waren bei der Expression von FOXJ1 und der Intensität des Strahleneinflusses bei MUC5AC und der Clubzellen festzustellen, während es bei den anderen Markern keinen Unterschied gab. Die Expression der Marker für Basalzellen, Seneszenz und Autophagie wurde durch die Strahlung nicht verändert. Die Epithelien, welche aus 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln und 2,0 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten

---

---

NHBE differenziert wurden, zeigten eine verschlechterte Selbstreinigung und eine gesunkene Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle. Eine Ursache für die gesunkene Permeabilität wurde noch nicht identifiziert.

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass NHBE als Strahlenantwort ihre Proliferation einstellen und differenzieren, um die Weitergabe von Schäden an ihre Nachkommen zu verhindern. Die Strahlung fördert die Expression von MUC5AC und inhibiert die FOXJ1 Expression, was zu einer verzögert einsetzenden Ziliogenese führt. Das Ungleichgewicht dieser Differenzierung spiegelt sich in der verschlechterten Selbstreinigung wider. Übertragen auf den Menschen, bedeutet eine reduzierte Selbstreinigung eine Begünstigung von Infektionen, chronischen Lungenerkrankungen und Karzinogenese. Die anhaltende Expression von IL1 $\beta$  deutet auf eine anhaltende Entzündungsreaktion hin. Eine Entzündung steigert *in vivo* das ROS Level und dereguliert dadurch die Homöostase der Bronchialzellen, induziert genetische Instabilität und begünstigt somit zusätzlich die Karzinogenese.

Die beschriebenen Effekte traten nur bei 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln oder 2,0 Gy Röntgenstrahlung, wie Röntgenstrahlung in der Radiotherapie genutzt wird, auf. Während niedrigere Dosen, welche deutlich über der von gängigen radiologischen Untersuchungen oder einer Radontherapie lagen, keinen signifikanten Einfluss auf das Epithel hatten.

---

---

## Abstract

---

The bronchial epithelium of the lung is considered to be particularly sensitive to radiation. It consists of different cell types that can develop into lung cancer cells through mutations. The main triggers for lung cancer are smoking and radon. On the other hand, radon is also used in the therapy of various chronic inflammatory diseases. The exact mechanism of action of radon is not yet clear. On the one hand it can be cancer inducing and on the other hand it is used for treating chronic inflammatory diseases. In this work, the effect of  $\alpha$ -particles compared to X-rays on the stem cells of human bronchial epithelium were studied. For this purpose, the cultivation of undifferentiated primary human bronchial epithelial (NHBE) cells and their differentiation in air liquid interface (ALI) culture to an organotypic bronchial epithelium was established. To investigate interindividual differences of radiation effects, NHBE from two donors were used. The undifferentiated cells were irradiated with  $\alpha$ -particles (0.25 - 1.00 Gy) and X-rays (0.5 - 4.0 Gy) and analyzed for cell survival, proliferation, gene expression (cell type specific, senescence and inflammation markers) and their differentiation properties. The bronchial epithelium resulting from irradiated NHBE (0.25 and 0.5 Gy  $\alpha$ -particles and 0.5 and 2.0 Gy X-rays) was then evaluated for its functionality in terms of self-cleaning properties and integrity of barrier properties.

The exposure of undifferentiated NHBE to  $\alpha$ -particles and X-rays resulted in reduced colony formation, reduced proliferation, induction of p21 senescence, and increased differentiation of basal cells into goblet cells, but  $\alpha$ -particles produced an effect three to five times stronger than the same dose of X-ray irradiation. Apoptosis or autophagy were not altered by irradiation compared with sham-irradiated cells. NHBE from both donors differed in growth characteristics but not in radiation response, except for cell survival after X-ray irradiation.

When the irradiated NHBE were differentiated into epithelia in ALI culture, increased expression of the goblet cell marker MUC5AC and the proinflammatory interleukin IL1 $\beta$ , as well as delayed expression of the ciliary cell marker FOXJ1, was seen during the course of differentiation compared with the control. 0.5 Gy  $\alpha$ -particles resulted in less or no change than 2.0 Gy of x-rays, regarding the expression of the various markers during expression. Interindividual differences were seen in the expression of FOXJ1 and the intensity of radiation influence in MUC5AC and the club cells. In contrast there was no difference in the other markers. The expression of the markers for basal cells, senescence, and autophagy was not altered by radiation. Epithelia differentiated from 0.5 Gy  $\alpha$ -particles and 2.0 Gy X-ray irradiated NHBE showed impaired mucociliary clearance and decreased permeability compared with the control. A cause for the decreased permeability has not yet been identified.

---

---

In summary, the experiments show that NHBE cease proliferation and differentiate in response to radiation to prevent the transmission of damage to their progeny. Radiation enhances MUC5AC expression and inhibits FOXJ1 expression, resulting in delayed onset of ciliogenesis. The dysregulation of the differentiation progress is reflected in the reduced mucociliary clearance. Translated to humans, reduced self-clearance fosters infections, chronic lung disease, and carcinogenesis. Persistent expression of IL1 $\beta$  indicates a sustained inflammatory response. *In vivo* inflammation increases ROS levels, thereby deregulating bronchial cell homeostasis, inducing genetic instability, and thus further promoting carcinogenesis.

The described effects occurred only with 0.5 Gy  $\alpha$ -particles or 2.0 Gy X-rays, as X-rays are used in radiotherapy. Lower doses, which were significantly higher than those of common radiological examinations or radon therapy, had no significant effect on the epithelium.

---

---

## Inhaltsverzeichnis

---

Ehrenwörtliche Erklärung:	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	vi
1.....Einleitung	5
1.1. Aktueller Stand der Forschung zur Strahlenexposition des Bronchialepithels	5
1.2. Motivation und Ziel	7
1.3. Respiratorischer Trakt des Menschen	8
1.3.1. Komponenten des Immunsystems des Bronchialepithels	9
1.4. Entwicklung, Homöostase und Reparatur des pulmonalen Epithels	11
1.4.1. Differenzierung in die vier dominierenden Bronchialepithelzelltypen	12
1.5. Auswirkungen von ionisierender Strahlung	13
1.5.1. Radon	15
1.5.2. Organotypische Modelle des Lungenepithels	16
2.....Methoden	20
2.1. Zellen und Kultivierungsbedingungen	20
2.1.1. Kultivierungsbedingungen der undifferenzierten NHBE	20
2.1.2. Auftauen der Zellen	20
2.1.3. Zellpassage	21
2.1.4. Kryokonservierung	21
2.1.5. Differenzierung und Kultivierung der NHBE in der <i>Air-Liquid-Interface</i> Kultur	21
2.2. Bestrahlung mit ionisierender Strahlung	22
2.2.1. Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	22
2.2.2. Bestrahlung mit $\alpha$ -Strahlung	22
2.3. Durchflussszytometrie	24
2.4. Wachstumskurve	24
2.5. Quantifizierung des Zellüberlebens	25
2.5.1. Überlebenskurve	25
2.5.2. Apoptose Färbung	27
2.6. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	27
2.6.1. RNS Isolierungen	28

---



---

2.6.1.1.	RNS Proben von undifferenzierten NHBE	28
2.6.1.2.	RNS Proben von ALI Kulturen	28
2.6.2.	Reverse Transkription zur cDNS Synthese	28
2.6.3.	Quantitative <i>real-time</i> PCR	28
2.7.	Immunfluoreszenzfärbung	29
2.7.1.	Fixierung und Vorbereitung der Zellen	29
2.7.1.1.	Fixierung der NHBE	29
2.7.1.2.	Fixierung und Anfertigung von Kryoschnitten des bronchialen Epithels	29
2.7.2.	Permeabilisieren und Blockieren	30
2.7.3.	Immunfluoreszenzfärbung	30
2.7.3.1.	Immunfluoreszenzfärbung mit unkonjugierten Antikörpern	30
2.7.3.2.	Immunfluoreszenzfärbung mit konjugierten Antikörpern	30
2.8.	Bestimmung der Zellzykluslänge mittels Kofärbung von EdU, BrdU und Ki67	31
2.9.	Video-basierte Analyse des mukoziliären Transports	33
2.10.	Transepithelialer elektrischer Widerstand	35
2.11.	Statistische Analyse	35
3.....	Ergebnisse	36
3.1.	Undifferenzierte NHBE	36
3.1.1.	Charakterisierung der NHBE	36
3.1.2.	Zellüberleben nach Bestrahlung	40
3.1.2.1.	Überlebenskurve	41
3.1.2.2.	Apoptose-Index	42
3.1.2.3.	Zellzyklusprogression	43
3.1.3.	Strahlenantwort der NHBE auf Ebene der RNS Expression	46
3.1.3.1.	Basalzellen	46
3.1.3.2.	Becherzellen	48
3.1.3.3.	Seneszenz	50
3.1.3.4.	Autophagie	52
3.2.	Differenzierung von bestrahlten NHBE in ALI Kultur	54
3.2.1.	Makroskopische Veränderungen im Laufe der Differenzierung	54
3.2.2.	Expression im Laufe der Differenzierung nach Bestrahlung	55

---

---

3.2.3.	Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf die Morphologie und Funktion des aus den bestrahlten NHBE differenzierten Epithels	64
3.2.3.1.	Mukoziliärer Transport	66
3.2.3.2.	Transepithelialer elektrischer Widerstand	69
4.....	Diskussion	71
4.1.	Strahlenreaktion von primären humanen Bronchialepithelzellen	71
4.1.1.	Charakterisierung der unbestrahlten Bronchialepithelzellen	71
4.1.2.	Strahlung reduziert die Proliferationsfähigkeit und das klonogene Überleben	72
4.1.3.	Strahlung induziert kaum Autophagie oder Apoptose	73
4.1.4.	Strahlung begünstigt Seneszenz	74
4.1.5.	Strahlung induziert Differenzierung der Basalzellen in Becherzellen	75
4.2.	Einfluss einer Strahlenexposition auf die Differenzierungsfähigkeit in ein Bronchialepithel	76
4.2.1.	Eigenschaften des Bronchialepithels	77
4.2.1.1.	Erhöhte MUC5AC Transkription und verzögerte Ziliogenese bei der Differenzierung von den Nachkommen der bestrahlten Basalzellen	77
4.2.1.2.	Keine Hinweise auf permanente strahleninduzierte Seneszenz oder Autophagie im Bronchialepithel	79
4.2.2.	Bestrahlung der undifferenzierten NHBE führt zu einer veränderten Funktionalität des differenzierten Bronchialepithels	80
4.2.2.1.	Erhöhtes Level des proinflammatorischen Zytokin IL1 $\beta$	80
4.2.2.2.	Strahlung führt zu einem Anstieg des transepithelialen elektrischen Widerstands	81
4.2.2.3.	Strahlung reduziert die Geschwindigkeit und Koordination der mukoziliären Reinigung	82
4.3.	Schlussfolgerung und Ausblick	84
	Literaturverzeichnis	lxxxvii
	Anhang	cii
	Lebenslauf	cxix
	Danksagung	cxix
	Abbildungsverzeichnis	cxix
	Tabellenverzeichnis	cxix
	Abkürzungen	cxix

---



---

## 1. Einleitung

---

In den letzten Jahrzehnten ist die Erkrankungs- und Sterberate bei Lungenerkrankungen deutlich gestiegen und nimmt damit den zweiten Platz der weltweiten Todesursachen ein. Besonders häufig sind die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Tuberkulose, Lungenkrebs, Pneumonitis und Asthma. Die Hauptrisikofaktoren sind das Rauchen und die zunehmende Luftverschmutzung, in Entwicklungsländern kommen die armutsbedingte Mangelernährung und die schlechten Hygienebedingungen dazu [1], [2]. Das Problem bei chronischen Lungenerkrankungen wie COPD und Asthma ist, dass diese gegenwärtig nicht heilbar sind und die Betroffenen ein Leben lang mit Einschränkungen leben und Medikamente einnehmen müssen, die unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen [3]. Eine Therapie mit jahrhundertelanger Tradition stellt die Radontherapie dar. Dabei nehmen die Patienten bei einem Aufenthalt in einem Heilstollen oder einem Bad in radonhaltigem Wasser Radon über die Haut und die Lunge auf. Das Radon wirkt sich positiv auf die Symptome aus und sorgt für eine Schmerzlinderung über mehrere Monate, dadurch können Medikamente reduziert oder abgesetzt werden [4], [5]. Wie genau diese Wirkung des Radons induziert wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt [6]. Sowohl die positive Wirkung der Radontherapie wurde in klinischen Studien [5], [7], als auch tumorinduzierende Effekte von erhöhter chronischer Radonbelastung wurden in epidemiologischen Studien gezeigt [8]–[10]. Auch ein Zusammenhang zwischen erhöhter Radonbelastung und dem Risiko für Leukämie wird vermutet, wurde aber noch nicht vollständig bewiesen [11], [12]. Epidemiologische Studien dazu, wie sich eine Radontherapie auf das Krebsrisiko auswirkt, gibt es noch nicht [6].

### 1.1. Aktueller Stand der Forschung zur Strahlenexposition des Bronchialepithels

---

In Simulationen wurde gezeigt, dass 95 % der Dosis in der Lunge deponiert werden und dort im Bereich der Karina die höchste Strahlenbelastung auftritt [13], [14]. Auch in Mäusen wurde bereits die Schadenswirkung des  $\alpha$ -Emitters Radon in der Lunge gezeigt [15], allerdings ist es schwierig die Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen, da die Dosisdeposition in Mensch und Maus aufgrund der unterschiedlichen Anatomie (siehe Kapitel 1.5.2) verschieden ist [16]. Insbesondere gibt es deutliche speziesabhängige Unterschiede bei den Zellen mit Stammzellfunktionen und den Schadens- und Entzündungsreaktionen des Bronchialepithels [17]. Die Schadens- und Entzündungsreaktionen sind stark an der Ausprägung von chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen beteiligt, welche durch die Radontherapie therapiert werden [3]. Bei diesen Erkrankungen sind Elemente der mukoziliären Reinigung (MCC, siehe Kapitel 1.3.1) dereguliert. Bisher wurde der Effekt von ionisierender Strahlung auf das humane Bronchialepithel kaum untersucht. Bekannt ist, dass die pulmonalen Stammzellen Doppelstrangbrüche vor allem über die fehleranfällige nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ) reparieren [18]. Die Strahlung führt zudem zu Becherzellhyperplasien im Epithel [19], [20]. Wie sich die Strahlung auf die Differenzierungs-

---

eigenschaften der Stammzellen und das daraus resultierende Bronchialepithel auswirkt wurde bisher kaum untersucht. Bisher bekannte Auswirkungen von Röntgenstrahlung auf in *Air Liquid Interface* (ALI) kultivierte primäre humane Bronchialepithelzellen (NHBE) sind bei einer dreimaligen Röntgenbestrahlung von 1 Gy während der ersten 14 Tage der Differenzierung eine gestiegene Apoptoserate, während keine Veränderungen der Zelltypmarkerexpression oder der Permeabilität des Epithels detektiert wurden [21]. Eine einmalige Röntgenbestrahlung mit 2 oder 4 Gy führt im aus NHBE differenzierten Bronchialepithel auf Proteinebene zu einer dosisabhängigen Reduktion von Basal- und Flimmerepithelzellmarker. Die veränderte Differenzierung wird durch die NOTCH-Signalgebung der Stammzellen bewirkt, ebenso wie Veränderungen der DNS-Schadensreparatur, Proliferationskapazität und Lebensfähigkeit, welche durch die Bestrahlung reduziert werden [22], [23]. Die NOTCH-Signalgebung wird über das Level der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reguliert [24]. Eine systemische Reduktion der ROS durch eine Aktivierung der Superoxiddismutase sowie ein Anstieg von antiinflammatorischen Immunzellen durch Radon wurde beobachtet [6].

Beim Rauchen wird neben der Aufnahme der toxischen Moleküle auch  $\alpha$ -Strahlung durch das im Tabak enthaltene  $^{210}\text{Polonium}$  [25] emittiert. Die Effekte beider Noxen summieren sich nicht nur, sondern verstärken sich synergistisch [26], [27]. Der Tabakrauch führt *in vitro* im Bronchialepithel zu einer Reduktion der Zilienschlagfrequenz (CBF), erhöhter Permeabilität, einer Zunahme an Becher- und Clubzellen und zu Hyper- und Metaplasien der Becherzellen [28]–[31]. Die Folgen der Bestrahlung für die Funktionalität und im Besonderen der MCC wurden bisher jedoch noch nicht untersucht. Die MCC ist bei gesunden Menschen koordiniert und weist in verschiedenen Bereichen des Epithels unterschiedliche Geschwindigkeiten auf, dies ist abhängig von der lokalen Anzahl der Zilien, der CBF, der Mukusrheologie und dem Durchmesser der Bronchien [32], [33]. Ebenso unterscheidet sich die Geschwindigkeit stark zwischen einzelnen Individuen und ist von ihrem Alter, Gesundheitszustand und Geschlecht abhängig [32], [34]. Die MCC kann *in vitro* anhand von Tracerpartikeln ermittelt werden [35]–[37], allerdings wurde hier noch nicht der Grad der Koordinierung als Maß für die Integrität des Epithels mit einbezogen. Oft wird nur die CBF als Maß für die MCC untersucht, da sie einfacher zu bestimmen ist [29], [38], [39].

---

## 1.2. Motivation und Ziel

---

Im Rahmen des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten GREWISa Projekts wird die therapeutische Wirkung und das Risiko der Radontherapie näher untersucht. Gegenstand dieser Arbeit war es, den Effekt von  $\alpha$ -Strahlung auf humane Stamm- und Vorläuferzellen des Bronchialepithels zu untersuchen, da im Bereich der Karina und der Hauptbronchien bei einer Radontherapie die höchste Dosis deponiert wird [13] und diese Zellen ein großes Potential zur Karzinogenese bieten [18]. Als Modell wurden NHBE, die Stammzellen des Bronchialepithels, verwendet. Um auch interindividuelle Unterschiede zu berücksichtigen wurden NHBE von zwei Spendern gleichen Geschlechts und Alters verwendet. Dazu wurden die NHBE in undifferenzierter und in organotypischer ALI Kultur an dem GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung (GSI) etabliert und charakterisiert. Die Begasung mit Radon an der GSI ist mittels einer Radonkammer möglich [40]. Allerdings geht die applizierbare Dosis selbst bei einer Stunde bei  $620 \text{ kBq/m}^3$  Radon gegen null, sodass für die Auswirkung der  $\alpha$ -Strahlung eine Americium-Quelle als  $\alpha$ -Emitter diente, um einen Strahleneffekt zu erzielen [41]. Als Referenzstrahlung diente Röntgenstrahlung. Ziel dieser Arbeit war es, das zelluläre und reproduktive Zellüberleben der undifferenzierten NHBE nach der Bestrahlung zu quantifizieren. Ebenso sollen die Differenzierungseigenschaften der bestrahlten NHBE in der ALI Kultur analysiert werden. Während der Differenzierung soll dazu die Expression von zelltypspezifischen Markern des Bronchialepithels, sowie von Seneszenz- und Entzündungsmarkern quantifiziert werden und die Funktionalität des resultierenden Epithels, wie zum Beispiel die Permeabilität und Selbstreinigung, untersucht werden.

---

### 1.3. Respiratorischer Trakt des Menschen

---

Der respiratorische Trakt des Menschen wird in die oberen und unteren Atemwege unterteilt. Die unteren Atemwege beginnen mit der Trachea, die sich an der Karina (auch Bifurkation) in die zwei Hauptbronchien aufteilt (siehe Abbildung 1). Die Hauptbronchien teilen sich dann dichotom weiter in die Bronchien und später in die Bronchiolen auf. Die Bronchiolen verästeln sich weiter in die *Bronchioli terminales*, sie stellen das Ende des luftleitenden Abschnitts dar. Der gasaustauschende Teil des respiratorischen Trakts beginnt mit den *Bronchioli respiratori*, welche dann in den Alveolen enden [42], [43].

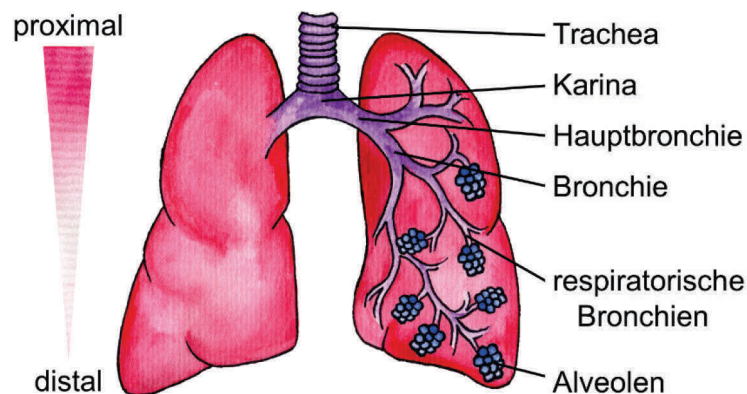


Abbildung 1: Die unteren Atemwege des Menschen. Sie beginnen proximal mit der Trachea, welche sich in die Hauptbronchien aufteilt. Die Hauptbronchien teilen sich innerhalb der Lungenflügel weiter in die Bronchien auf, welche distal über die Bronchiolen in die respiratorischen Bronchiolen übergehen und schließlich in den Alveolen enden.

Die Morphologie des Epithels der verschiedenen Bereiche ist an die spezifische Funktion dieser Regionen optimal angepasst (siehe Abbildung 2). Die luftleitenden (auch konduktiven) Atemwege der Lunge erwärmen die inhalede Luft, feuchten sie an und fangen inhalede Fremdkörper wie Bakterien und Staub ab. Die vier Hauptzelltypen des Bronchialepithels sind die Basalzellen, die Becherzellen, die zilienträgenden Zellen und die Clubzellen. Über die Anteile der einzelnen Zelltypen gibt es verschiedene Angaben. In den Hauptbronchien sind es 20-30 % Basalzellen, 50-60 % zilienträgende Zellen, 6-10 % Becherzellen und 1-10 % Clubzellen [28], [44]. Die Basalzellen befinden sich auf der Basallamina und sind als Stammzellen für die Homöostase und Schadensreparatur zuständig. Die Becherzellen, zilienträgenden Zellen und Clubzellen sind ebenfalls mit der Basallamina verbunden. Jedoch liegen ihre Zellkörper über denen der Basalzellen, dadurch entsteht der Eindruck eines mehrschichtigen Epithels. Dieser pseudostratifizierte Aufbau des Epithels ist typisch für die proximalen Atemwege, je geringer der Durchmesser der Bronchiolen, desto mehr wird die pseudostratifizierte Morphologie durch einen säulenartigen und einschichtigen Aufbau abgelöst. Becherzellen sezernieren Glykoproteine wie Muzin 5AC (MUC5AC) und Muzin 5B (MUC5B) für die Mukussynthese. Die Flimmerepithelzellen tragen auf der dem Lungenlumen zugewandten Zelloberfläche Zilien, diese sorgen für die MCC in Verbindung mit dem Mucus. Die Clubzellen werden im distalen Bereich der Atemwege häufiger, während die Anzahl der Becher- und

Basalzellen sinkt. Clubzellen sezernieren ebenfalls Glykoproteine und sorgen für eine veränderte Rheologie des Mukus, damit dieser in den immer feiner werdenden Bronchiolen eine geringere Oberflächenspannung aufweist. Zusätzlich sezernieren Clubzellen immunmodulierende Proteine zum Schutz der Lunge. Als Vorläuferzellen tragen sie ebenfalls zur Homöostase und Schadensreparatur bei. Der Gasaustausch findet dann in den Alveolen statt. Sie bestehen aus Pneumozyten Typ (ACT) 1 und 2, welche flach aufgebaut sind und ein sehr dünnes Epithel bilden, um in Kombination mit einer großen Oberfläche den Gasaustausch zu ermöglichen (siehe Abbildung 2).

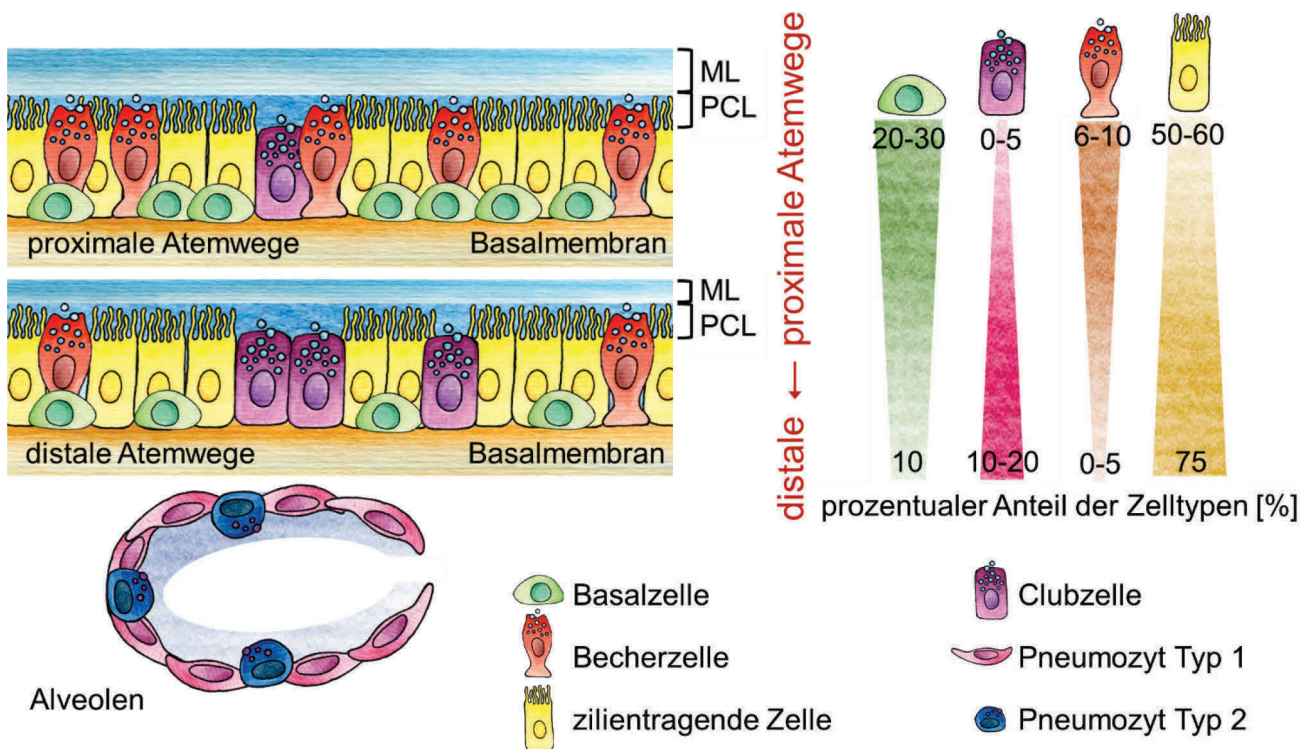


Abbildung 2: Morphologie der verschiedenen Epithelien des respiratorischen Traktes des Menschen. Im proximalen Bereich, also in der Trachea, den Hauptbronchien und Bronchien ist das Epithel pseudostratifiziert aufgebaut und besteht zum Hauptteil aus Basalzellen, zilentragenden Zellen, Becher- und Clubzellen. Dieser Aufbau wandelt sich distal in den terminalen und respiratorischen Bronchiolen in eine einschichtige säulenartige Struktur um und der Anteil an Basalzellen sinkt, während der der Clubzellen ansteigt. Mit sinkendem Durchmesser der Bronchien nimmt auch die Dicke der Mukusschicht (ML) ab, welche auf der periziliären Flüssigkeit (PCL) liegt. In den Alveolen wird das Epithel durch die flachere Zellmorphologie der Pneumozyten Typen 1 und 2 (ACT1 und ACT2) dünner [44]-[46].

### 1.3.1. Komponenten des Immunsystems des Bronchialepithels

Das Bronchialepithel stellt eine physikalische und chemische Barriere dar, welche in drei Hauptteile gegliedert wird. Erstens die apikalen Zellverbindungen, die die gesamten Atemwege auskleiden, zweitens die MCC und drittens die Synthese von Mediatoren, welche Entzündungsreaktionen, die Chemotaxis und die antimikrobielle Abwehr regulieren [47] (siehe Abbildung 3).

Das Bronchialepithel hat als dichtes abschließendes Gewebe eine Barrierefunktion, die ein Eindringen der Pathogene verhindert und somit Teil des physikalischen Immunsystems ist. *Tight*



---

*junctions* zwischen den Becher- und zilientragenden Zellen verschließen den extrazellulären Raum, sodass Pathogene nicht aus dem Lungenlumen in das Lungengewebe gelangen können [48]. Über den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) wird diese Integrität, also die extrazelluläre Permeabilität, gemessen (siehe Kapitel 2.10) [49]. Die Becher- und zilientragenden Zellen sorgen in Kombination zudem für die MCC. Dabei werden die Pathogene von dem Mukus aus der Luft abgefangen und durch den koordinierten Zilienschlag aus der Lunge die Luftröhre hinauf oder gezielt zu makrophagenreichen Regionen abtransportiert. Der Flüssigkeitsfilm, der die Lunge auskleidet, wird *airway surface liquid* (ASL) genannt und ist in zwei Schichten unterteilt (siehe Abbildung 3). Der wässrige Flüssigkeitsfilm im Bereich der Zilien, wird *periciliary liquid* (PCL) genannt, ist ca. 7 µm dick und von geringer Viskosität. Die obere Schicht ist die eigentliche Mukusschicht (ML) und besteht zu ~97 % aus Wasser, ~1 % Muzinen und ~2 % Salzen und Proteinen. Sie ist 2-5 µm dick und viskos. Durch die unterschiedliche Viskosität der beiden Flüssigkeiten kann der Zilienschlag in der PCL die trägere ML gerichtet bewegen [48], [50]. Die Geschwindigkeit des mukoziliären Transports (MCT) hängt vom Individuum, dem Alter und dem Gesundheitszustand ab, bei gesunden Menschen beträgt sie zwischen 67 und 333 µm/s. Dazu schlagen die Zilien mit einer CBF von 12-15 Hz [51]. Die CBF sinkt mit dem Alter, durch Rauchen oder durch Atemwegserkrankungen wie Asthma [39], [45]. Eine Dysfunktion der MCC begünstigt bakterielle oder virale Infektionen der Lunge, sowie die Pathogenese von chronisch entzündlichen Lungenkrankheiten [52].

Neben diesen physikalischen und chemischen Mechanismen können auch humorale und zelluläre Immunreaktionen auslöserspezifisch induziert werden. Eine wichtige Aufgabe um chronische Entzündungen zu vermeiden, ist die Unterscheidung von harmlosen und pathogenen Partikeln. Die Epithelzellen sezernieren surfaktive Proteine und Defensine, welche immunmodulierend wirken [48], [53] (siehe Abbildung 3). Proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin 1β (IL1β) und Interleukin 8 (IL8) [47], beeinflussen die Apoptose, Proliferation und Differenzierung oder sind chemoattraktiv für T-Zellen, unreife dendritische Zellen und Makrophagen [54]. Für die unspezifische Abwehr von Pathogenen sezernieren die Bronchialepithelzellen zudem Proteine des Komplementsystems oder präsentieren diese auf ihrer Zelloberfläche. Dabei handelt es sich meistens um Proteasen und Membranangriffskomplexe, welche proinflammatorische Reaktionen und die Opsonierung einleiten oder direkt durch Zerstörung der Zellmembran Bakterien abtöten [48]. Eine Dysregulation der Immunantwort führt durch Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL1β, zu chronischen Entzündungen und begünstigt die Manifestierung von entzündlichen Krankheiten wie Asthma oder COPD [55]. Die anhaltende Entzündung hat auch ein chronisch erhöhtes ROS Level zur Folge. Dies kann genetische Instabilität durch Veränderungen der epigenetischen Regulatoren wie DNS-Methylierung und Proteinfaltungen induzieren. Daraus resultieren DNS-Aberrationen, die wiederum die Tumorgenese begünstigen [56]. Zusätzlich reduzieren chronisch erhöhte Level der proinflammatorischen Zytokine die Barrierefunktion des Bronchialepithels [52].

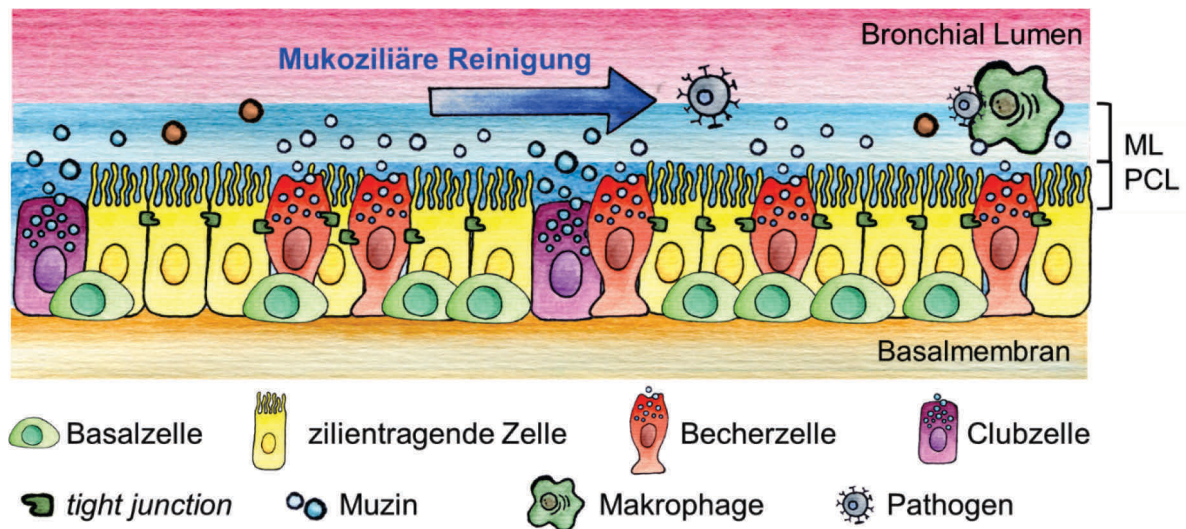


Abbildung 3: Die drei Hauptbestandteile der Immunabwehr des humanen Bronchialepithels. *Tight junctions* verbinden die Becher- und zilienträgenden Zellen fest miteinander und schließen den extrazellulären Raum zum Lungenlumen hin ab. Für die mukoziliäre Reinigung (MCC) werden Muzine von Becher- und Clubzellen sezerniert und bilden die ML des airway surface liquids (ASL). Die ML schwimmt auf der PCL und fängt Fremdkörper ab. Die Zilien der zilienträgenden Zellen liegen in der PCL und sorgen für einen Transport der ML. Becher- und Clubzellen sezernieren zudem immunmodulierende Proteine, die verschiedene Immunreaktionen auslöserspezifisch einleiten können.

#### 1.4. Entwicklung, Homöostase und Reparatur des pulmonalen Epithels

Das Lungenepithel entwickelt sich aus einer Region des anterior-ventralen Vorderdarm Entoderm und ist durch den Transkriptionsfaktor NK2 homeobox 1 (Nkx2.1) charakterisiert, welcher die terminale Differenzierung der Lungenzelltypen in der fetalen Entwicklung des Lungengewebes einleitet [57]. In der vollständig entwickelten Lunge unterscheidet sich die Zellzusammensetzung und die strukturelle Organisation des Epithels entlang der proximal-distalen Achse (siehe Abbildung 2). Die unterschiedlichen Regionen des Epithels enthalten an ihren Wirkungsort angepasste adulte Stammzellpopulationen. Im proximalen pseudostratifizierten Epithel, sind dies die Basalzellen, sie sind undifferenziert und morphologisch simpel aufgebaut. Weiter distal gelegen, im immer mehr columnar aufgebauten Epithel, steigt der Anteil an Clubzellen. Sie übernehmen ebenfalls Vorläuferzellfunktionen, sind morphologisch komplexer aufgebaut und haben zusätzliche spezifische Funktionen, wie die Synthese und Sezernierung von Glykoproteinen und immunmodulierenden Proteinen [58].

Für die Homöostase des Bronchialepithels ist nur ein geringer *Turnover* der Stamm- und Vorläuferzellen notwendig, eine vermehrte Proliferation wird durch Verletzungen aktiviert [59]. Eine besondere Eigenschaft des Bronchialepithels ist die besondere Plastizität der einzelnen Zelllinien. Die meisten, wenn nicht sogar, alle Epithelzelllinien der Lunge haben die Fähigkeit, wieder in den Zellzyklus einzutreten, um verlorene Zellen durch ihre Fähigkeit zur Proliferation zu ersetzen (siehe Abbildung 4). So kann sehr schnell auf Verletzungen und Stress reagiert werden und die lebensnotwendige Integrität des Bronchialepithels wird rasch wiederhergestellt [60], [61].

Adulte Stammzellen haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung und können sich im richtigen Umfeld nahezu unbegrenzt oft teilen. Sie sind multipotent und können alle Zelltypen eines Gewebes durch Teilung bilden [62]. Hierzu zählen im Bronchialepithel die Basalzellen. Bei Mäusen werden die Basalzellen *in vivo* von den neuroendokrinen Zellen gebildet [63], während ihre Herkunft beim Menschen noch nicht genau geklärt ist [64]. Charakteristisch für Basalzellen sind die Expression von Tumorprotein 63 (TP63), Keratin 5 (KRT5) und Keratin 14 (KRT14). KRT5 wird in allen Basalzellen, KRT14 nur in frühen Basalzellen exprimiert [65], [66].

Vorläuferzellen bilden verschiedene Zelltypen eines Gewebes. Im Gegensatz zu den Stammzellen können sie aber nur eine limitierte Anzahl an Teilungen durchlaufen und gehen dann in Seneszenz. Sie haben also keine selbsterneuernden Eigenschaften. Im Bronchialepithel zählen die Clubzellen zu den Vorläuferzellen. Die Population der Clubzellen ist sehr heterogen, allen gemein ist die Expression von Secretoglobin *family 1A member 1* (SCGB1A1) [60]. SCGB1A1, auch CC10 genannt, codiert das antiinflammatorische Protein Uteroglobulin, welches von den Clubzellen synthetisiert und sezerniert wird [67].

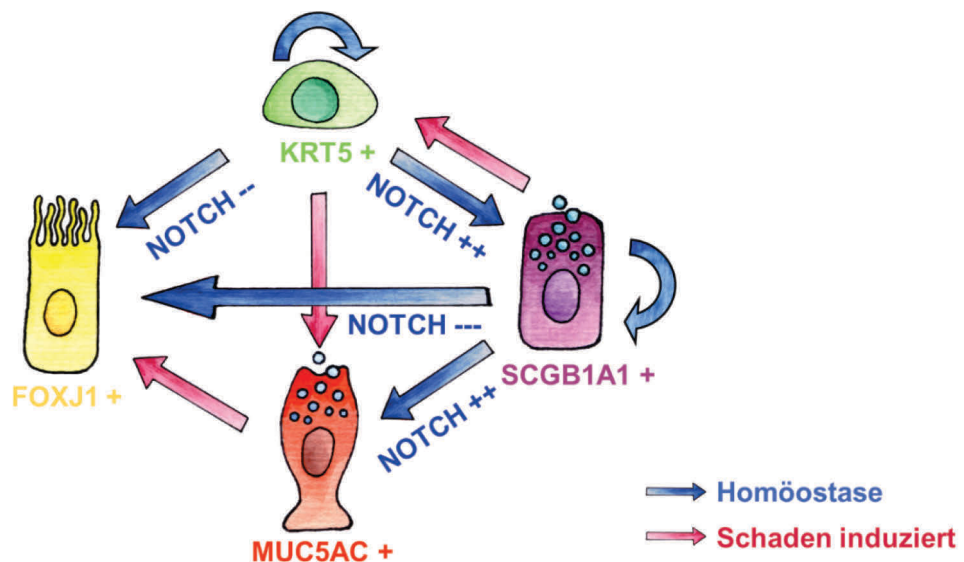


Abbildung 4: Differenzierungsschema der verschiedenen Zelltypen unter homöostatischen und stressinduzierten Bedingungen. Als Hauptdifferenzierungsfaktor wurden die jeweils benötigten NOTCH Konditionen dargestellt.

### 1.4.1. Differenzierung in die vier dominierenden Bronchialepithelzelltypen

Wie viele Differenzierungsprozesse, wie zum Beispiel der Erhalt von neuronalen Stammzellen und deren Neurogenese, ist auch die Differenzierung der Basalzellen in die verschiedenen Zelltypen der Lungenlinie abhängig von dem NOTCH Signalweg [68], [69]. Der NOTCH Signalweg wird durch intrinsische und extrinsische ROS Konzentrationen beeinflusst, ein steigendes ROS Level aktiviert den NOTCH Signalweg [24]. In vielen Krebstypen, wie auch in Lungenkrebs, ist der NOTCH Signalweg dereguliert oder mutiert [70]. Postnatal führt ein aktiver NOTCH Signalweg zu einer Differenzierung der Basalzellen zu sekretorischen Zellen und supprimiert die Differenzierung in

---

zilentragende Zellen (siehe Abbildung 4). Etwa 40 % der Basalzellen exprimieren KRT14, sie sind für die Selbsterneuerung und den Erhalt der KRT5-positiven Stammzellpopulation verantwortlich [65], [71].

Clubzellen können zu Becherzellen und zilentragenden Zellen differenzieren, dabei sind sie dann ebenfalls MUC5AC oder  $\beta$ -Tubulin IV-positiv [46]. Sie ersetzen in den distalen Atemwegen immer mehr die Basalzellen und übernehmen dort die Stammzellfunktion. Clubzellen differenzieren aus KRT5<sup>+</sup>/KRT14<sup>-</sup> Basalzellen bei einem hohen NOTCH Level [72], [73]. NOTCH aktiviert die Regenerierung der Clubzellen, sowie die Generierung von zilentragenden Zellen durch asynchrone Teilung. Bei Verletzungen des Gewebes können Clubzellen auch in TP63-positive Basalzellen dedifferenzieren [74]. In der Homöostase führt ein niedriges NOTCH Niveau zu einer Expression von Forkhead box protein J1 (FOXJ1). FOXJ1 leitet die Ziliogenese und damit die Differenzierung in zilentragenden Zellen ein [72], [73]. Im Gegensatz dazu induziert ein hohes NOTCH Niveau die Differenzierung in Becherzellen [75].

## **1.5. Auswirkungen von ionisierender Strahlung**

---

Strahlung allgemein führt *in vivo* und *in vitro* zu DNS-Schäden, Entstehung von ROS, Zelltod und Induktion einer akuten Entzündungsreaktion (*in vitro* nur bei Kulturen mit Immunzellen oder immunmodulierenden Zellen) [76]. Minuten nach der Bestrahlung löst die Schädigung der DNS oder der zytoplasmatischen Organellen eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die Genexpression wird verändert und Wachstumsfaktoren und Interleukine werden sezerniert [77]. Zusätzlich werden durch die Ionisierung von Wassermolekülen ROS erzeugt und reaktive Stickstoffspezies generiert, welche Proteine und Organellen direkt modifizieren können oder indirekt über die Schädigung der DNS. ROS sind für 60 % des gesamten Schadens verantwortlich [78]. Im Bronchialepithel kann das ROS Level das Gleichgewicht zwischen symmetrischer und asymmetrischer Proliferation der Basalzellen stören und somit ihr Potential zur Selbsterneuerung und Homöostase [24], während nicht korrekt reparierte DNS-Schäden neben Apoptose auch zu genetischer Instabilität führen. Genetische Instabilität ist eine transgenerative Reaktion und Grundlage für die strahleninduzierte Karzinogenese, wenn DNS-Schäden durch eine Deregulation des Zellzykluses an die Tochterzellen weitergegeben werden [79], [80].

In den Alveolen führt Strahlung zum Absterben der ACT 1 Zellen, wodurch die Integrität des Epithels abnimmt und die steigende Permeabilität zu einer verringerten Gasaustauschkapazität führt oder sogar zu einem Kollabieren der Alveole [81]. Im Gegensatz dazu sind die Zellen der Atemwege weniger radiosensitiv. Die Basalzellen weisen bessere DNS-Reparatureigenschaften auf, obwohl sie bevorzugt die fehleranfällige NHEJ zur Doppelstrangbruchreparatur nutzen [18]. Eine Ansammlung von Mutationen in den Basalzellen kann über die Zeit zur Tumorgenese eines Plattenepithelkarzinoms der Lunge führen [18], [82]. Man geht davon aus, dass die unterschiedlichen Lungenkrebsformen aus unterschiedlichen Zellen des Lungenepithels hervorgehen. Lungenkrebs wird in

kleinzellige Karzinome (SCLC) und nichtkleinzellige Karzinome (NSCLC) unterteilt, welcher weiter unterteilt ist in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome. Als Ausgangszellen für Plattenepithelkarzinome gelten Basal-, Club- und ACT 2 Zellen. Adenokarzinome resultieren aus mutierten Clubzellen und in seltenen Fällen auch aus zilienträgenden Zellen und Becherzellen. Pulmonale neuroendokrine Zellen können zu groß- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen mutieren [82]. Nach dem Rauchen ist ionisierende Strahlung der größte Risikofaktor bei der Entstehung von Lungenkrebs, der weltweit für die meisten Krebstoten verantwortlich ist [2].

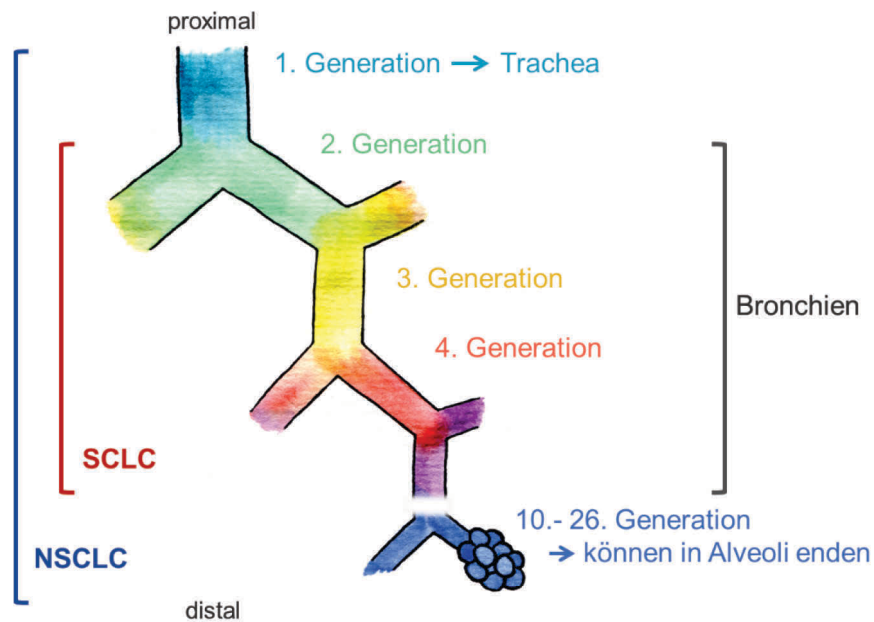


Abbildung 5: Lokalisation der Ursprungszellen für verschiedene Lungenkrebsarten. SCLC: kleinzellige Lungenkarzinome, NSCLC: nicht-kleinzellige Lungenkarzinome. SCLC kann im Bereich der Bronchien auftreten, während NSCLC im gesamten Lungengewebe entstehen kann.

Die Lunge zählt als radiosensitiv, etwa die Hälfte der Opfer von Strahlenunfällen leidet früher oder später unter Lungenschäden. Am häufigsten sind Pneumonitis und Fibrose. Zellschäden des Bronchialepithels induzieren die Sezernierung von Zytokinen, die weitere Rekrutierung von Zytokinen durch das Immunsystem verursacht eine akute Pneumonitis, durch die Entzündung werden Fibroblasten rekrutiert und differenzieren zu Myofibroblasten. Bei anhaltender Entzündung findet zusätzlich eine epithelial-mesenchymale Transition statt, dabei wandeln sich Epithelzellen in mesenchymale Zellen um. Die epithelial-mesenchymale Transition und die Proliferation der Myofibroblasten führen dann zu einer Fibrose [61], [83]–[85]. Pneumonitis tritt ein bis drei Monate nach der Exposition auf und kann reversibel sein. Nach 6 bis 24 Monaten kann eine irreversible Lungenfibrose auftreten, oft als Folge von chronischer Pneumonitis. Auch nach einer Radiotherapie der Lunge treten bei 1-25 % der Patienten diese Folgeerkrankungen auf, allerdings ist die Häufigkeit stark abhängig von der verwendeten Dosis, Strahlenqualität und Tumorlokalisierung [85]. Typische Dosis einer Fraktion bei der Radiotherapie eines Lungentumors sind 2 Gy Röntgenstrahlung, die

---

Gesamtdosis ist Tumorabhängig und liegt meist zwischen 20 und 70 Gy [86]. Im Gegensatz dazu sind die Auswirkungen von einer geringen chronischen Strahlenexposition, wie bei in der Radiologie tätigen Personen, Minenarbeitern oder häufiger Aufenthalt in Räumen mit erhöhter Radonbelastung, deutlich schwieriger zu beurteilen. Die stochastischen Schäden treten selten und erst nach Jahren bis Jahrzehnten auf, zudem ist die genaue Dosimetrie, die Langzeitnachuntersuchung und der Einfluss von zusätzlichen Risikofaktoren, wie Rauchen, genetische Prädisposition und Ernährung, schwierig zu quantifizieren [87]–[89].

### 1.5.1. Radon

---

Während seines gesamten Lebens ist der Mensch unterschiedlicher Strahlung ausgesetzt. Diese kann natürlichen Ursprungs sein, wie terrestrische und kosmische Strahlung, oder Menschen gemacht sein. Die Energie, die Strahlung in Materie deponiert, wird in Gy als absorbierte Dosis gemessen. Da die Auswirkungen stark von den Eigenschaften des Organismus und der Strahlung abhängen, wird hier die Äquivalenzdosis oder die effektive Dosis als Maß genommen und in Sievert (Sv) angegeben. Die Äquivalenzdosis setzt sich aus der absorbierten Dosis und der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) zusammen, bei der effektiven Dosis wird zusätzlich die Radiosensitivität des exponierten Gewebes miteinbezogen. Der Gewichtungsfaktor für die Radiosensitivität wird von der internationalen Strahlenschutzkommission (ICRP) vorgeschlagen [6], [90].

In Deutschland beträgt die durchschnittliche jährliche natürliche Strahlendosis für einen Menschen etwa 2,1 mSv. Mit 1,1 mSv macht die Strahlenbelastung durch Radon, welches dichtungisierende  $\alpha$ -Partikel bei seinem Zerfall freisetzt, über die Hälfte der natürlichen jährlichen Dosis aus [87]. Radon (Rn) zählt zu den Edelgasen. Seine natürlich vorkommenden Isotope sind  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{220}\text{Rn}$  und  $^{219}\text{Rn}$ , wobei  $^{222}\text{Rn}$  das am häufigsten vorkommende Isotop ist. Es entsteht im granitreichen Erdreich durch den Zerfall von Uran und Thorium und diffundiert dann in die Atmosphäre, das Grundwasser oder unterirdische Hohlräume [89]. Der  $\alpha$ -Emitter Radon verursacht hauptsächlich durch seine Zerfallsprodukte (siehe Abbildung 6) etwa die Hälfte der natürlichen Strahlenbelastung auf der Erde [91]. Dadurch ist Radon nach Rauchen die zweit häufigste Ursache für Lungenkrebs. Je nach Land und Berechnungsmethode verursacht Radon 3-14 % der Lungenkrebsfälle [92]. In epidemiologischen Studien an Minenarbeitern wurde bereits belegt, dass eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Radonkonzentration in der Luft und dem vermehrten Auftreten von Lungenkrebs besteht [93]–[95]. Neben dem epidemiologischen Ansatz zur Bestimmung der Strahlenbelastung durch inhalede Radon-Tochternuclide gibt es auch die Dosimetrie. Problematisch ist hier, dass es eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Ansätze gibt. Die dosimetrische Herangehensweise gibt in der Regel eine höhere Dosis und damit ein höheres Risiko an, als die epidemiologischen Ansätze [96]. Bei vielen chronisch entzündlichen Krankheiten, wie Asthma bronchiale, chronischer Bronchitis, Neurodermitis, Rheuma und Arthrose, führt eine Radontherapie

zu einer Verbesserung der Symptome für bis zu 40 Wochen. Die Radontherapie kann die Krankheit zwar nicht heilen, allerdings verbessert sie die Lebensqualität durch Reduktion der Schmerzen und der daraus resultierenden Reduktion oder sogar kompletten Ersatz der sonst nötigen Schmerzmittel [6], [97].

Für die Dosis-Deposition in der Lunge sind zum größten Teil die Tochternuklide des Radons verantwortlich, da diese im Gegensatz zum Edelgas nicht beim nächsten Atemzug exhaliiert werden [98], [99]. Dabei ist die Dosis abhängig von der Lokalisation des Zerfalls im respiratorischen Trakt, je tiefer in der Lunge die Zerfallsprodukte entstehen, desto länger benötigen sie, um aus dem respiratorischen Trakt heraus transportiert zu werden, desto wahrscheinlicher findet der weitere Zerfall (siehe Abbildung 6) und damit weitere Strahlenbelastung noch im Menschen statt. Durch die Anatomie der Lunge und die physikalischen Eigenschaften des Radons kommt es also zu einer inhomogenen Dosisverteilung in der Lunge [14]. Dadurch sind die proximalen Atemwege und im Besonderen der Bereich der Karina, dem Hauptteil der exponierten Dosis ausgesetzt [13]. Der größte Schaden wird trotz der geringen Reichweite durch die dichtionisierende  $\alpha$ -Strahlung hervorgerufen, die dünnionisierende  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlung führt nur zu etwa 10 % der deponierten Dosis [98].

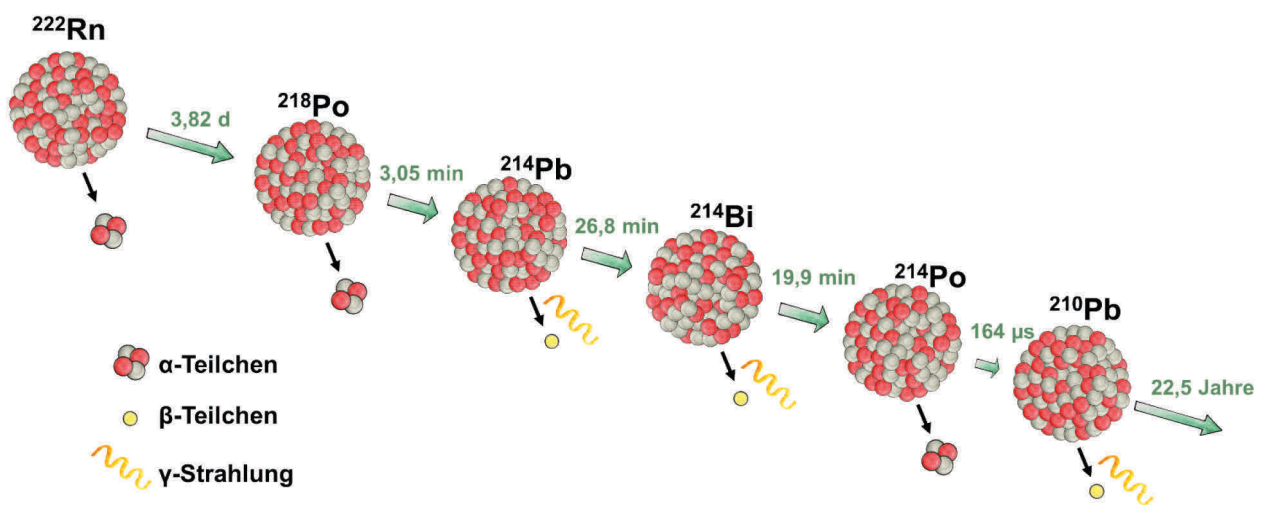


Abbildung 6: Zerfallsreihe von Radon (Rn). Der  $\alpha$ -Zerfall von  $^{222}\text{Rn}$  führt zu  $^{218}\text{Po}$  (Polonium), welches wiederum auch durch einen  $\alpha$ -Zerfall zu  $^{214}\text{Pb}$  (Blei) zerfällt.  $^{214}\text{Pb}$  gibt bei seinem Zerfall zu  $^{214}\text{Bi}$  (Bismut)  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlung ab, genau wie der Zerfall von  $^{214}\text{Bi}$  zu  $^{214}\text{Po}$ . Der  $\alpha$ -Zerfall von  $^{214}\text{Po}$  führt zu dem relativ stabilen  $^{210}\text{Pb}$ , es hat eine Halbwertszeit von 22,5 Jahren. An den Pfeilen sind die freiwerdenden Teilchen und die Halbwertszeit des Ausgangsatoms vermerkt. Bei einem  $\beta$ -Zerfall wird neben dem Elektron oder Positron auch  $\gamma$ -Strahlung in Form von Photonen emittiert.

### 1.5.2. Organotypische Modelle des Lungenepithels

Viele Erkenntnisse im Bereich der Lungenentwicklung, -regeneration und -reparatur wurden am Mausmodell gewonnen. Allerdings gibt es signifikante Unterschiede zwischen den beiden Organismen, welche die Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus der Maus auf den Menschen limitieren [100]–[102]. Die Mauslunge unterscheidet sich makroskopisch in Volumen und Gewicht,

---

dem Durchmesser der Atemwege und der Verknorpelung der Trachea. Zudem sind Atemvolumen und -rhythmus, sowie die Gasaustauschkapazität verschieden [100], [103]. Auf zellulärer Ebene unterscheiden sich humanes und murines Bronchialepithel in der Zellkomposition, den Zellen mit Stammzell- und Vorläuferzeleigenschaften und in der Regulation der Schadensreparatur [17]. Besonders die Immunantwort bei entzündlichen Erkrankungen zeigt wenige Gemeinsamkeiten bei Mensch und Maus [104]. Für die Erforschung von Stammzeleigenschaften ist es von Vorteil auf menschliche Zellen zurückzugreifen, da beim Menschen Basalzellen die vorherrschenden multipotenten Stammzellen sind, während es bei der Maus die Clubzellen sind. Derzeit stehen verschiedene Modellsysteme zur Auswahl.



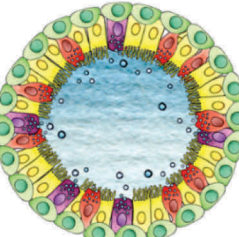
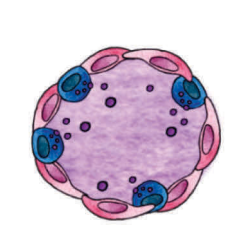
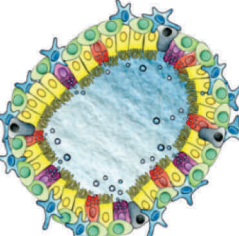
Bei den organotypischen Modellen des Lungenepithels wird zwischen zweidimensionalen (2D) und dreidimensionalen (3D) Modellen unterschieden, welche aus embryonalen Stammzellen, induzierten pluripotenten Stammzellen oder adulten Stammzellen generiert werden können [62].

Ein bereits seit Jahrzehnten etabliertes 2D Modell des Lungenepithels ist die *Air-Liquid interface* (ALI) Kultur (siehe Abbildung 7). Dabei werden die Stammzellen auf einer Membran eines Transwelleinsatzes in einem Well kultiviert und differenziert. Während der Differenzierung bilden sich alle epithelspezifischen Zellen aus und stellen die organotypische Morphologie des Epithels nach, allerdings fehlen Zellen des Mesenchyms. Als einziges Modell bietet es die Interaktion von Umgebungsluft mit dem Epithel. Je nach Ausgangszellen kann sowohl das Bronchial-, das Bronchiolen- oder das Alveolarepithel innerhalb von vier Wochen generiert werden und für etwa sechs Monate erhalten werden. Daher eignet sich dieses Modell sehr gut zur Analyse der Differenzierungseigenschaften der Bronchialepithelzellen, den Einflüssen von Pathogenen und Partikeln der Umgebungsluft auf das Epithel, sowie der MCC [62], [105] und wurde deshalb ausgewählt um die Fragestellungen dieser Arbeit zu erforschen. Um den *in vivo* Zustand besser nachzubilden wird die ALI Kultivierung fortlaufend um lungenspezifische Bestandteile erweitert, zum Beispiel um die Cokultur von Mesenchymzellen [106], die Integration von Immunzellen [107] oder die mechanoelastische Ventilation und basale Blutanalogon Durchströmung [108], [109].


3D Modelle sind zum Beispiel Bronchiosphären und Alveolosphären sind zwar dreidimensionale Gebilde, ihnen fehlt allerdings die synergistische Regulation, da sie nur aus einer Epithelschicht ohne Mesenchym oder Endothel bestehen und damit nicht als Organoide gelten (siehe Abbildung 7). Für ihre Generierung werden Stammzellen in einer extrazellulären Matrix (Matrigel®) kultiviert [110], [111]. Die Basalzellen bilden die äußere Schicht der Bronchiosphären und die Zellen der MCC differenzieren sich in das Innere der Sphäre, wodurch ein kleines Lumen entsteht. Ihre Lebenserwartung ist aufgrund des mangelnden Mukusabbaus auf einige Wochen limitiert. Allerdings sind sie bereits nach zwei Wochen für Medikamentenscreenings und andere Tests nutzbar und die Generierung im großen Maßstab ist möglich [62], [112].





Dreidimensionale Modelle mit synergistischem Zusammenspiel der Zellen der verschiedenen Gewebetypen, dem Mesenchym und Epithel, sowie der extrazellulären Matrix, werden Organoid genannt (siehe Abbildung 7). Bei der Entwicklung in ein vollständiges Organ sind Zellen von der architektonischen Struktur des umliegenden Gewebes abhängig, da sie dadurch Differenzierungsimpulse erhalten [62], [113]. Die Lungenorganoide können über ein Jahr lang in Kultur gehalten werden und dienen beispielsweise der Erforschung von Entwicklungsprozessen, Infektionskrankheiten und Fibrose [62], [114].


	bronchial	alveolar	organo- typisch	einfache Kultivierung	Luft- exposition	Drei- dimensional	extrazelluläre Matrix
ALI Kultur			✓	✓	✓	✗	✗
Sphäre			✓	✓	✗	✓	✗
Organoid			✓	✗	✗	✓	✓


  


 Basalzelle


 Clubzelle

 Becherzelle

 zilientragende Zelle

 neuroendokrine Zelle

 Mesenchym-Zelle

 Pneumozyt Typ 1


 Pneumozyt Typ 2

Abbildung 7: Aufbau der verschiedenen Modelle des Lungenepithels, enthaltene Zelltypen, sowie die wichtigsten Vor- und Nachteile des jeweiligen Modells.

Die Ausgangszellen haben ebenfalls Einfluss auf die Eigenschaften des resultierenden Epithels. Die Verwendung von embryonalen Stammzellen erfordert ein komplexes Differenzierungsprotokoll, dafür können aus den sich unbegrenzt proliferierenden embryonalen Stammzellen immer wieder neue Lungenstammzellen generiert werden. Ebenso können induzierte pluripotente Stammzellen

---

bzw. immortalisierte Lungenstammzelllinien verwendet werden, hier liegt der Vorteil bei der unbegrenzten Proliferation, der guten Reproduzierbarkeit und Charakterisierung der Zellen. Von Nachteil ist, dass sie aufgrund ihres schnellen Wachstums nicht mehr dem Charakter der begrenzt proliferierenden primären Zellen entsprechen. Oft weisen die immortalisierten Lungenzellen ein anderes Transkriptom und Proteom verglichen mit primären Lungenzellen auf und bei der unbegrenzten Proliferation können durch Mutationen leicht Subpopulationen auftreten. [115]. Die primären Stammzellen, welche direkt aus Lungengewebe isoliert werden können, bilden den *in vivo* Zustand am besten ab, da sie die morphologischen und funktionalen Eigenschaften des Spendergewebes konserviert enthalten. Limitierend sind hier die Verfügbarkeit, die interindividuellen Unterschiede der Spender und die begrenzte Anzahl an Zellverdopplungen der Zellen *in vitro* [116], [117]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die primären Stammzellen als Ausgangsmaterial gewählt und wie in den nachfolgenden Kapiteln erläutert, kultiviert und behandelt.

---

## 2. Methoden

---

Alle Methoden wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt und die verwendeten Lösungen ebenfalls auf RT vorgewärmt, soweit nicht explizit anders angegeben. Für alle Experimente an undifferenzierten normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) wurden diese in Passage 3 verwendet. Für die Differenzierung in *Air Liquid Interface* (ALI)-Kultur wurden die NHBE in Passage 2 bestrahlt und anschließend in die ALI Kultur passagiert, sodass sie sich ebenfalls in Passage 3 befanden.

### 2.1. Zellen und Kultivierungsbedingungen

---

NHBE in Passage 1, von zwei männlichen Spendern im Alter von 28 und 29 Jahren ohne bekannte Vorerkrankungen, wurden von Lonza (Basel, Schweiz) kryokonserviert erworben (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften der Spender und der NHBE (aus dem Analysezertifikat von Lonza)

Eigenschaften		Spender 1	Spender 2
Spender	Kennziffer	0000448571	0000493462
	Alter	28 Jahre	29 Jahre
	Geschlecht	Männlich	Männlich
	Ethnie	Kaukasisch	Kaukasisch
	Raucher	nein	nein
Zellen	Viabilität	90 %	90 %
	Aussaateffizienz	60 %	99 %
	Verdopplungszeit	21 h	40 h

#### 2.1.1. Kultivierungsbedingungen der undifferenzierten NHBE

---

Für die Kultivierung als undifferenzierte NHBE wurde PneumaCult™-Ex Plus Medium verwendet, welches nach Herstellerangaben angesetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

#### 2.1.2. Auftauen der Zellen

---

Die in der Kryophiole enthaltenen Zellen wurden im Wasserbad für 2 min bei 37 °C aufgetaut. Die 1,8 ml Zellsuspension wurde in 3,2 ml PneumaCult™-Ex Plus Medium (37 °C) überführt und die Zellviabilität mittels einer 1:2 Verdünnung in 0,1 % Trypanblau am Zellzähler bestimmt. In die Kulturgefäße wurde 1 ml/5 cm<sup>2</sup> PneumaCult™ Ex Plus Medium (37 °C) vorgelegt und anschließend die NHBE mit 5×10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in die vorbereiteten Kulturgefäße ausgesät. Um den Schaden durch

---

das enthaltene DMSO zu minimieren wurde das Medium 16-24 h nach dem Auftauen gewechselt. In der weiteren Kultivierung erfolgte alle zwei Tage ein Medienwechsel.

### **2.1.3. Zellpassage**

---

Um eine irreversible Kontaktinhibition der Zellen untereinander zu verhindern (Lonza Product Document # AA-1004-11 04/12) wurde eine Passage durchgeführt, sobald die NHBE eine Konfluenz von 50-70 % erreichten. Zuerst wurden die Zellen mit 2 ml/25 cm<sup>2</sup> PBS +/- gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 2 ml/25 cm<sup>2</sup> ACF Dissoziationslösung auf die Zellen gegeben und für 7 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Kulturgefäß leicht auf eine harte Oberfläche geklopft um die NHBE abzulösen, dann wurde das Ablösen mit der ACF Inhibitorlösung abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 350 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in etwas PneumaCult™ Ex Plus resuspendiert und die Zellviabilität mittels 0,1 % Trypanblau (siehe Kapitel 2.1.2) bestimmt. Die NHBE wurden mit 5×10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> (vitale Zellen) und 1 ml/5 cm<sup>2</sup> PneumaCult™ Ex Plus ausgesät.

Für alle folgenden Experimente wurden die NHBE in Passage 3 verwendet. Um eine ausreichende Lebenszellzahl und die Regeneration der Zellen nach dem Auftauen zu gewährleisten, wurden die erworbenen NHBE vermehrt und in Passage 2 eingefroren (siehe Kapitel 2.1.4). Aus einer Phiolen konnten so mehrere unterschiedliche Experimente mit den identischen Zellen durchgeführt werden.

### **2.1.4. Kryokonservierung**

---

Da die NHBE nur eine begrenzte Anzahl an Teilungen durchlaufen können und für die Experimente nur Zellen in Passage 2 und 3 benötigt wurden, wurden die NHBE in Passage 2 kryokonserviert. Die NHBE wurden wie für eine Passage dissoziiert und ihre Lebendzellzahl mittels 0,1 % Trypanblau bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3.). Die Zellen wurden in PneumaCult™-Ex Plus Medium mit 10 % (v/v) DMSO auf mindestens 1×10<sup>6</sup> Zellen/ml (vitale Zellen) verdünnt und 1,8 ml Zellsuspension pro Kryophiole aliquotiert. Die Kryophiolen wurden im Mr. Frosty™ Gefrierbehälter über Nacht bei -80 °C mit -1 °C/min eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff zur Lagerung überführt.

### **2.1.5. Differenzierung und Kultivierung der NHBE in der *Air-Liquid-Interface* Kultur**

---

Für die Differenzierung der NHBE wurden die NHBE in Passage 2 in T25 Flaschen ausgesät (siehe Kapitel 2.1.3) und nach zwei bis drei Tagen Kultivierung wurden die Zellen erst bestrahlt (siehe Kapitel 2.2) und anschließend in die Transwelleinsätze einer 12-Well Platte ausgesät. Dazu wurde in jedes Well 1 ml PneumaCult™ Ex Plus Medium vorgelegt. Eine Zellsuspension in Medium mit 2,2×10<sup>5</sup> Zellen/ml wurde angesetzt und pro Einsatz 500 µl ausgesät (1,1×10<sup>5</sup> Zellen/Einsatz). Die NHBE wurden für 2-3 Tage kultiviert (siehe Kapitel 2.1) bis eine Konfluenz von 60-80 % erreicht

---

wurde. Anschließend wurde das Medium aus den Einsätzen entfernt um die Differenzierung der NHBE durch Luftkontakt einzuleiten. Zusätzlich wurde das PneumaCult™ Ex Plus Medium im Well durch PneumaCult™-ALI Medium ersetzt, welches nach Herstellerangaben angesetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und alle zwei Tage ein Medienwechsel durchgeführt.

Der Zeitpunkt zu dem die Luftexposition durch Entfernung des apikalen Mediums erfolgt wird als *Airlift* bezeichnet, auf diesen beziehen sich alle weiteren Zeitangaben der ALI Kultur mit dpa (*days post airlift*). Die Kultivierung in ALI erfolgte bis zu 35 dpa.

Da die Becherzellen und Club-Zellen Glykoproteine sezernierten, deren Abtransport *in vitro* nicht möglich ist, wurde der gebildete Mukus ab 14 dpa alle sieben Tage manuell entfernt. Dazu wurden 500 µl auf 37 °C erwärmtes PBS +/- für einige Minuten auf die ALI Kultur gegeben und anschließend mit einer Aspirationspipette und einer feinen 200 µl Pipettenspitze mittels Vakuum vorsichtig abgesaugt.

## **2.2. Bestrahlung mit ionisierender Strahlung**

---

An dem GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung stehen verschiedene Bestrahlungsmöglichkeiten zur Verfügung, welche nachfolgend spezifiziert werden. Alle Bestrahlungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in der exponentiellen Phase des Zellwachstums durchgeführt, also 48 h – 55 h nach der Passage in Passage 3.

### **2.2.1. Bestrahlung mit Röntgenstrahlung**

---

Die Bestrahlung der NHBE mit Röntgenstrahlung erfolgte an einer MXR 320 / 26 Röntgenröhre von Seifert bei 250 kV und 16 mA (Filter: 3 mm Berylliumglas, 1 mm Aluminium und 1 mm Kupfer). Die Dosisrate betrug 2,7 Gy/min. Die Dosis wurde mit einem SN4 Dosimeter während den Bestrahlungen gemessen. Direkt nach der Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

### **2.2.2. Bestrahlung mit α-Strahlung**

---

Die Bestrahlung mit α-Partikeln erfolgte an einer Americium-Quelle (<sup>241</sup>Am). Diese emittiert α-Partikel mit einer Energie von 5,486 MeV, was der Energie der im Radonzerfall (<sup>222</sup>Rn) entstehenden α-Partikel von 5,489 MeV entspricht [118]. Aufgrund der sehr geringen Reichweite der α-Partikel wurden dafür die NHBE auf 4 µm dünner, plasmabehandelte, biaxial orientierter Polyethylenterephthalat (boPET)-Folie (Max-Planck Institut, Halle) in Metallringen aus rostfreiem Stahl, im weiteren α-Ringe genannt, kultiviert (siehe Kapitel 2.1.1).

## Vorbereitung der $\alpha$ -Ringe

Zum Anbringen der plasmabehandelten boPET-Folie auf die  $\alpha$ -Ringe (Innendurchmesser 35 mm) wurde die Folie mit doppelseitigem Klebeband mit der beschichteten Seite nach unten auf Kupferringe (Innendurchmesser 65 mm) geklebt (siehe Abbildung 8 (A)). Die Unterseite der  $\alpha$ -Ringe wurde dünn mit Zwei-Komponenten-Epoxidkleber (UHU® Plus Endfest) benetzt. Anschließend wurde der Kupferring mit Folie auf den  $\alpha$ -Ring gesetzt, sodass die plasmabehandelte Seite der Folie ins Innere des  $\alpha$ -Rings zeigt. Diese Konstruktion wurde dann für 45 min bei 80 °C gehärtet. Nach dem Abkühlen wurde die über den äußeren Rand des  $\alpha$ -Rings ragende Folie samt Kupferring mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Vor dem Einsatz in der Kultivierung (siehe Abbildung 8 (B)) wurden die  $\alpha$ -Ringe autoklaviert.

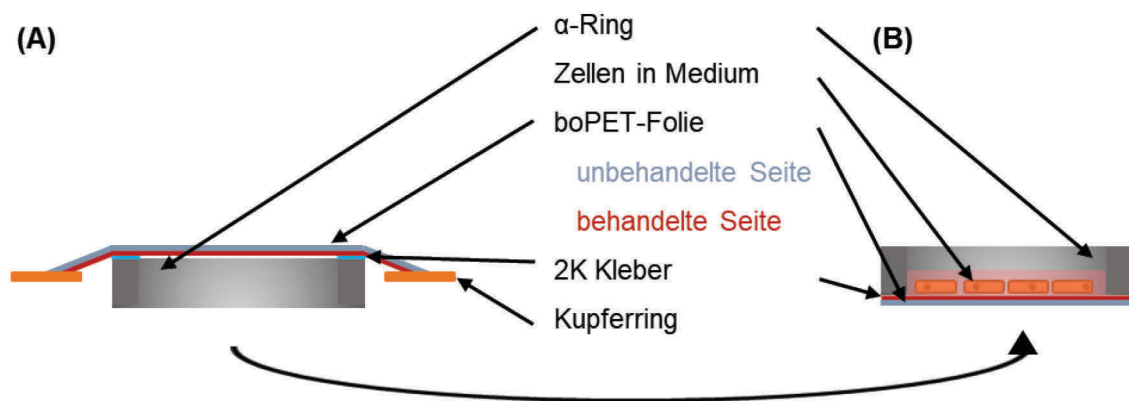


Abbildung 8: (A) Querschnitt der Konstruktion zum faltenfreien kleben der boPET-Folie in einen  $\alpha$ -Ring. Der Kupferring zieht aufgrund der Schwerkraft die Folie glatt, welche mit der behandelten Seite (rot) ins Innere des  $\alpha$ -Rings zeigt. (B) Querschnitt des fertigen  $\alpha$ -Rings inklusive Zellen.

## Bestrahlung

Die Form der  $\alpha$ -Ringe und die boPET Folie ermöglichen eine Positionierung der Zellschicht im Abstand von nur 2,7 mm über der Americium-Quelle (siehe Abbildung 9 (A)) wie bei (Maier et al. 2019) beschrieben. Die Dosisrate betrug  $8,2 \pm 2,4$  Gy/min. Die applizierte Dosis wurde über die Expositionszeit bestimmt, welche durch einen mechanischen Shutter über der Americium-Quelle geregelt wurde (siehe Abbildung 9 (A und B)).

Bei diesem Versuchsaufbau haben die  $\alpha$ -Partikel, welche die NHBE erreichen, noch eine Energie von 4,05 MeV und einen LET von  $153 \pm 45$  keV/ $\mu$ m. Der Energieverlust ist der Goldbeschichtung der Americium-Quelle, den 2,7 mm Luft und der boPET-Folie geschuldet [41].

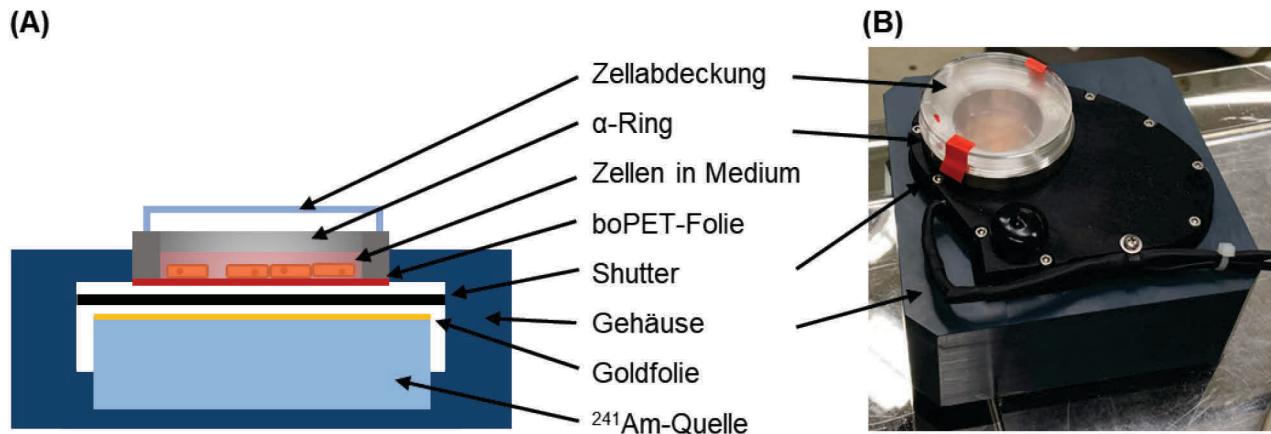


Abbildung 9: (A) Schematischer Versuchsaufbau für die Bestrahlung an der Americium-Quelle. (B) Versuchsaufbau mit geöffnetem Shutter und eingelegtem α-Ring. Der α-Ring ist mit einem Petrischalendeckel (Durchmesser 6 cm) abgedeckt, um die NHBE steril zu halten. Durch die boPET-Folie und die Zellen ist die Goldbeschichtung der Americium-Quelle zu sehen.

## 2.3. Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen in einer NHBE Kultur wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Dazu wurden die Zellen in T25 Flaschen kultiviert (siehe Kapitel 2.1.1). Für die Fixierung nach 0; 2; 4; 6; 8; 10 und 12 h wurden die Zellen von der Kulturfläche mittels des ACF Dissoziations-Kits abgelöst, vereinzelt und in ein 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt (siehe Kapitel 2.1.3). Die Zellsuspension wurde mit PBS -/- gewaschen und für 5 min bei 350×g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml 70%igem Ethanol gründlich resuspendiert und für mindestens 1 h bei 4 °C fixiert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 850×g zentrifugiert und zweimal mit je 5 ml PBS -/- gewaschen und jeweils für 5 min bei 850×g zentrifugiert. Für die DNS-Färbung wurden die Zellen in 1000 µl PBS -/- resuspendiert und anschließend mit 25 µl RNase A (200 µg/ml) und 100 µl Propidiumiodid (PI) (100 µg/ml) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunklen wurden der DNS-Gehalt der Zellen mit dem BD FACSanto II Durchflusszytometer mit der Software BD FACSDiva™ v1.49 gemessen. Für die Detektion des PI wurde der blaue 488 nm Laser in Kombination mit den Detektoren PE 585/42BP und PerpCp 670LP verwendet. Das Signal eines einzeln gemessenen Ereignisses, welches den Laser passierte, wurde als integrierte Fläche gemessen und in Histogrammen oder Punktplots dargestellt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zum DNS-Gehalt des Nukleus einer Zelle. Die Software FlowJo wurde zur Auswertung der gemessenen Daten verwendet.

## 2.4. Wachstumskurve

Für die Bestimmung der Verdopplungszeit ( $t_d$ ) der NHBE wurde eine Wachstumskurve erstellt. Dazu wurden acht Petrischalen (Durchmesser 30 mm) mit je 48.000 lebenden Zellen in Passage 3

inokuliert (siehe Kapitel 2.1.3). 24; 48; 72 und 96 h nach der Aussaat wurde die Lebendzellzahl von je zwei Petrischalen bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3) und der Mittelwert gebildet.

Die relative Zellzahl (N) pro Zeitpunkt (t) wurde nach Gleichung (1) bestimmt. Darin ist  $N_t$  der Entnahmezeitpunkt und  $N_0$  der Aussaatzeitpunkt.

$$N = \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

Die relative Zellzahl wurde über der Zeit aufgetragen, sodass der Zeitraum der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt werden kann. Aus diesen Zeitpunkten wurde der Logarithmus berechnet und linear über der Zeit aufgetragen. Aus einer linearen Regression (lineare Ansatzfunktion) wurde der Wachstumskoeffizient k über die Geradensteigung bestimmt. Durch Division von  $\ln(2)$  durch k erhielt man die Verdopplungszeit  $t_d$  der NHBE (siehe Gleichung (2)).

$$t_d = \left( \frac{\ln(2)}{k} \right) \quad (2)$$

## 2.5. Quantifizierung des Zellüberlebens

### 2.5.1. Überlebenskurve

Zur Ermittlung der strahleninduzierten Reduktion der Teilungsfähigkeit wird der Koloniebildungstest verwendet. Dazu wurden undifferenzierte NHBE in Passage 3 in die entsprechenden Kulturgefäße (siehe Tabelle 2) mit  $5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Pro Dosis wurde ein Kulturgefäß inokuliert (siehe Tabelle 3) und für die Kontrolle wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Bestrahlung fand an Tag 3 nach der Aussaat statt (siehe Kapitel 2.2).

Tabelle 2: Verwendete Kulturgefäße für die Überlebenskurve mit verschiedenen Strahlenqualitäten

Strahlenqualität	Kulturgefäß	Volumen PBS und ACF
Röntgenstrahlung	T12,5	1 ml
$\alpha$ -Partikel (Americiumquelle)	$\alpha$ -Ring mit O <sub>2</sub> geätzter Mylar-Folie (Innendurchmesser 3,5 cm)	1 ml

30-60 min nach der Bestrahlung wurden die NHBE passagiert (siehe Kapitel 2.1.3). Pro Dosis wurden 3 T25 Flaschen mit je 5 ml PneumaCult™ Ex Plus Medium angesetzt und der entsprechenden Zellzahl (siehe Tabelle 3) angeimpft. Die Zellen wurden für fünf Tage unter normalen Kulturbedingungen (siehe Kapitel 2.1.1), ohne Medienwechsel, kultiviert.



Tabelle 3: Dosen und Zellzahlen für die unterschiedlichen Strahlenqualitäten

Dosis [Gy]	Zellen pro T25 Flasche	
	Röntgen	α-Partikel
Kontrolle	500	500
0,25		500
0,50	500	800
1,00	800	1500
1,50	1100	2500
2,00	1500	
3,00	2500	
4,00	4000	
5,00	5000	

Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 3 ml Methylenblau (siehe Tabelle 4) für 15 min fixiert und gefärbt. Im Anschluss wurde die Methylenblaulösung abgesaugt und die Flaschen über Nacht getrocknet. Die Auswertung erfolgte am Binokular, eine Zellansammlung von mindestens 50 Zellen wurde als Kolonie gezählt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der 1×Methylenblau Lösung in Millipore Wasser

Substanz	Konzentration
Löfflers Methylenblau Lösung	10 %
Natriumhydroxid	25 mM
MeOH	5 %

Zur Bestimmung des Zellüberlebens wurde zuerst aus den Kontrollen die Plattierungseffizienz (PE) berechnet (siehe Gleichung (3)). Dazu wurde die Anzahl der gezählten Kolonien durch die Anzahl der zu Beginn ausgesäten Zellen pro Flasche geteilt und mit 100 multipliziert.

$$PE = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}} \times 100 \quad (3)$$

Mit der PE wurde nun die Überlebenden Fraktion (ÜF) der bestrahlten Kulturen bestimmt (siehe Gleichung (4)). Hierzu wurde der Quotient aus Anzahl der gezählten Kolonien durch das Produkt aus Anzahl der ausgesäten Zellen mit PE durch 100 multipliziert.

$$ÜF = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} \times \left(\frac{PE}{100}\right)} \quad (4)$$

Die Daten wurden halblogarithmisch aufgetragen, die logarithmische Y-Achse stellt die ÜF dar, während die Dosis linear auf der x-Achse aufgetragen wurde. Mit Hilfe des Fits nach dem linear-quadratischen Modell (siehe Gleichung (5)) wurde die Überlebenskurve erstellt. Aus dieser ergeben

---

sich ein  $\alpha$ -Wert für den linearen Abschnitt der Kurve und ein  $\beta$ -Wert für den quadratischen Abschnitt. Um die Isoeffektdosis zu ermitteln wird das linear-quadratische Modell nach der Dosis umgestellt und für beide Strahlungsarten separat berechnet.

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (5)$$

Um die relative biologische Wirksamkeit der  $\alpha$ -Partikel im Vergleich zur Röntgenstrahlung zu ermitteln, wird die Dosis der beiden Strahlungsarten bei gleichem biologischem Effekt, dem Isoeffekt, in ein Verhältnis gesetzt (siehe Gleichung (6)).

$$RBW_{\alpha\text{-Partikel}} = \frac{D_{\text{Röntgen}}}{D_{\alpha\text{-Partikel}}} \Big|_{\text{Isoeffekt}} \quad (6)$$

### 2.5.2. Apoptose Färbung

---

Die Apoptose- Färbung markiert apoptotische Zellen anhand ihrer Caspase 3 und 7 Aktivität. Da die apoptotischen NHBE sich schnell ablösen, wurde eine Apoptose Färbung ausgewählt, welche keine Waschschrte benötigt, das CellEvent™ Caspase-3/7 Green ReadyProbes™ Reagenz (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten). Die Apoptose Färbung wurde 24 h nach Bestrahlung wie folgt durchgeführt: Zuerst wurde ein Tropfen des Reagenzes pro Milliliter Medium zugegeben und die Zellen für 30 min standardmäßig kultiviert (siehe Kapitel 2.1). Anschließend wurden 0,5  $\mu$ l 1 mg/ml Hoechst 33342 in das Medium gegeben, um die Zellkerne anzufärben und 15 min später wurden die Färbungen am Hybrid Mikroskop REVOLVE 3M überprüft. Um auch die abgelösten apoptotischen Zellen aufnehmen zu können, wurde diesen Zeit zum Absinken in die Bildebene gegeben. Daran anschließend wurden für die Auswertung 5-10 Fotos der Kulturen bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen und mittels der ECHO Pro App (DISCOVER ECHO, San Diego, California, Vereinigte Staaten) mindestens 1000 Zellen pro Dosis ausgewertet. Grün fluoreszierende, also Caspase 3/7-positive Zellen, wurden als Apoptose-positiv gezählt. Der Apoptose-Index (AI) wurde aus der Anzahl an Apoptose-positiven Zellen geteilt durch die Gesamtzellzahl multipliziert mit 100% berechnet (siehe Gleichung (7)).

$$AI = \frac{\text{Apoptose - positive Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100\% \quad (7)$$

### 2.6. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

---

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) dient der Quantifizierung von einer bestimmten cDNS-Sequenz in einem cDNS Sequenzengemisch, welches mittels reverser Transkriptase aus dem Transkriptom von Zellen erstellt wird. Der DNS Gehalt wird durch einen DNS-Farbstoff in Echtzeit quantifiziert und dadurch können Rückschlüsse auf das Expressionslevel der mRNS dieser Zielsequenz gezogen werden [119].

---

## 2.6.1. RNS Isolierungen

---

### 2.6.1.1. RNS Proben von undifferenzierten NHBE

---

RNS Proben wurden von undifferenzierten NHBE 24 und 120 h nach der Bestrahlung genommen, um etwa eine Million Zellen zu erhalten reichte 24 h nach Bestrahlung eine T12,5 Flasche, während 120 h nach Bestrahlung eine T25 Flasche benötigt wurde. Die Zellen wurden wie bei der Passage dissoziiert (siehe Kapitel 2.1.3). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 700 µl QIAzol Lyse Reagenz gelöst und die Proben bei -80 °C gelagert. Die Isolation wurde mittels RNeasy MiniKit von QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNS wurde in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst und der RNS Gehalt mittels Nanophotometer gemessen. Die Reinheit der Probe wurde spektroskopisch überprüft, Proben mit einem  $A_{260/280}$ -Wert von 1,8 bis 2,0 wurden für die Analysen verwendet. Die Lagerung der RNS Proben fand bei -80 °C statt.

### 2.6.1.2. RNS Proben von ALI Kulturen

---

Für die RNS Analyse von differenzierten NHBE wurden 7; 14; 21; 28 und 35 Tage nach dem Airlift die Zellen aus je zwei Inserts verwendet. Dazu wurde in jedes Insert 500 µl PBS +/- gegeben, die Zellen mit einer 1000 µl Pipettenspitze von der Membran geschabt und kräftig resuspendiert. Die Zellsuspensionen beider Inserts wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gepoolt und 5 min bei 350 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 700 µl QIAzol gelöst. Des Weiteren wurde wie mit den RNS Proben der undifferenzierten NHBE verfahren (siehe Kapitel 2.6.1.1.).

## 2.6.2. Reverse Transkription zur cDNS Synthese

---

Die isolierte RNS wurde nach Herstellerangaben mit dem RevertAid RT Kit im PCR Thermal Cycler Pqstar in cDNS transkribiert. Es wurden jeweils 2 ng RNS eingesetzt. Die Lagerung der gewonnenen cDNS fand bei -20 °C statt.

## 2.6.3. Quantitative *real-time* PCR

---

Die qRT-PCR wurde mit dem Quant Studio 3 durchgeführt (siehe Tabelle 5). Hier wurden die komparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) Methode und die Schmelzkurvenanalyse zur Analyse der relativen Änderungen der Genexpression angewandt. Für die  $\Delta\Delta C_T$  wurde eine endogene Referenzsequenz, die in allen Proben gleichmäßig exprimiert wird, benötigt. Auf die Expression der Referenzsequenz wurde die Expression der Markersequenzen normiert. Für die NHBE wurde RPLPO1 als geeignete Referenzsequenz ermittelt (siehe Anhang). Die oft genutzten Referenzsequenzen 18S RNA und GAPDH [18], [120] wurden auf Grund von einer veränderten Expression in den NHBE beider

Spender, 24 h nach Bestrahlung mit 0,5; 1; 2 und 4 Gy Röntgenstrahlung nicht verwendet. Jede Probe wurde im technischen Triplikат gemessen.

Tabelle 5: PRC Programm

Schritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]	
Initiale Denaturierung	900	95	
Denaturierung	15	95	PCR Phase – 45 Zyklen
Hybridisierung	20	60	
Elongation	20	72	
Hybridisierung	15	95	Schmelzkurvenbestimmung
Elongation	60	60	
Finale Denaturierung	1	95	

## 2.7. Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurden in den NHBE und in Kryoschnitten des Bronchialepithels die verschiedenen Zelltypen identifiziert. Sowie in den undifferenzierten NHBE anhand von EdU, BrdU und Ki67 proliferierende Zellen markiert, ebenso die autophagischen Vesikel mit LC3B angefärbt.

### 2.7.1. Fixierung und Vorbereitung der Zellen

#### 2.7.1.1. Fixierung der NHBE

Zum Fixieren der NHBE wurde das Medium abgenommen und die Zellen anschließend für 10 min mit 3,7 % PFA in PBS -/- fixiert. Anschließend wurde einmal mit PBS -/- gewaschen und die Zellen bis zur Immunfluoreszenzfärbung (IF) bei 4 °C in PBS -/- gelagert.

#### 2.7.1.2. Fixierung und Anfertigung von Kryoschnitten des bronchialen Epithels

Das Bronchialepithel wurde im Transwelleinsatz fixiert. Dazu wurde das Medium aus dem Well entfernt und je 1 ml 3,7% PFA in PBS -/- für 15 min in das Well und den Einsatz gegeben. Die Zellen wurden für mindestens 5 min in PBS -/- gewaschen und bis zum Einbetten in das Einbettmedium in PBS -/- bei 4 °C gelagert. Zum Einbetten wurde eine Petrischale (Durchmesser 3 cm) auf Trockeneis gestellt und ein großer Tropfen Einbettmedium in die Petrischale gegeben. Wenn der Tropfen anfang einzufrieren, wurde mit einem Skalpell vorsichtig die Membran samt Epithel aus dem Transwelleinsatz geschnitten und mit der apikalen Seite auf den Tropfen Einbettmedium gelegt. Anschließend wurde die Membran mit einer Schicht Einbettmedium überzogen. War das Medium inklusive Epithel gefroren, wurde die Probe bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden am Kryostaten

---

bei -24 °C in 4 µm dünne Scheiben geschnitten. Mehrere Schnitte wurden auf einen Superfrost Plus Objektträger gegeben und bis zur Immunfluoreszenzfärbung (IF) bei -20 °C gelagert. Für die IF wurden die Schnitte aufgetaut, getrocknet und mit einem Fettstift umrandet.

### 2.7.2. Permeabilisieren und Blockieren

---

Die fixierten Zellen oder Schnitte wurden für 5 min mit PBS -/- gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte für 20 min mit 0,5 % Triton X und 1 % BSA in PBS -/-. Anschließend wurde für 60 min mit der Blocklösung (siehe Tabelle 6) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen in der Probe zu blockieren.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Blocklösung in PBS -/-

Substanz	Konzentration
BSA	1 %
Ziegenserum	10 %
Tween 20	1%
Glycin	0,3 M

### 2.7.3. Immunfluoreszenzfärbung

---

#### 2.7.3.1. Immunfluoreszenzfärbung mit unkonjugierten Antikörpern

---

Der primäre Antikörper ZO1 (BD Biosciences 610966) wurde 1:150 in Blocklösung (siehe Tabelle 6) verdünnt. Pro Probe wurden 50 µl Antikörper verwendet und über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS -/- gewaschen. Die Markierung mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 60 min im Dunklen, dazu wurde der Alexa Fluor® 488 markierte Anti-Maus Antikörper 1:300 in Blocklösung verdünnt. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit PBS -/- gewaschen. Für die Nukleusfärbung wurde mit 1,5 mg/ml DAPI für 15 min im Dunklen gefärbt. Dann wurde einmal mit PBS -/- und einmal mit entionisiertem Wasser gewaschen. Zum Abschluss wurden die Zellen mit Mounting Medium und Deckglas eingedeckt. Die Lagerung der gefärbten Objekte erfolgte bei 4 °C im Dunklen.

#### 2.7.3.2. Immunfluoreszenzfärbung mit konjugierten Antikörpern

---

Die konjugierten Antikörper wurden wie benötigt (siehe Tabelle 7) in Blocklösung (siehe Tabelle 1) verdünnt. Pro Probe wurden 30 µl auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert mit Ausnahme des Ki67 Antikörpers, hier wurde nur für 90 min bei RT im Dunklen inkubiert. Danach wurde dreimal für je 5 min mit PBS -/- gewaschen und anschließend mit 1,5 mg/ml DAPI für 15 min im Dunklen gegengefärbt. Anschließend wurde einmal mit PBS -/- und einmal mit

entionisiertem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit Mounting Medium und Deckglas eingedeckt. Die Lagerung der gefärbten Objekte erfolgte bei 4 °C im Dunklen.

Tabelle 7: Konjugierte Antikörper für die immunzytochemische Analyse.

Antigen	Zielobjekt	Fluorochrom	Verdünnung
β-Tubulin IV	Zilientragende Zellen	Alexa Fluor® 647	1:75
KRT5	Basalzellen	Alexa Fluor® 488	1:240
Ki67	Proliferierende Zellen	Alexa Fluor® 594	1:50
LC3B	Autophagische Vesikel	Alexa Fluor® 647	1:800
MoBU-1	BrdU	Alexa Fluor® 647	1:30
MUC5AC	Becherzellen	Alexa Fluor® 555	1:30
SCGB1A1 (CC10)	Clubzellen	Alexa Fluor® 594	1:100

Ki67 ist ein Proliferationsmarker. Da es in allen Zellzyklusphasen, außer der G0 Phase im Zellkern exprimiert wird [121]. Zur Bestimmung des Proliferations-Index (PI) wurden die NHBE mit Ki67 gefärbt und die Anzahl Ki67-positiver Zellen durch die Gesamtzellzahl geteilt und mit 100 % multipliziert (siehe Gleichung (8)).

$$PI = \frac{\text{Ki67 – positive Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100\% \quad (8)$$

## 2.8. Bestimmung der Zellzykluslänge mittels Kofärbung von EdU, BrdU und Ki67

Da die Zellzykluskinetik eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung sowie dem Zellschicksal spielt, aber auch die Reaktionen auf interne und externe Reize stark von der Zellzyklusphase abhängig sind, wurde die Zellzykluslänge der NHBE bestimmt [122]. Dazu wurden Zellen (Passage 3) in Kammer-Objektträger ausgesät (siehe Kapitel 2.1.3) und 48 h nach Aussaat, also in der exponentiellen Phase, gefärbt. Dazu wurde die Hälfte des Mediums durch frisches 37 °C temperiertes PneumaCult ExPlus mit 40 µM EdU ersetzt, sodass die finale EdU Konzentration im Medium der NHBE 20 µM betrug, und die Zellen für 60 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zusätzlich 15 µl BrdU (1 mM) in das Medium gegeben und die Zellen für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal für je 2 min mit PBS -/- gewaschen und im Anschluss für 15 min mit 3,7% PFA in PBS -/- fixiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS -/- gewaschen und bis zur Färbung in PBS -/- bei 4 °C im Dunklen gelagert.

Für die EdU Markierung wurde das Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 488 Dye Kit von Invitrogen verwendet, das Herstellerprotokoll wurde um die für die BrdU und Ki67 Antikörperfärbung nötigen Schritte wie folgt ergänzt:

Zu Beginn wurden die NHBE für 20 min mit 0,1 % Triton X in PBS-/- permeabilisiert. Damit der BrdU Antikörper an das BrdU binden kann, wurde die DNA der NHBE anschließend 20 min in 4 M HCl denaturiert. Im Anschluss wurden die Zellen 10 min mit Phosphat-Zitronensäure Puffer (pH 7,4) neutralisiert. Danach wurden die Zellen dreimal für je 2 min mit 0,1 % Triton X und 3 % BSA in PBS -/- gewaschen. 500 µl EdU Reaktionsmix (siehe Tabelle 8) wurden auf die Zellen gegeben und die Inkubation erfolgte für 30 min im Dunklen.

Tabelle 8: Zusammensetzung des EdU Reaktionsmixes für eine Probe. Die Substanzen müssen in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert werden und die fertige Mixtur muss innerhalb von 15 min verwendet werden. Das finale Volumen beträgt 500 µl.

Volumen [µl]	Lösung
440	1× Click it Reaktionspuffer
10	CuSO <sub>4</sub> (100 mM)
1,2	Alexa 488 Lösung
50	1×Reaktionspuffer Additiv (frisch aus 10× Reaktionspuffer Additiv und Reinstwasser angesetzt)

Anschließend wurden die NHBE mit 0,1% Triton X und 3% BSA in PBS -/- gewaschen. Für die Antikörperfärbung wurden je 1 µl MoBu-1 (BrdU) und Ki67 Antikörper (siehe Tabelle 7) in 28 µl Blocklösung (siehe Tabelle 6) gelöst und mit dieser die Zellen für 1 h im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 0,1% Triton X und 3% BSA in PBS -/- und zur Kristallentfernung nochmal für 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgte für 30 min im Dunklen mit 0,5 µM Hoechst 33342. Die NHBE wurden abschließend mit PBS -/- gewaschen, der Kammeraufsatz von dem Objektträger entfernt und die Zellen mit Mounting Medium und Deckglas eingedeckt. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C im Dunklen. Die Analyse erfolgte an dem Hybrid Fluoreszenzmikroskop REVOLVE M3 mit der Software ECHO Pro. Dazu wurden pro Dosis 20 Ausschnitte bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen um etwa 500 Zellen auswerten zu können.

Die Berechnung der Zellzykluslänge erfolgte nach [123]. Dazu wurden die Gesamtzellzahl und die Anzahl an EdU und BrdU doppelt-positiven Zellen (EdU+BrdU<sup>+</sup>), der EdU positiven und gleichzeitig BrdU negativen (EdU+BrdU<sup>-</sup>), der BrdU negativen (BrdU<sup>-</sup>), der BrdU-positiven (BrdU<sup>+</sup>) und Ki67-positiven Zellen (Ki67<sup>+</sup>) bestimmt.

Zur Berechnung der Dauer der S-Phase (T<sub>S</sub>) (siehe Gleichung (9)) wurde die Dauer (in h) der reinen EdU-Gabe mit der Anzahl an EdU und BrdU doppelt-positiven Zellen geteilt durch die EdU-positiven und BrdU-negativen Zellen multipliziert.

$$T_S = T_{EdU} \times \left( \frac{EdU^+BrdU^+}{EdU^+BrdU^-} \right) \quad (9)$$

---

Mit der Dauer der S-Phase wurde anschließend die Dauer des gesamten Zellzyklus ( $T_C$ ) ermittelt (siehe Gleichung (10)). Dazu wurde die Dauer der S-Phase durch die Anzahl an BrdU-positiven durch die Anzahl der BrdU-negativen Zellen geteilt.

$$T_C = \frac{T_S}{\left(\frac{BrdU^+}{BrdU^-}\right)} \quad (10)$$

Bei dieser Rechnung wurden alle Zellen, also auch die nicht teilungsfähigen, miteinbezogen, ansonsten wird die Dauer des Zellzyklus überschätzt. Um sich nur auf die teilungsfähigen Zellen zu beziehen, wurde der Wachstumsfaktor (WF) der Kultur bestimmt (siehe Gleichung (11)). Dazu wurde die Anzahl an Ki67-positiven Zellen durch die Gesamtzellzahl geteilt.

$$WF = \frac{Ki67^+}{Gesamtzellzahl} \quad (11)$$

Wird die Gleichung für die Dauer des Zellzyklus um den Wachstumsfaktor ergänzt (siehe Gleichung (12)), basiert die Analyse der Zellzykluslänge auf den proliferierenden Zellen. Dazu wurde die Dauer der S-Phase durch die Anzahl an BrdU-positiven durch die mit dem Wachstumsfaktor multiplizierte Anzahl der BrdU-negativen Zellen geteilt.

$$T_C = \frac{T_S}{\left(\frac{BrdU^+}{BrdU^- \times WF}\right)} \quad (12)$$

## 2.9. Video-basierte Analyse des mukoziliären Transports

---

Der mukoziliäre Transport ist eine der wichtigsten Funktionen des Bronchialepithels, der Transport wurde mittels zugegebenen Mikrosphären (Tracerpartikel) unter dem Mikroskop sichtbar. Die Videoanalyse des mukoziliären Transports der vollständig differenzierten Bronchialepithelien wurde 35 Tage nach dem *Airlift* durchgeführt. Dazu wurde zuerst die Mukusschicht entfernt um möglichst nur Bewegungen auf einer Ebene, der der Bronchialepitheloberfläche, zu generieren. Hierzu wurde das Epithel für 5 min mit 500  $\mu$ l 5 mM DTT in PBS -/- inkubiert [35]. DTT löst die Disulfidbrücken zwischen den Muzinen ohne einen Einfluss auf den Zilienschlag zu haben [124]. Da DTT cytotoxisch wirkt, wurde im Anschluss fünfmal mit je 500  $\mu$ l PBS -/- gewaschen. Dann wurden 20  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung Fluobeads (Durchmesser 3  $\mu$ m) auf das Epithel gegeben und dieses für 15 min im Inkubator bei 37 °C (siehe Kapitel 2.1) inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf RT abgekühlt und Videos an einem EVOLVE 3M Mikroskop invers und im FITC Kanal bei 5-facher Vergrößerung aufgenommen (siehe Abbildung 10 (A)). Pro Dosis wurden zwei Transwelleinsätze verwendet und das Epithel jeweils für 2 min in der linken Peripherie, dem Zentrum und der rechten Peripherie des Transwelleinsätzen aufgenommen. Daraus ergeben sich pro Dosis sechs Aufnahmen. Die Analyse, Quantifizierung und Bewertung der Videos erfolgte mit der an der GSI entwickelten Software ImageD [125].



Die Software identifiziert Bewegungen der Mikrosphären über die Zeit und ermittelt daraus die mittlere Geschwindigkeit, die mittlere Winkelgeschwindigkeit und den Grad der gerichteten Bewegung aller Sphären innerhalb des Videos. Da die MCC in Wirbeln organisiert ist, hängt die lineare Geschwindigkeit stark von der Position des Videoausschnitts im Wirbel ab. Je weiter der Ausschnitt von dem Wirbelzentrum entfernt ist, desto höher ist die Geschwindigkeit [35], [37]. Deshalb wurde neben der linearen Geschwindigkeit auch die Winkelgeschwindigkeit bestimmt, da diese aber nur aussagekräftig ist, wenn das Wirbelzentrum korrekt lokalisiert werden kann, wurden Aufnahmen mit unrealistischem, also falsch ermitteltem, Wirbelzentrum aus der Berechnung ausgeschlossen. Der Grad an gerichteter Bewegung wird durch die Winkelabweichung der Bewegungsrichtungen der Sphären innerhalb eines Videos ermittelt. Zum derzeitigen Stand der Software, funktioniert dies nur bei linearen Bewegungen. Kreisförmige Bewegungen werden trotz hohem Maß an Koordination, durch die verschiedenen Winkel innerhalb des Videos als unkoordiniert erfasst. Eine Optimierung des Algorithmus zur Erkennung der Koordination soll durch die Ermittlung der Form der Bahn ergänzt werden und anschließend die Abweichung der Sphären zu dieser Form errechnet werden.

Zusätzlich wird eine Projektion aller Einzelbilder des Videos erstellt, das heißt die Zeitachse wird entfernt und alle Bilder des Videos so übereinandergelegt, sodass die zurückgelegte Wegstrecke der Sphären als Bahnverlauf erkennbar wird (siehe Abbildung 10 (B)).

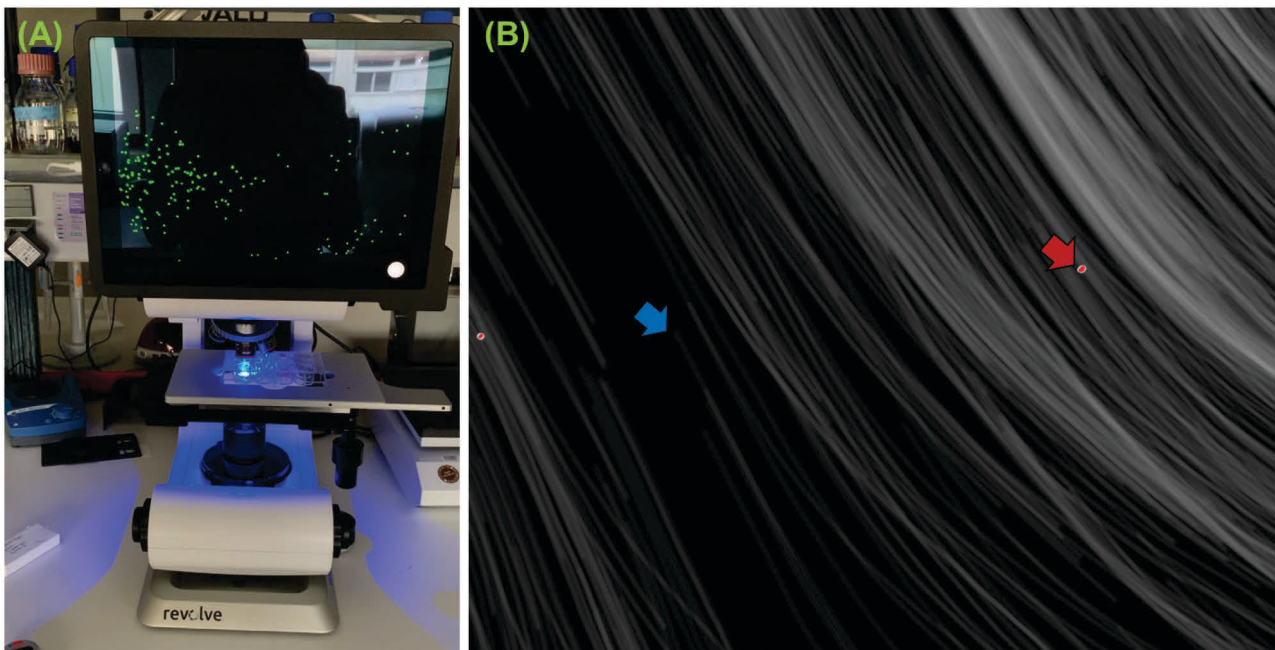


Abbildung 10: (A) Versuchsaufbau für die Aufnahme der Videos. (B) Stack eines Videos, jede helle Linie (blauer Pfeil) entspricht der Bahn einer Sphäre. Je heller eine Bahn ist, desto öfter ist an dieser Stelle eine Sphäre entlang transportiert worden. Mikrosphären, die sich während der gesamten Aufnahme nicht bewegt haben, sind rot markiert (roter Pfeil).

## 2.10. Transepithelialer elektrischer Widerstand

Um die Integrität des Epithels zu verifizieren wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) 35 Tage nach dem *Airlift* mit dem EVOM3 und der Messkammer EndOhm-12G gemessen. Pro Dosis wurde der TEER von je zwei Epithelien gemessen. Hierzu wurde der Transwelleinsatz mit Epithel an der basalen Seite mit PBS -/- gewaschen um Mediumreste zu entfernen, welche den Widerstand der Elektrolytlösung (PBS -/-) beeinflussen würden. Anschließend wurde der Transwelleinsatz in die mit 3,5 ml PBS -/- gefüllte EndOhm-12G Kammer eingesetzt und der Einsatz mit 500 µl PBS -/- gefüllt (siehe Abbildung 11). 10 min nach Equibrilierung wurde der TEER gemessen.

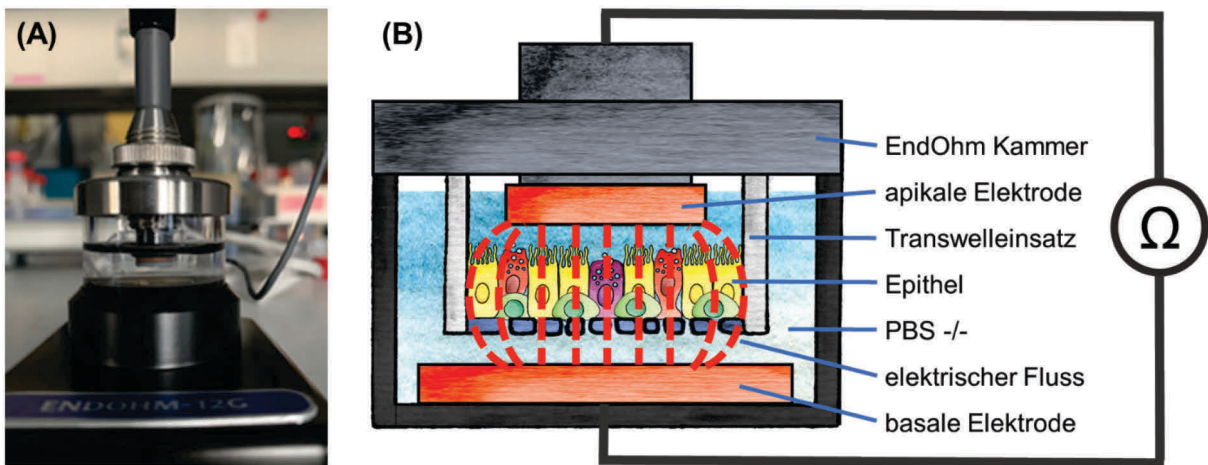


Abbildung 11: (A) Aufbau der TEER Messung in der EndOhm-12-G Kammer, (B) Schematischer Aufbau für die Messung und Darstellung des elektrischen Flusses über das Epithel im Transwelleinsatz für die Messung des TEERs.

Der TEER Wert gibt den Widerstand pro  $\text{cm}^2$  an ( $R_{\text{total}}$ ), daher wurde zuerst der Widerstand eines leeren Einsatzes ( $R_{\text{Blank}}$ ) abgezogen und der neue Wert auf die Fläche des Transwelleinsatzes von  $1,13 \text{ cm}^2$  hochgerechnet (siehe Gleichung(13)).

$$R_{\text{Epithel}} = (R_{\text{total}} - R_{\text{Blank}}) \times 1,13 \text{ cm}^2 \quad (13)$$

## 2.11. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Daten wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt, bei Experimenten mit  $n \geq 10$  wurde vorher zusätzlich ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit  $* \leq p 0,05$ ;  $** \leq p 0,01$  und  $*** \leq p 0,001$  gekennzeichnet.

---

## 3. Ergebnisse

---

### 3.1. Undifferenzierte NHBE

---

#### 3.1.1. Charakterisierung der NHBE

---

Da die NHBE am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung zum ersten Mal verwendet wurden, wurden die NHBE der beiden Spender auf ihre wichtigsten Eigenschaften hin charakterisiert. Dazu zählen die Morphologie, Wachstumseigenschaften und das RNS Expressionsmuster der wichtigsten Marker für Lungengewebe (Nkx2.1), Zelltypen (KRT5 für Basalzellen und MUC5AC für Becherzellen) und Seneszenz (p16 und p21). Die NHBE wurden in Kulturflaschen kultiviert (siehe Kapitel 2.1.1) und wiesen eine, wie in der Literatur beschriebene (Firth et al. 2014), quaderförmige Morphologie auf (siehe Abbildung 12)

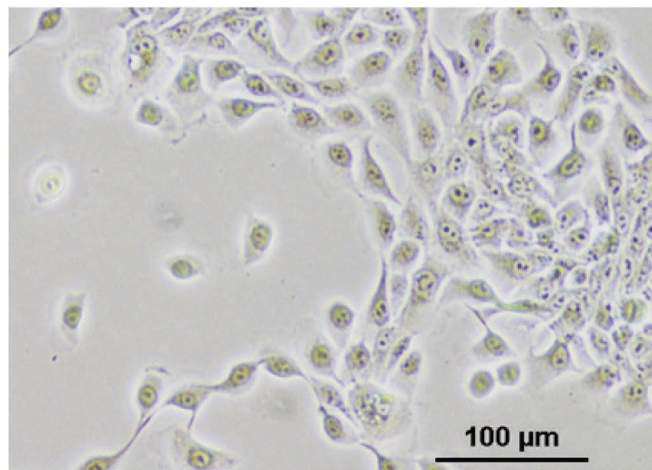


Abbildung 12: Standardmäßig kultivierte NHBE in Passage 3 im Durchlichtmikroskop. Zu erkennen ist die quaderförmige Morphologie.

Die Verdopplungszeit der NHBE in BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium wird von Lonza im Analysezertifikat angegeben (siehe Tabelle 1). Um zu überprüfen, ob dies bei der Kultivierung in PneumaCult Ex Plus™, (das Medium welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde) ebenfalls zutrifft, wurden für die NHBE beider Spender Wachstumskurven angefertigt (siehe 2.4). Es wurden NHBE in Passage 3 verwendet, da alle weiterführenden Experimente mit Passage 3 NHBE durchgeführt wurden.

Das relative Wachstum wurde bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 13). Nach einer Latenzzeit von 24 h war zunehmendes Wachstum der NHBE zu messen. Nach 48 h gingen die NHBE in die exponentielle Phase über, welche bereits nach 72 h in die stationäre Phase überging, welche bei den NHBE von Spender 1 schon in die Absterbe-Phase überging. Trägt man den Logarithmus des relativen Wachstums gegen die Zeit auf, gibt die Steigung der linearen Regression der exponentiellen Phase den Wachstumskoeffizienten  $k$  an (siehe Gleichung (1)). Daraus ergab sich für die NHBE von Spender 1 eine Verdopplungszeit von 7,3 h und für die NHBE von Spender 2 von 15,1 h (siehe Gleichung (2)).

Kürzere Zählintervalle von 8 und 16 h für die genauere Auflösung des Beginns der exponentiellen Phase brachten aufgrund von Messungengenauigkeiten keine zusätzlichen Informationen.

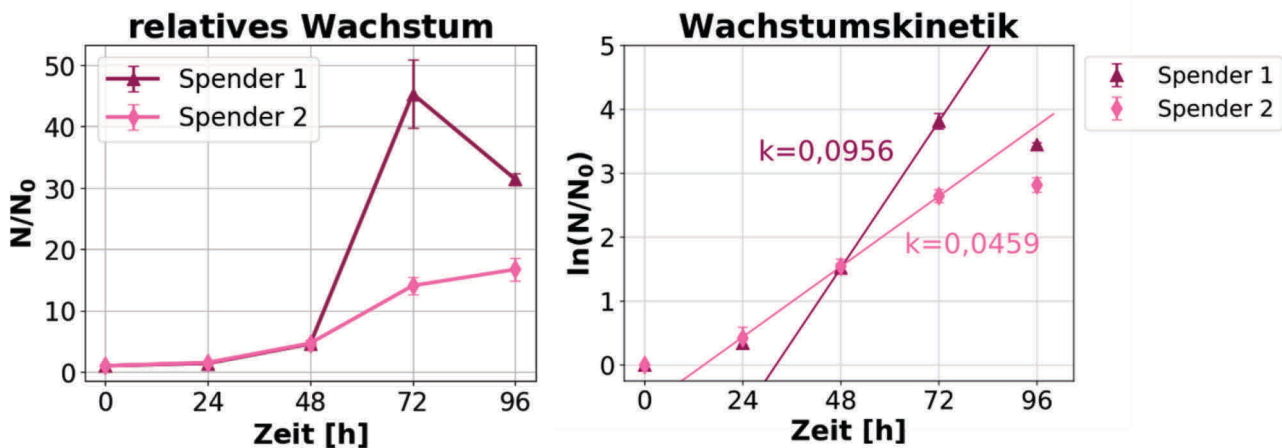


Abbildung 13: Wachstumskurve und die resultierende Wachstumskinetik zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums der NHBE beider Spender in Passage 3. Der Wachstumskoefizient  $k$  für das exponentielle Wachstum ist in dem Graphen der Wachstumskinetik angegeben, er wurde anhand der Steigung der exponentiellen Phase zwischen 48 und 72 h ermittelt. Der Fehlerbalken gibt die SD an.  $N=2$ ;  $n=4$

Um die Bestrahlung der NHBE in der exponentiellen Phase durchzuführen, wurden alle Bestrahlungen 48 – 55 h nach der Passage durchgeführt.

Zusätzlich wurde die Zellzykluslänge mittels EdU/BrdU/Ki67 Färbung (siehe Kapitel 2.8), bestimmt. NHBE in Passage 3 von Spender 1 wiesen eine S-Phasenlänge (siehe Gleichung (9)) von 5,3 h und damit eine Zellzykluslänge (siehe Gleichung (10)) von 9,5 h auf. Durch die Ki67-Färbung ergaben sich aus dem Anteil der Ki67-positiven Zellen der Wachstumsfaktor (siehe Gleichung (11)) von 0,75. Durch diesen Wachstumsfaktor reduziert sich die Zellzykluslänge für die proliferierenden Zellen auf 7,1 h (siehe Gleichung (12)). 24 h nach 2 Gy Röntgenstrahlung erhöhte sich die Zellzykluslänge auf 15,5 h, nach Einberechnung des gesunkenen Wachstumsfaktors von 0,51 ergab sich eine Zellzykluslänge von 7,9 h für die noch proliferierenden Zellen. Bei Spender 2 ergab sich für die Passage 3 NHBE eine S-Phasenlänge von 5,6 h und damit eine Zellzykluslänge von 14,4 h. Durch den Wachstumsfaktor von 0,81 ergab sich für die proliferierenden Zellen eine Zykluslänge von 11,8 h. 24 h nach 2 Gy Röntgenstrahlung verlängerte sich diese auf 18,4 und wurde durch den auf 0,69 gesunkenen Wachstumsfaktor auf 12,7 h Zellzykluslänge korrigiert.

Um den Anteil an Stammzellen, also an Basalzellen, zu ermitteln, wurde eine Immunfluoreszenz Färbung mit dem Basalzellmarker KRT5 und dem Becherzellmarker MUC5AC (siehe Kapitel 2.7.3) durchgeführt. Die Antikörperfärbung zeigte, dass es sich bei den NHBE mit  $98,1 \pm 0,2$  % (MW  $\pm$  SD) um Basalzellen handelt, nur ein geringer Anteil von  $1,9 \pm 0,2$  % war MUC5AC-positiv (siehe Abbildung 14). Ein interindividueller Unterschied wurde nicht festgestellt.

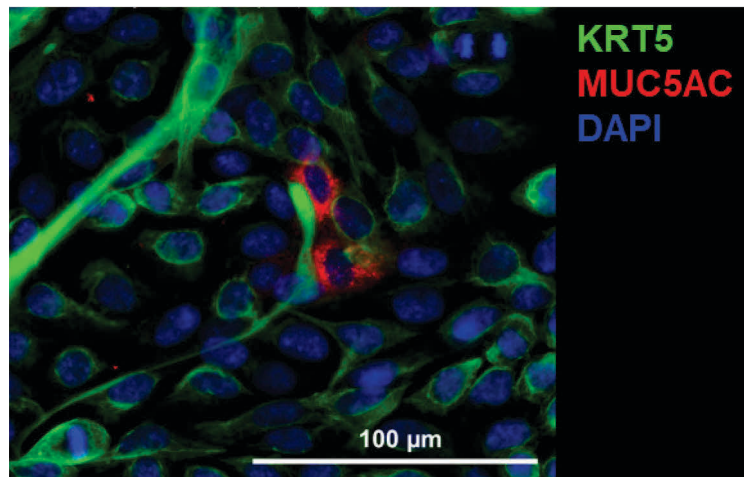


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung der NHBE in Passage, deutlich sichtbar sind die rotgefärbten Becherzellen zwischen den grüngefärbten Basalzellen. In blau sind die Nuklei gefärbt.

Die Zellkernfläche ist bei der Bestrahlung mit dichtungisierender Strahlung, wie  $\alpha$ -Partikeln, ein entscheidender Faktor für die applizierte Dosis, je größer die Fläche, desto höher ist die Trefferwahrscheinlichkeit eines Partikels. Es wurde die Zellkernfläche der NHBE bestimmt, die in Standardkulturflaschen kultiviert wurden, sowie von Zellen, die für die Bestrahlung mit  $\alpha$ -Partikeln aufgrund ihrer geringen Reichweite in Materie auf boPET-Folie kultiviert wurden (siehe Kapitel 2.2.2). Es bestand im Rahmen der Messungenauigkeit kein Unterschied der Zellkerngröße zwischen den Spendern und den Kultivierungsbedingungen. Bei Kultivierung in Standardkulturgefäßen war die durchschnittliche Zellkernfläche der NHBE beider Spender vergleichbar und betrug für Spender 1  $120 \pm 30 \mu\text{m}^2$  und Spender 2  $124 \pm 35 \mu\text{m}^2$  (MW  $\pm$  SD). Auf bo-PET-Folie kultiviert betrug die Zellkernfläche der NHBE von Spender 1  $138 \pm 40 \mu\text{m}^2$  und von Spender 2  $123 \pm 38 \mu\text{m}^2$ .

Die RNS Expression wurde in den Passagen 2-7 analysiert. Dafür wurde bei jeder Passage eine RNS Probe genommen und für die qRT-PCR aufbereitet (siehe Kapitel 2.6). Da für alle strahlenbiologischen Experimente NHBE in Passage 3 verwendet wurden, wurde auf den Wert zum Zeitpunkt der Passage 3 normiert.

Auf Ebene der undifferenzierten und standardmäßig kultivierten NHBE der beiden Spender wurde bei den untersuchten Markern kein interindividueller Unterschied festgestellt.

Die mRNS Expression des Nkx2.1 Markers sank von Passage 2 zu Passage 3 stark, eine weitere deutliche Abnahme war ab Passage 4 bis zu Passage 7 zu beobachten (siehe Abbildung 15).

## Nkx2.1 im Laufe der Passagen

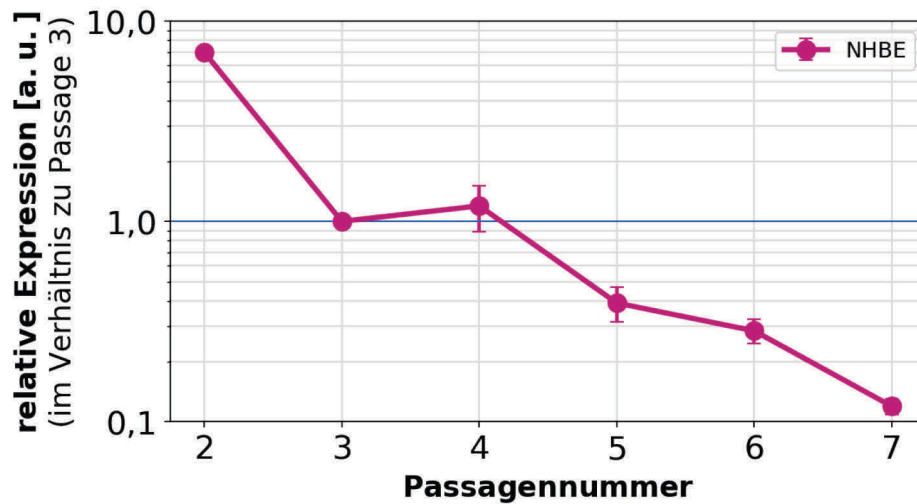


Abbildung 15: Expressionslevel des Nkx2.1 Markers für Einleitung der terminalen Differenzierung in die Zelltypen der Lunge und ihre Plastizität im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). N=3; n=3

Der Basalzellspezifische Marker KRT5 zeigte auf mRNA Ebene keine signifikante Veränderung im Laufe der Passagen und blieb nahezu konstant (siehe Abbildung 16).

## KRT5 im Laufe der Passagen

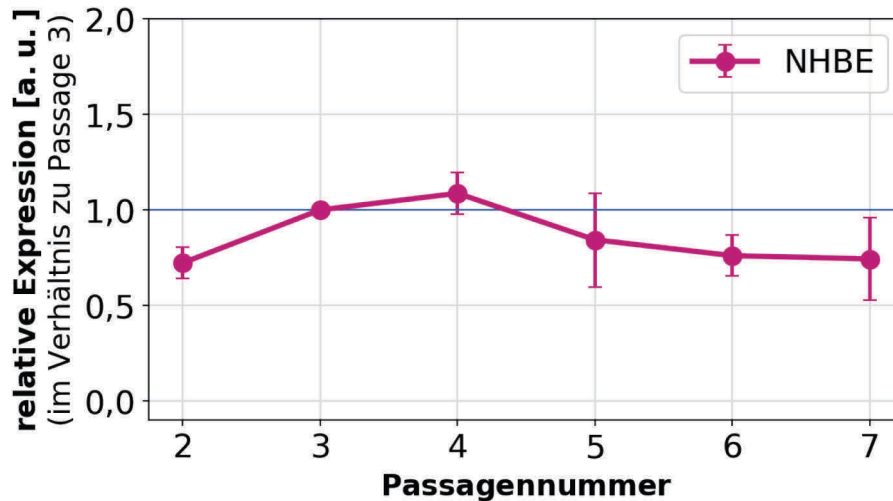


Abbildung 16: Expressionslevel des KRT5 Markers für Basalzellen im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). N=4; n=3

Das MUC5AC mRNA Level sank von Passage 2 auf Passage 3 signifikant ab und blieb danach bis Passage 5 konstant (siehe Abbildung 17). Ab Passage 6 stieg das Level wieder an, allerdings war die Zunahme aufgrund der hohen Fehlerbalken nicht signifikant.

## MUC5AC im Laufe der Passagen

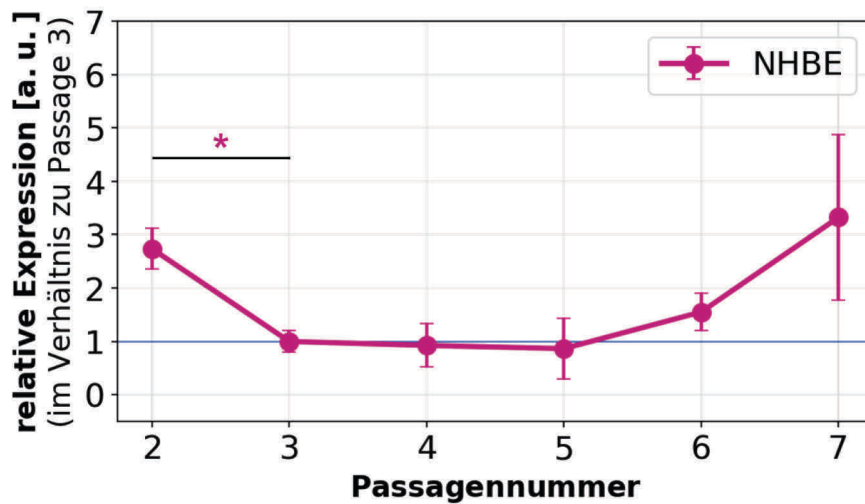


Abbildung 17: Expressionslevel des MUC5AC Markers für Becherzellen im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. N=4; n=3; \*  $\leq p$  0,05

Das Level des Seneszenzmarkers p16 war Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). bis Passage 4 konstant und nahm ab Passage 5 signifikant zu (siehe Abbildung 18).

## p16 im Laufe der Passagen

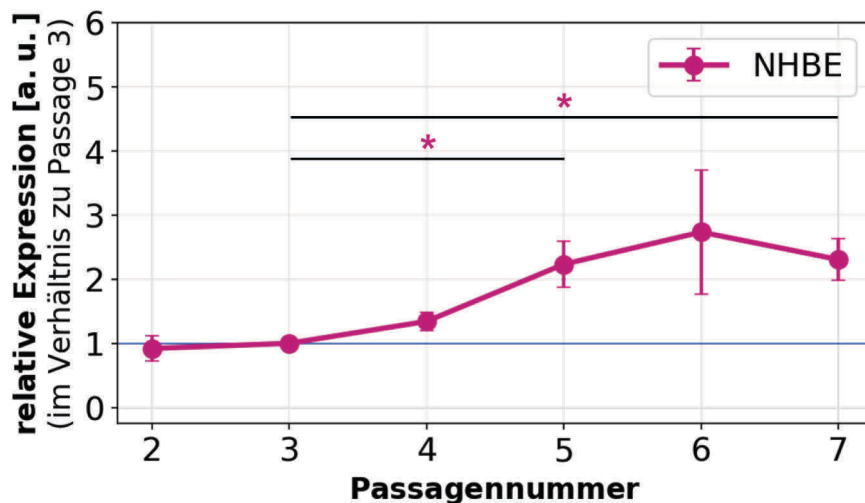


Abbildung 18: Expressionslevel des p16 Markers für Seneszenz im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). N=4; n=3; \*  $\leq p$  0,05

### 3.1.2. Zellüberleben nach Bestrahlung

Zur Ermittlung der Radiosensitivität der NHBE wurde das klonogene Zellüberleben mittels Kolonienbildungstest gemessen. Für die Bestimmung der apoptotischen Zellen wurde eine Caspase3/7-Färbung verwendet.

### 3.1.2.1. Überlebenskurve

Als erster Anhaltspunkt für die Radiosensitivität der NHBE wurde eine Überlebenskurve nach Röntgen- und  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung erstellt (siehe Kapitel 2.5.1). Die NHBE der beiden Spender unterschieden sich in ihrer PE, während zwischen den Kultivierungsbedingungen (Kulturflasche und  $\alpha$ -Ring) keine unterschiedliche PE für die NHBE des jeweiligen Spender ermittelt wurde. Die PE von Spender 1 beträgt  $32,4 \pm 5,2 \%$  und für Spender 2  $18,6 \pm 3,2 \%$  (MW  $\pm$  SD).

Nach Röntgenbestrahlung ist ein interindividueller Unterschied bezogen auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Werte der Fits vorhanden (siehe Abbildung 19) nach  $\alpha$ -Partikelbestrahlung hingegen nicht. Aus dem Fit der Überlebenskurve ergibt sich bei Spender 1 ein  $\alpha/\beta$  Verhältnis von  $0,39 \pm 0,02 \text{ Gy}^{-1}$  zu  $0,03 \pm 0,01 \text{ Gy}^{-2}$  für Röntgenstrahlung und der  $\alpha$ -Wert für  $\alpha$ -Partikel beträgt  $1,49 \pm 0,05 \text{ Gy}^{-1}$ . Für Spender 2 gilt ein  $\alpha/\beta$  Verhältnis von  $0,56 \pm 0,04 \text{ Gy}^{-1}$  zu  $0,017 \pm 0,001 \text{ Gy}^{-2}$  für Röntgenstrahlung und ein  $\alpha$ -Wert für  $\alpha$ -Partikel von  $1,74 \pm 0,17 \text{ Gy}^{-1}$ .

Mit diesen Werten wurde eine  $\text{RBW}_{\text{max}}$  (siehe Gleichung (10)) für Spender 1 von  $3,82 \pm 0,50$  errechnet und  $3,11 \pm 0,97$  für Spender 2.

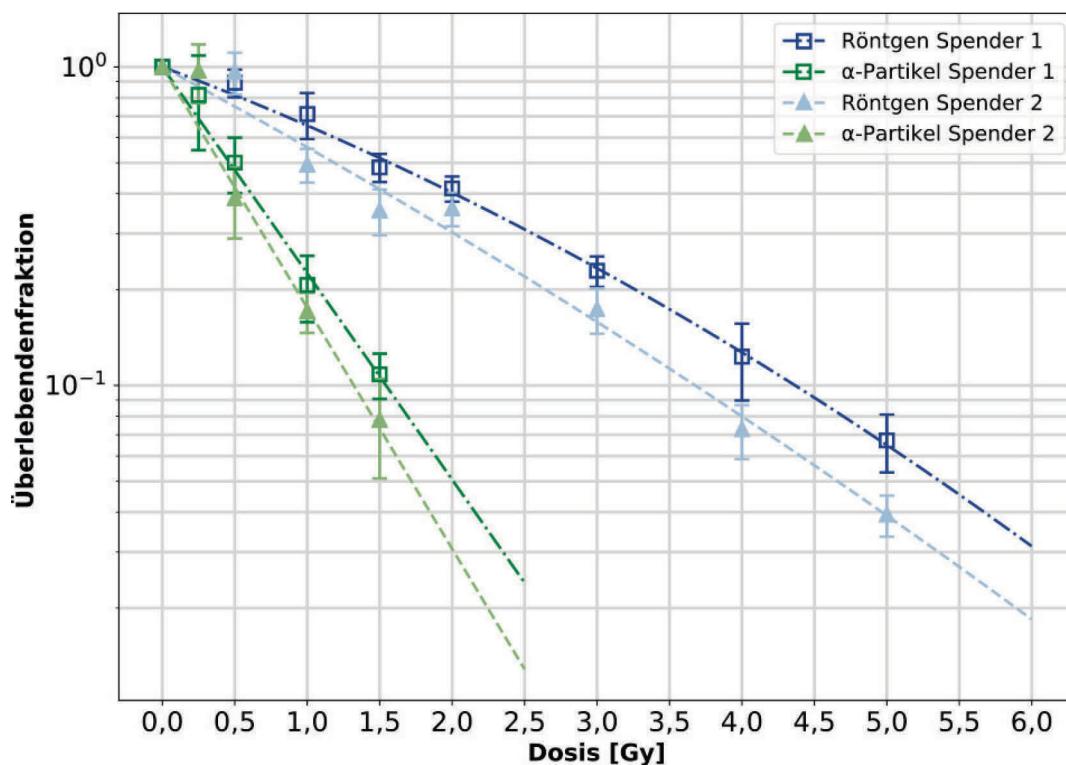


Abbildung 19: Überlebenskurve von Spender 1 und 2 nach Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung. Der Fehlerbalken gibt die SD an. N=3; n=3

Anhand der Überlebenskurve wurden für die Bestrahlung der NHBE für die Differenzierung in ALI Kultur Dosen ausgewählt, die zu einem vergleichbaren Überleben führen. Die Isoeffektdosis zu 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln ist 2,0 Gy Röntgenstrahlung, umgekehrt ist die Isoeffektdosis zu 0,5 Gy Röntgenstrahlung etwa 0,25 Gy  $\alpha$ -Partikel. Bei genauer Berechnung der Isoeffektdosen aus dem Fit entsprechen bei Spender 1 0,14 Gy  $\alpha$ -Partikel 0,5 Gy Röntgenstrahlung bei einem  $\text{RBW}_{0,82}$  von



3,68 ± 0,48 und 0,60 Gy α-Partikel 2,00 Gy Röntgenstrahlung bei einem RBW<sub>0,41</sub> von 3,31 ± 0,43. Für Spender 2 ergeben 0,16 Gy α-Partikel 0,50 Gy Röntgenstrahlung bei einem RBW<sub>0,75</sub> von 3,06 ± 0,95 und 0,68 Gy α-Partikel 2,00 Gy Röntgenstrahlung bei einem RBW<sub>0,30</sub> von 2,93 ± 0,91.

### 3.1.2.2. Apoptose-Index

Zusätzlich wurde der Apoptose-Index als Maß für den programmierten Zelltod bestimmt. Da durch das Fixieren und die DAPI Färbung das Medium entfernt wurde und so evtl. leicht in Suspension abschwimmende apoptotische Zellen verloren gehen können, wurde eine Apoptose Färbung mittels Caspase 3/7 zur direkten Färbung in Zellkultur verwendet (siehe Kapitel 2.5.2).

Zunächst wurde der Verlauf im Zeitraum von 2 – 96 h in der Kontrolle sowie nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung untersucht. In den Kontrollen schwankte der Apoptose-Index (siehe Gleichung (7)) zwischen 0,9 und 7,9 %, der Mittelwert betrug 5,8 ± 1,5 % (MW ± SEM). Ebenso schwankte der Mittelwert nach 2 Gy Röntgenbestrahlung zwischen 3,5 und 8,0 %, (siehe Abbildung 20).

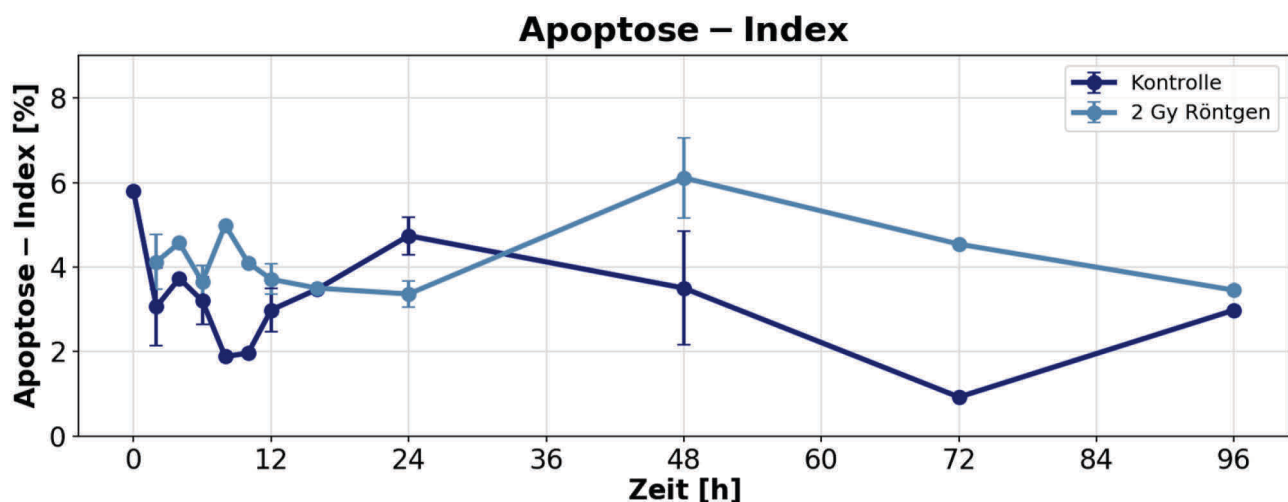


Abbildung 20: Apoptose-Index 0-96 h nach Röntgenbestrahlung. Die Daten beider Spender wurden gepoolt. Die Fehlerbalken geben den SEM an., zu Zeitpunkten ohne Fehlerbalken wurde nur eine Messung vorgenommen. N = 1-3, n = 1

Der Zeitpunkt wurde mit 24 h so gewählt, dass mindestens ein Zellzyklus komplett durchlaufen wurde.

Der Apoptose-Index 24 h nach Bestrahlung mit Röntgen oder α-Partikeln zeigte keinen interindividuellen Unterschied, daher wurden die Daten beider Spender gepoolt. Ein Aufwärtstrend mit steigender Dosis von 0,5 Gy zu 4,0 Gy Röntgenstrahlung und von 0,25 Gy zu 1,00 α-Partikelstrahlung war zu erkennen, allerdings war dieser nur nach 4 Gy Röntgenstrahlung signifikant (siehe Abbildung 21). Er lag mit 2,4 % niedriger als einige Kontrollwerte in vorangegangenen Messungen (siehe Abbildung 20).

## Apoptose – Index 24 h nach Bestrahlung gepoolte Daten beider Spender

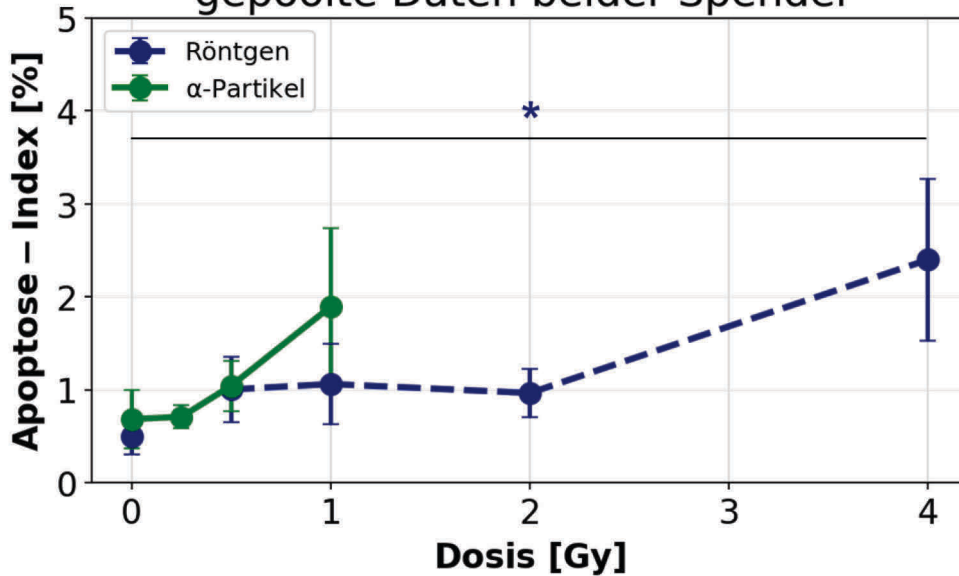


Abbildung 21: Apoptose-Index 24 h nach Bestrahlung anhand der gepoolten Daten beider Spender. Die Fehlerbalken geben den SEM an. N=2; n=1; \*  $\leq p$  0,05

### 3.1.2.3. Zellzyklusprogression

Die Deregulation des Zellzykluses kann als Initiator der Karzinogenese eine Rolle spielen [79], daher wurden die Proliferationsfähigkeiten und die Verteilung der Zellzyklusphasen der NHBE nach Bestrahlung untersucht.

#### 3.1.2.3.1. Proliferationsindex

Zur Analyse des Zellzykluses nach Bestrahlung wurde der Proliferations-Index mittels Ki67-Antikörperfärbung 24; 48 und 72 h in der Kontrollpopulation sowie nach 2 Gy Röntgenstrahlung bestimmt (siehe Kapitel 2.7). Der größte Unterschied des Proliferations-Indices (siehe Gleichung (8)) von 33 % zwischen der Kontrolle und 2 Gy Röntgen bestrahlten NHBE ist nach 24 h zu beobachten (siehe Abbildung 22). Danach näherten sich die Werte bis auf 15 % an, da der Proliferations-Index der Kontrolle ebenfalls sank.

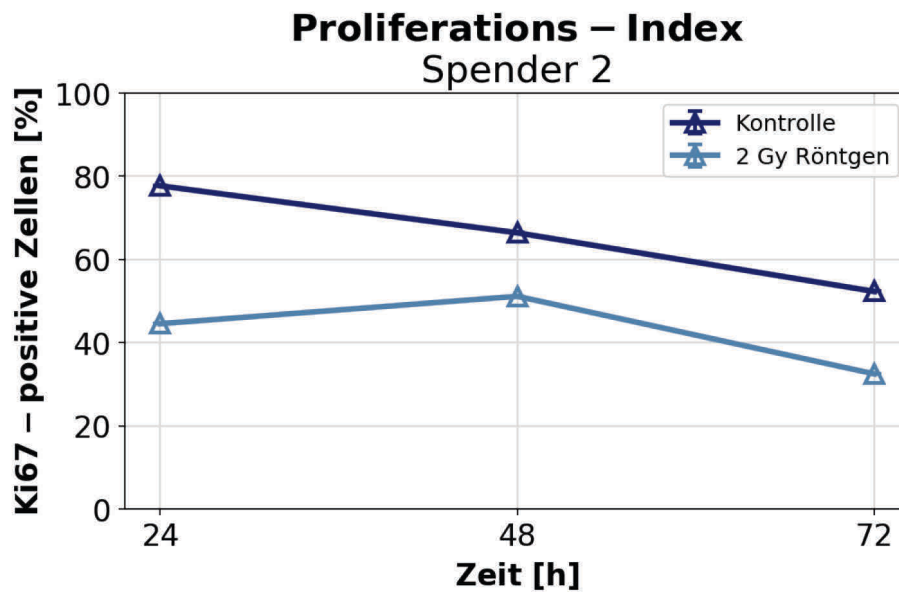


Abbildung 22: Proliferations-Index der NHBE von Spender 2 24, 48 und 72 h nach Röntgenbestrahlung. N = 1, n = 1

Im Proliferations-Index 24 h nach Bestrahlung war ein deutlicher interindividueller Unterschied zu beobachten (siehe Abbildung 23). Der Anteil an proliferierenden Zellen war bei Spender 1 mit  $79,7 \pm 0,2 \%$  (MW  $\pm$  SEM) in der Röntgen-Kontrolle und  $73,7 \pm 0,8 \%$  in der  $\alpha$ -Kontrolle höher als bei Spender 2 mit  $69,1 \pm 0,8 \%$  in der Röntgen-Kontrolle und  $55,9 \pm 6,7 \%$  in der  $\alpha$ -Kontrolle. Auffällig ist, dass die  $\alpha$ -Partikel scheinbestrahlten NHBE einen geringeren Proliferations-Index aufweisen, als die Röntgenstrahlten scheinbestrahlten NHBE. Die prozentuale und dosisabhängige Abnahme nach Bestrahlung war bei beiden Spendern nahe zu identisch. 1 Gy  $\alpha$ -Partikel und 4 Gy Röntgenstrahlung führten jeweils zu einer Reduktion um  $\sim 32 \%$ . Sowohl nach Röntgenbestrahlung als auch nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung war eine dosisabhängige Reduktion des Proliferations-Indices deutlich.

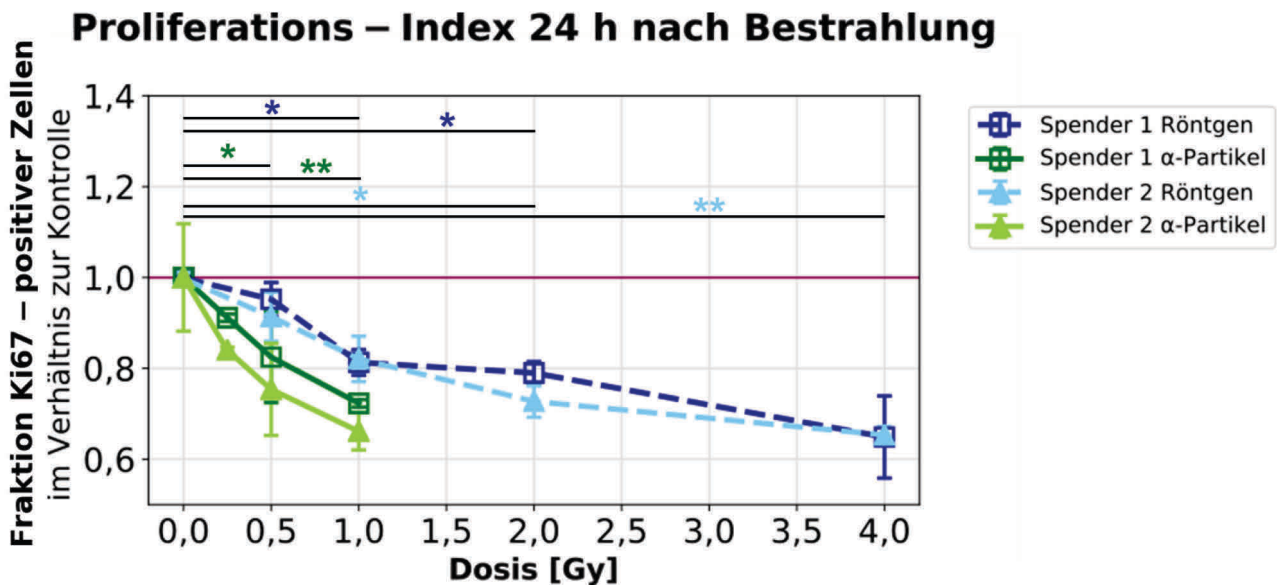


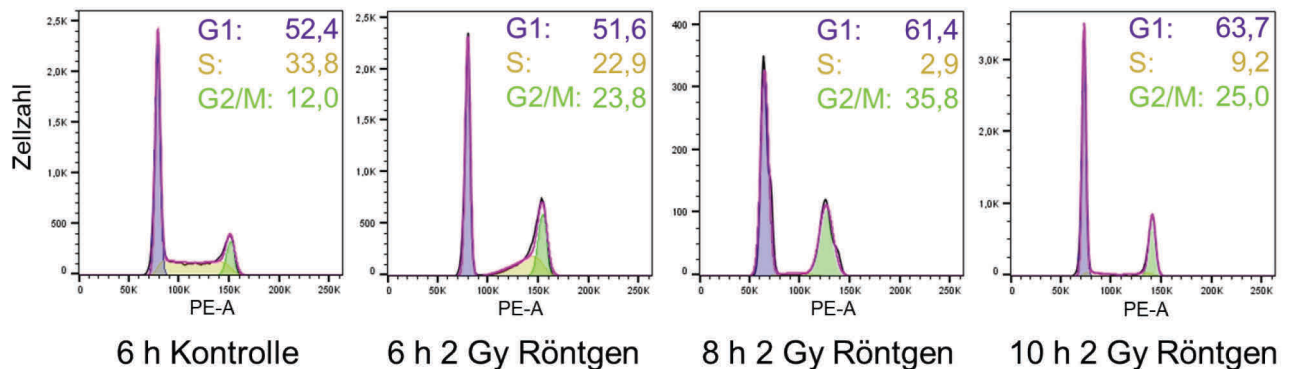
Abbildung 23: Vergleich des Proliferations-Indices der NHBE von Spender 1 und 2 zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. N=2; n=1; \* ≤ p 0,05; \*\* ≤ p 0,01

#### 3.1.2.3.2. Zellzyklusanalyse

Die Verteilung der Zellzyklusphasen nach Bestrahlung wurde mittels PI Färbung und Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.3) von 2 – 12 h nach 2 Gy Röntgenbestrahlung sowie in Kontrollpopulationen zum Zeitpunkt 0; 6 und 12 h untersucht. PI färbt die DNS der Zellen an und durch die Quantifizierung des DNS-Gehalts via FACS kann ein Rückschluss auf die aktuelle Zellzyklusphase der einzelnen Zellen gezogen werden. Für jeden Spender wurde eine Kontrolle zum Zeitpunkt 0; 6 und 12 h analysiert. Aus den gemittelten Kontrollwerten ergab sich für Spender 1 ein Anteil von  $55,2 \pm 2,9$  % der Zellen in der G1-Phase,  $33,1 \pm 1,5$  % in der S-Phase und  $10,2 \pm 1,3$  % der Zellen in der G2/M-Phase (MW ± SD). Für Spender 2 ergab sich ein Anteil von  $57,7 \pm 1,8$  % der Zellen in der G1-Phase,  $28,3 \pm 3,9$  % in der S-Phase und  $12,9 \pm 2,7$  % der Zellen in der G2/M-Phase (kompletter Datensatz siehe Anhang). Ein interindividueller Unterschied der Verteilung der Zellzyklusphasen zwischen den beiden Spendern ist nicht sichtbar (siehe Abbildung 24).

Nach 2 Gy Röntgenstrahlung stieg der G2/M Anteil bei den NHBE beider Spender bereits 2 h nach der Bestrahlung an und erreicht sein Maximum 8 h nach Bestrahlung. Der Anteil der Zellen in G2/M Phase war bei den NHBE von Spender 1 mit 35,8 % höher als bei den NHBE von Spender 2 mit 28,4 %. 10 h nach Bestrahlung sank der G2/M Anteil bereits wieder (siehe Abbildung 24). 8 h nach Bestrahlung war der S-Phase Anteil in den NHBE beider Spender am geringsten. Spender 1 lag mit 2,9 % noch niedriger als Spender 2 mit 6,8 %, auch hier stieg der Anteil bereits 10 h nach Bestrahlung wieder.

## Spender 1



## Spender 2

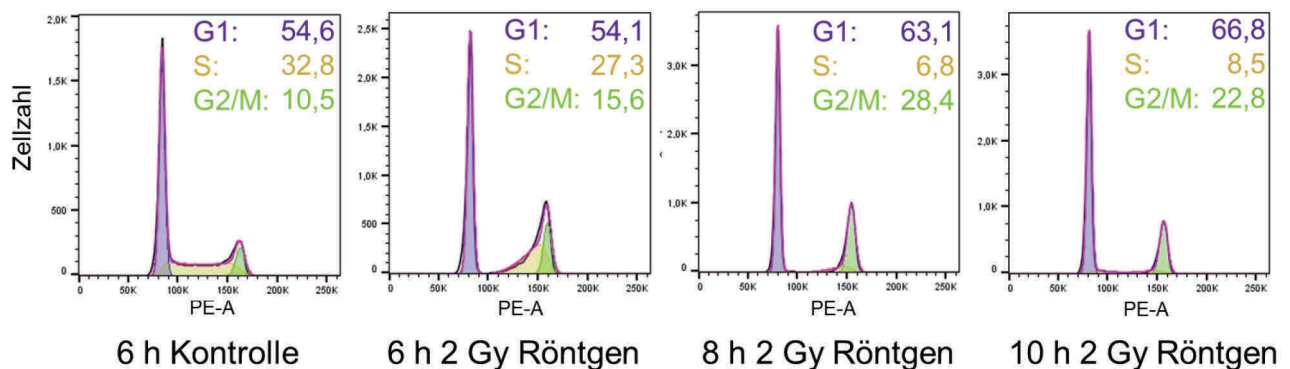


Abbildung 24: Zellzyklusprofile der NHBE der beiden Spender 6; 8 und 10 h nach Exposition mit 2 Gy Röntgenstrahlen. Für die Kontrolle wird exemplarisch die Messung 6 h nach der Scheinbestrahlung gezeigt. In Lila ist der Anteil an G1-Phase, in Gelb S-Phase und in Grün G2/M-Phase Zellen markiert. Zu sehen ist die Abnahme des S-Phase Anteils und eine Zunahme des G2/M Anteils bei 6 h, bei 8 h sieht man eine weitere Zunahme des G2/M Anteils, während der Anteil an S-Phase Zellen fast komplett verschwunden ist. Nach 10 h sinkt der G2/M Anteil bereits wieder und der Anteil an Zellen in G1 und S-Phase steigt wieder an. N=1; n=1

### 3.1.3. Strahlenantwort der NHBE auf Ebene der RNS Expression

Zur Analyse der Strahlenreaktion auf mRNA Ebene wurden 24 und 120 h nach Bestrahlung der undifferenzierten NHBE RNS Proben genommen (siehe Kapitel 2.6). Um einen Einfluss von Kontaktinhibition zu verhindern, wurden die NHBE für den 120 h Zeitpunkt 24 h nach der Bestrahlung passagiert und bis zur Probennahme standardmäßig kultiviert. Augenmerk wurde hier auf den Erhalt der Stammzeleigenschaften, die spontane und stressinduzierte Differenzierung in Becherzellen, Seneszenz und die Induktion der Autophagie gelegt.

#### 3.1.3.1. Basalzellen

Bei der Analyse der Basalzellenmarker wurde ein früher (KRT14) und ein später Marker (KRT5) untersucht.

Interindividuelle Unterschiede waren für KRT14 feststellbar (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). 24 h nach Bestrahlung war im Rahmen der Messungenauigkeiten bei den NHBE beider Spender keine strahleninduzierte Veränderung zu beobachten. Bei den NHBE von Spender 1 sank das KRT14 mRNA Level von 24 h auf 120 h im gesamten Dosisbereich leicht ab. Während es bei den NHBE von Spender 2 in den Kontrollen von 24 h auf 120 h steigt und mit steigender Dosis abnimmt. Eine signifikante strahlenbedingte Veränderung konnte nicht detektiert werden.

### KRT14 – Spender 1

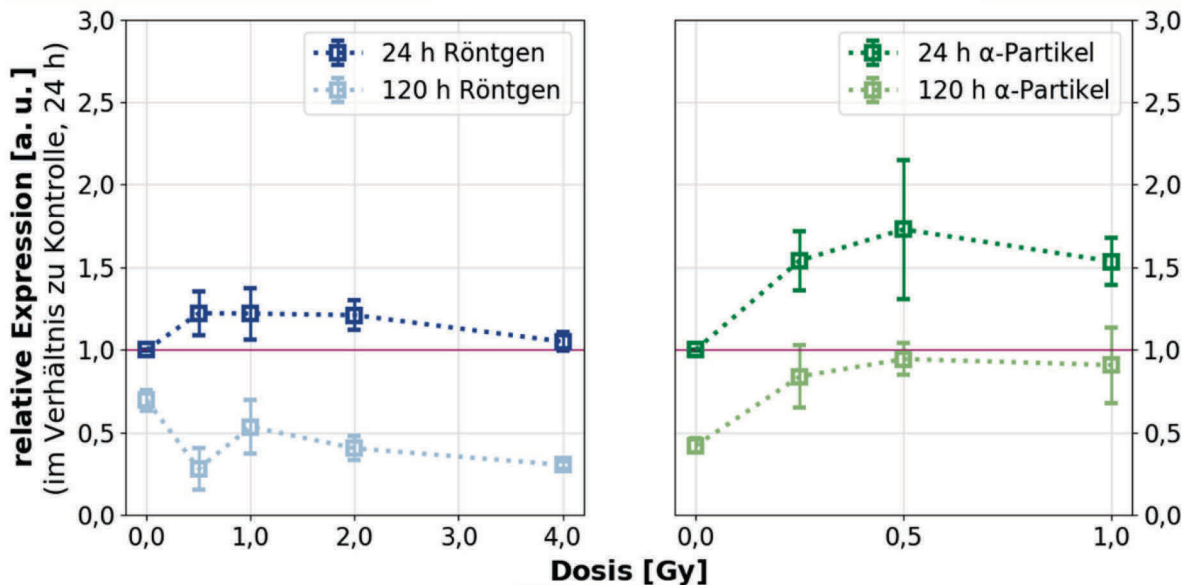


Abbildung 25: Expressionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 in den undifferenzierten NHBE von Spender 1, 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

### KRT14 – Spender 2

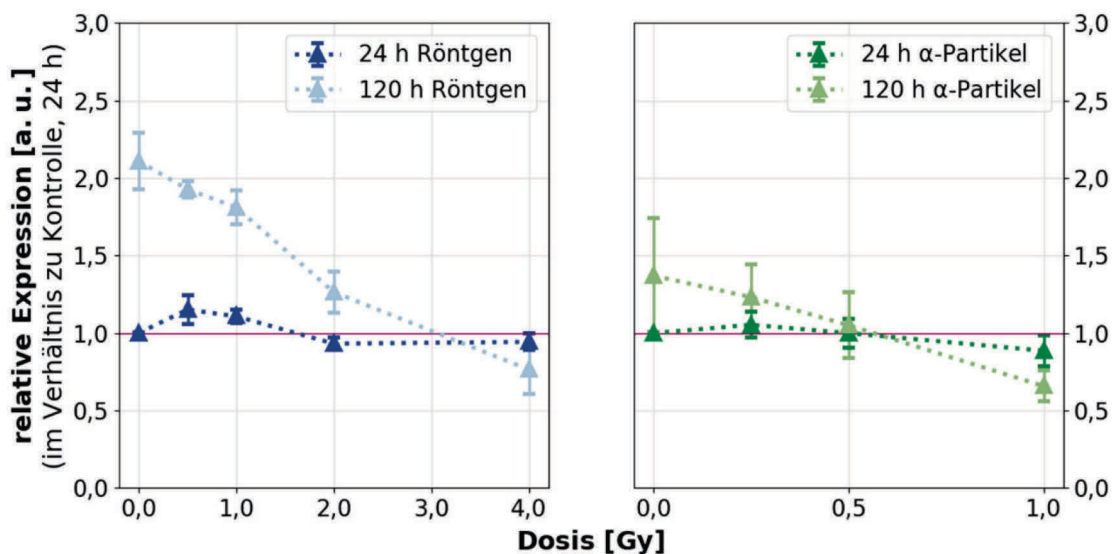


Abbildung 26: Expressionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 in den undifferenzierten NHBE von Spender 2, 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben en SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Im Expressionsmuster des späten Basalzellmarkers KRT5 war hingegen kein interindividueller Unterschied vorhanden. Ein Strahleneffekt war weder nach Röntgenstrahlung noch nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung zu beobachten. Nach 120 h war die Expression niedriger als zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung (siehe Abbildung 27).

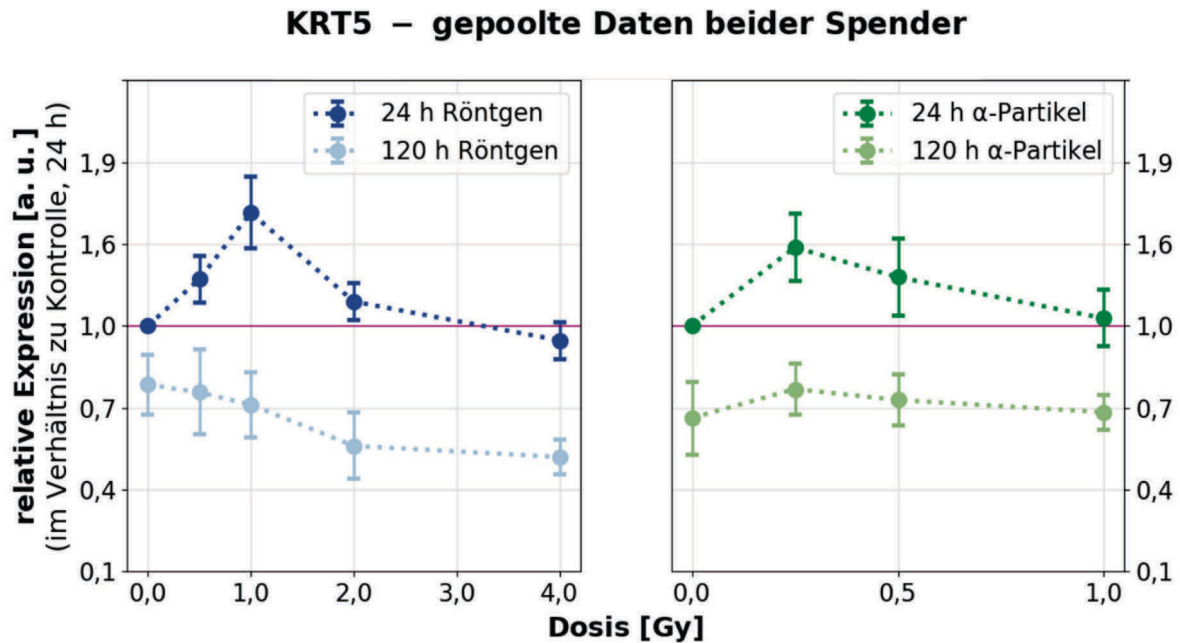


Abbildung 27: Expressionslevel des späten Basalzellmarkers KRT5 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

### 3.1.3.2. Becherzellen

Auf Ebene des mRNA Levels des MUC5AC Markers war nach Röntgenbestrahlung sowohl nach 24 als auch nach 120 h eine dosisabhängige Zunahme des Markers messbar, welche nach 120 h deutlich höher und dosisabhängig war. Nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung war eine signifikante, aber dosisunabhängige Zunahme 120 h nach der Bestrahlung sichtbar. Ein interindividueller Unterschied wurde nicht festgestellt.

## MUC5AC – gepoolte Daten beider Spender

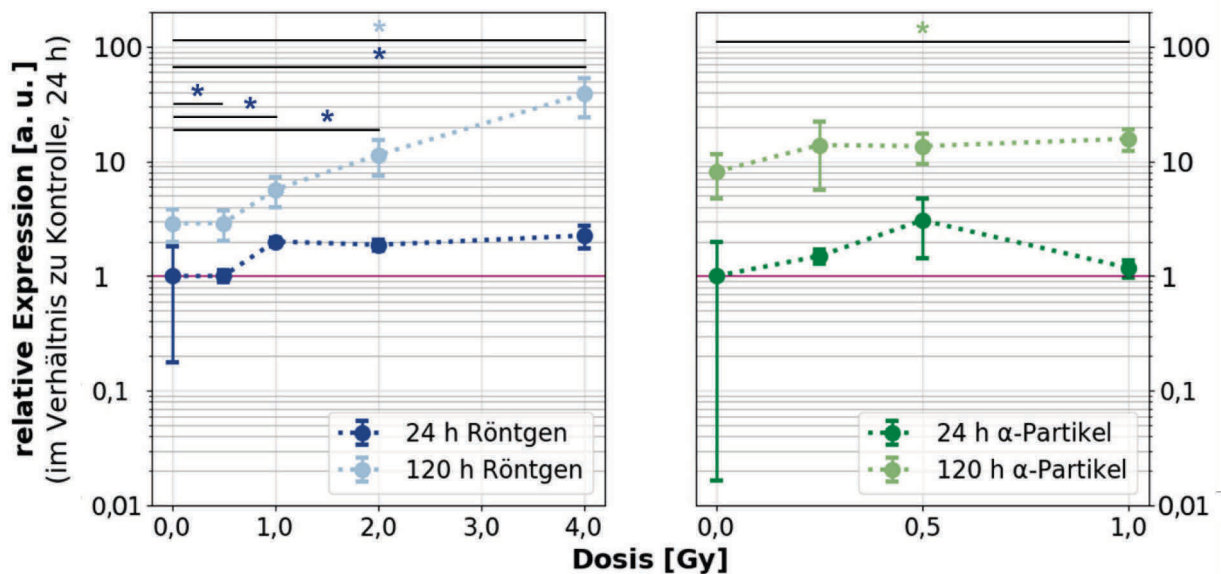


Abbildung 28: Expressionslevel des Becherzellmarkers MUC5AC 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \* ≤ p 0,05

### 3.1.3.2.1. Differenzierung der Basalzellen nach Röntgenbestrahlung auf Proteinbasis

Um zu überprüfen ob der Anstieg des MUC5AC Markers nach Bestrahlung auch auf Proteinebene sichtbar ist, wurden die NHBE beider Spender in Passage 3 nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgen auf den Becherzellmarker MUC5AC und den Basalzellmarker KRT5 immunfluoreszent gefärbt (siehe Kapitel 2.7.3). Die Analyse zeigte, dass ein Anteil der Zellen sowohl MUC5AC als auch KRT5-positiv waren. Bei den NHBE beider Spender war 24 h nach der Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme an MUC5AC-positiven Zellen festzustellen, allerdings waren diese Zellen auch KRT5-positiv (siehe Abbildung 29). Die NHBE von Spender 1 wiesen in der Kontrolle einen Anteil von 2,2 % MUC5AC-positiven Zellen auf, während er nach 2 Gy Röntgenstrahlung bei 4,0 % lag. Die Zunahme fiel bei den NHBE von Spender 2 deutlicher aus, er stieg von 1,7 % in der Kontrolle auf 13,7 % nach 2 Gy Röntgenstrahlung.



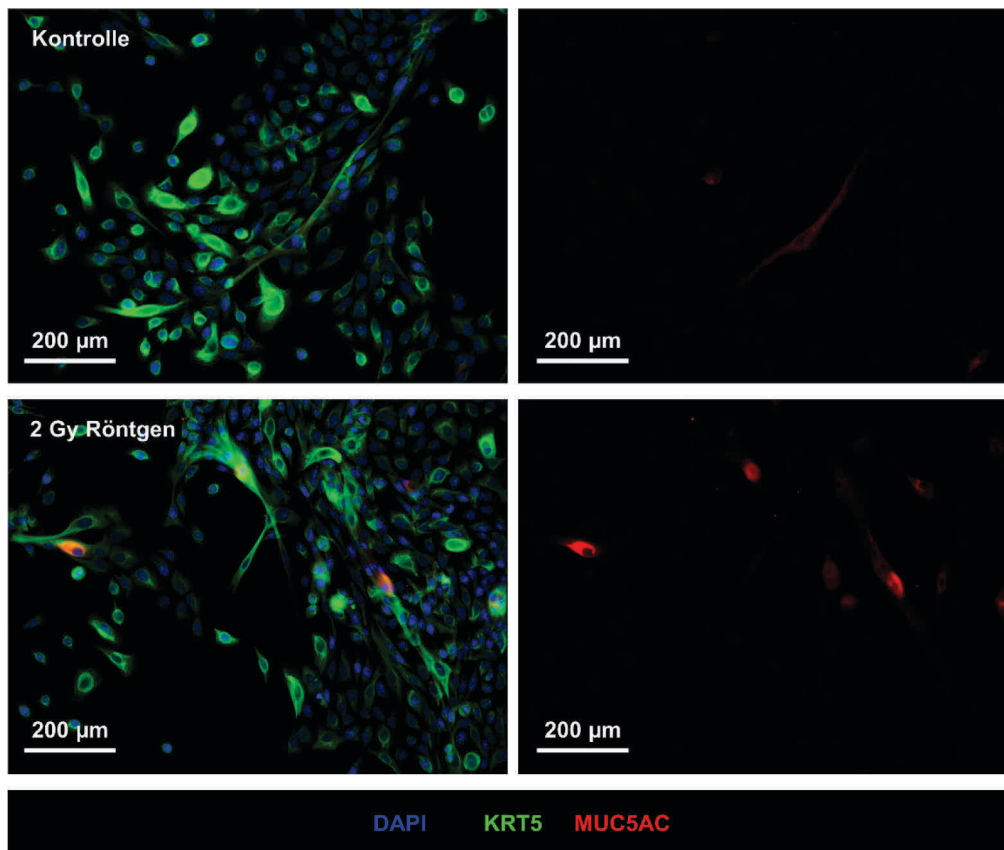


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von NHBE auf MUC5AC (rot) und KRT5 (grün) mit einer DAPI Kernfärbung (blau). In den linken Abbildungen sind die Anteile an KRT5- und MUC5AC-positiven Zellen 24 h nach 2 Gy Röntgenbestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle der NHBE von Spender 2 in Passage 3 zu sehen. In den rechten Bildern ist nur die MUC5AC Färbung zu sehen, also der Anteil an Becherzellen.

### 3.1.3.3. Seneszenz

Als Seneszenzmarker wurden p16 und p21 analysiert, welche beide bei der replikativen Seneszenz hoch reguliert werden. Bei der Expression des p16 mRNA Levels war kein interindividueller Unterschied zu erkennen, daher wurden die Daten gepoolt. 120 h nach der Bestrahlung war ein strahlungsunabhängiger Anstieg des p16 Levels messbar, dieser war aufgrund der großen Fehlerbalken nicht signifikant.

### p16 – gepoolte Daten beider Spender

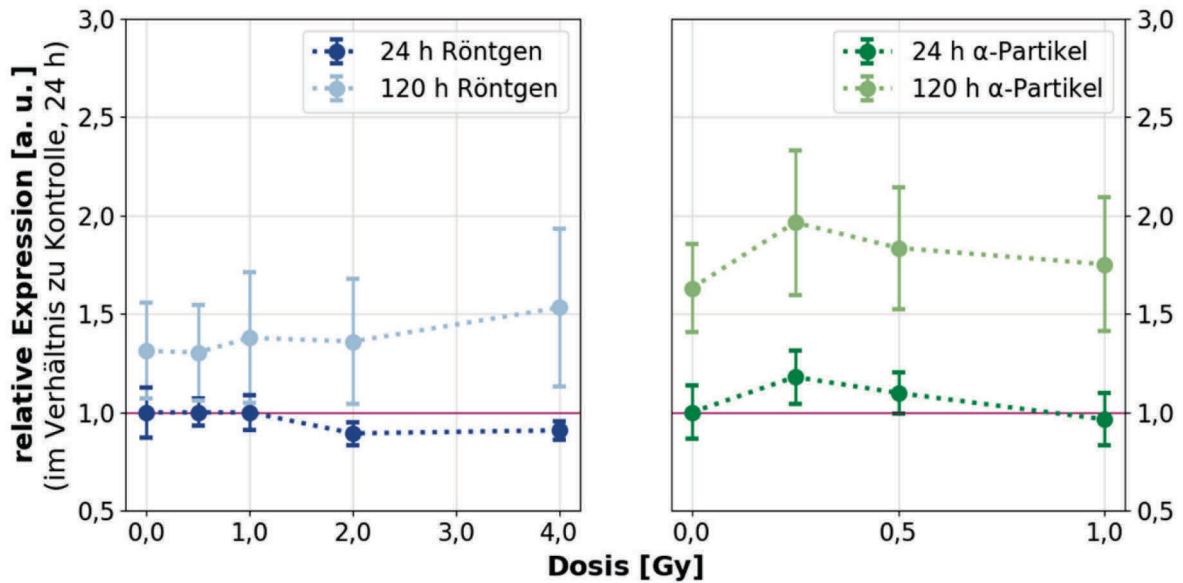


Abbildung 30: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p16 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Im Gegensatz zu p16 war bei p21 auf Ebene der mRNA nach 24 h eine deutliche dosisabhängige Zunahme des mRNA Levels nach beiden Strahlungsqualitäten zu detektieren, diese Zunahme war auch nach 120 h noch zu erkennen (siehe Abbildung 31). Ein interindividueller Unterschied wurde nicht festgestellt.

### p21 – gepoolte Daten beider Spender

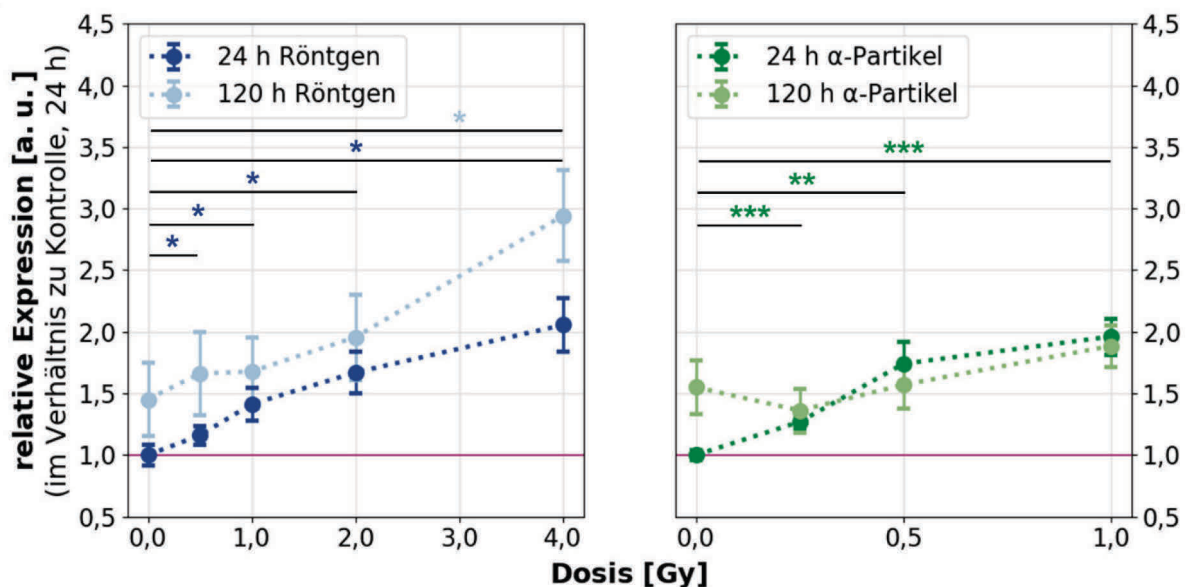


Abbildung 31: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p21 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01; \*\*\*  $\leq p$  0,001

### 3.1.3.4. Autophagie

Als Marker für die Autophagie wurde LC3B gewählt, ein Protein welches in die Membran der autophagischen Vesikel eingebaut wird [126]. Bei LC3B war 24 h nach Bestrahlung ein sehr flacher Anstieg der Expression um bis zu 50 % bei der jeweils höchsten Dosis Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikeln im Vergleich zur Kontrolle zu detektieren (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Nach 120 h war ein interindividueller Unterschied zu beobachten. Bei den NHBE beider Spender war 120 h nach der Bestrahlung eine Zunahme des Expressionslevels zu beobachten, die bei den NHBE von Spender 1 mit steigender Dosis abnahm, während sie bei den NHBE von Spender 2 mit steigender Dosis zunahm.

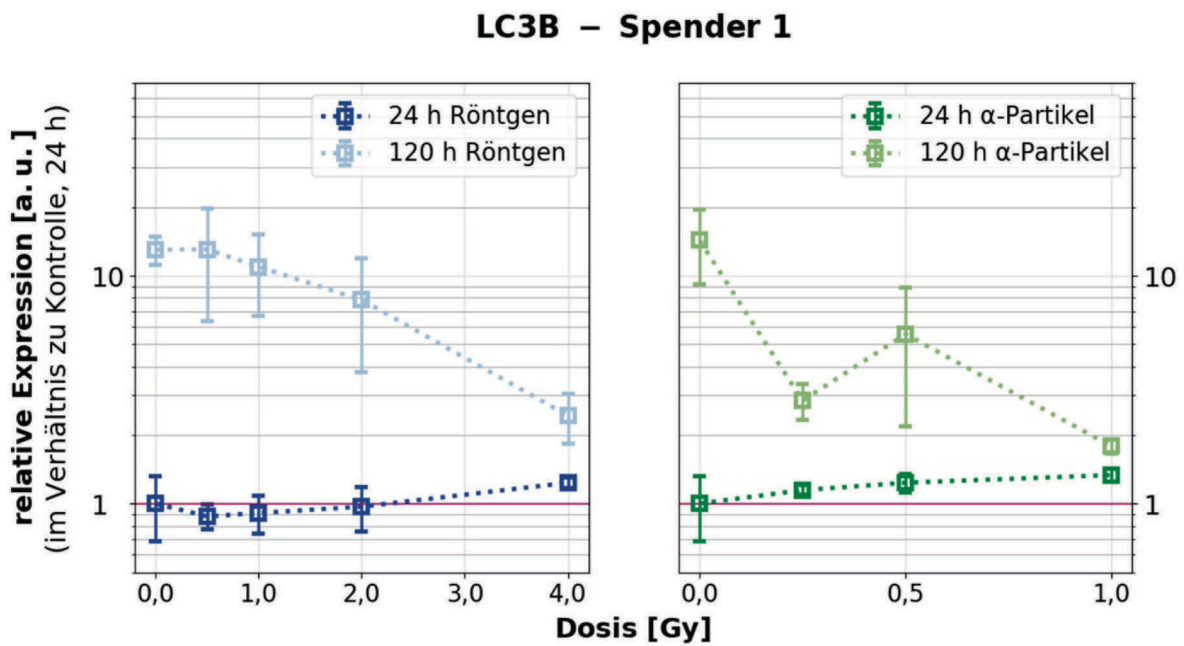


Abbildung 32: Expressionslevel des Autophagiemarkers LC3B der NHBE von Spender 1 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01

## LC3B – Spender 2

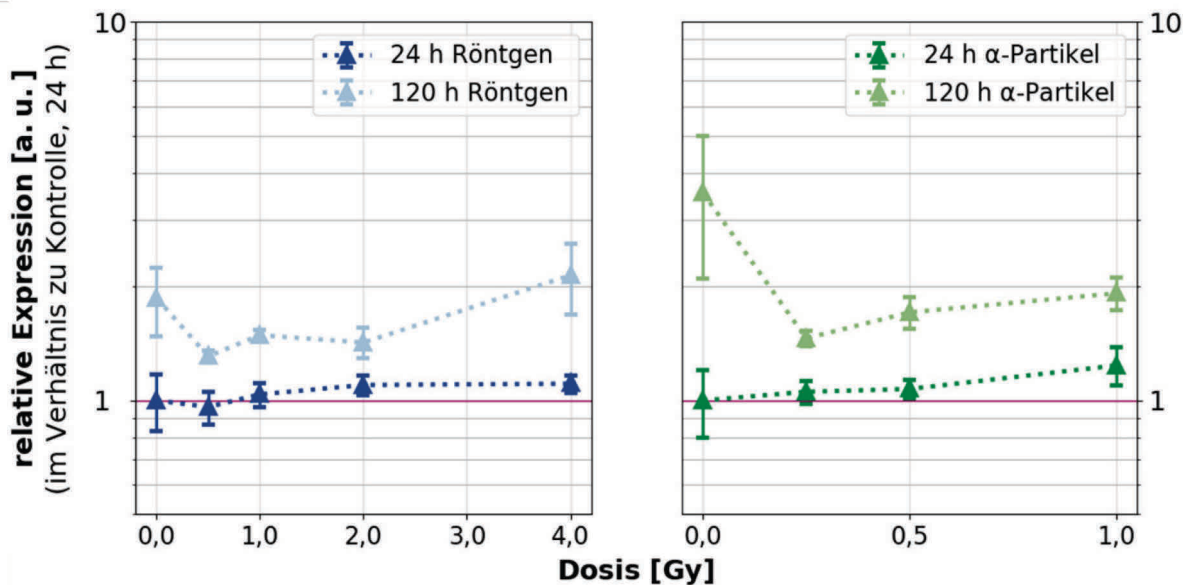


Abbildung 33: Expressionslevel des Autophagiemarkers LC3B der NHBE von Spender 2 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \* ≤ p 0,05

### 3.1.3.4.1. Antikörperfärbung autophagischer Vesikel

Die Zellen beider Spender wurden auf das Protein LC3B, ein Protein in der Membran der autophagischen Vesikel, 24 h nach Bestrahlung mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (siehe Kapitel 2.8.3).

Um zu überprüfen ob die NHBE in die Autophagie eintreten können, wurden die NHBE 24 h in PneumaCult Ex Plus<sup>TM</sup> mit 50 µM Chloroquin kultiviert. Das Chloroquin inhibiert den lysosomalen Abbau von autophagischen Vesikeln, sodass diese akkumulieren [127]. Nach der Chloroquinbehandlung wiesen die Zellen autophagische Vesikel auf, eine eindeutige Zuordnung der Vesikel zu der entsprechenden Autophagie-positiven Zelle war schwierig (siehe Abbildung 34). Weder nach 0,5 – 4,0 Gy Röntgen- noch nach 0,25 – 1,00 Gy α-Partikelbestrahlung war eine Zunahme an autophagischen Vesikeln in den NHBE zu beobachten.

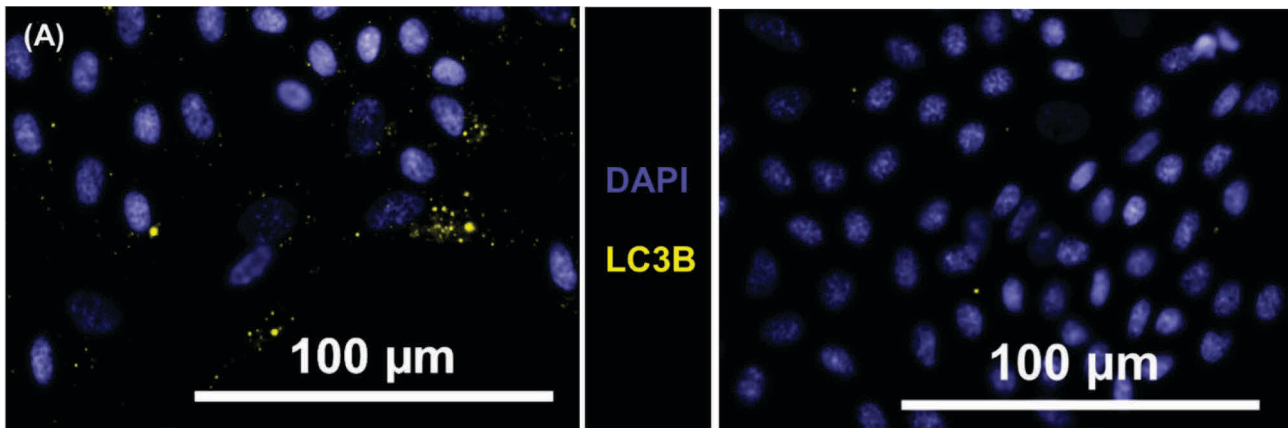


Abbildung 34: (A) Positivkontrolle für den LC3B Antikörper, die Zellen wurden 24 h mit 50 µM Chloroquin kultiviert. (B) unbehandelte NHBE. In Gelb sind die LC3B-positiven autophagischen Vesikel zu sehen, in blau die DAPI gefärbten Nuklei.

### 3.2. Differenzierung von bestrahlten NHBE in ALI Kultur

Die mit niedrigen (0,25 Gy  $\alpha$ -Partikel und 0,5 Gy Röntgenstrahlung) und hohen Dosen (0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel und 2,0 Gy Röntgenstrahlung) bestrahlten NHBE wurden in ALI Kultur kultiviert (siehe Kapitel 2.1.5) und anhand der entscheidenden Zeitpunkte innerhalb des Differenzierungsprozesses die Zeiten für die verschiedenen Endpunkte der Experimente ausgewählt.

#### 3.2.1. Makroskopische Veränderungen im Laufe der Differenzierung

Nachdem der *Airlift* durchgeführt worden war, wurde die Permeabilität für das Medium und das Einsetzen des Zilienschlags analysiert. Der Zellrasen war nach dem *Airlift* noch permeabel für das Medium, sodass sich dieses im Transwelleinsatz sammelte und täglich manuell abgesaugt wurde. In den Kontrollen und mit 0,5 Gy Röntgen und 0,25 Gy  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE war die Zellschicht bereits zwei Tag nach dem *Airlift* nicht mehr permeabel für das Medium. Im Gegensatz dazu musste bei den 2 Gy Röntgen und 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE noch weitere zwei bis drei Tage das Medium täglich aus dem Transwelleinsatz entfernt werden.

Die mikroskopische Überprüfung ergab einen ersten vereinzelt Zilienschlag in den Kontrollepithelien beider Spender im Durchlichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ab 16 – 19 Tage nach dem *Airlift*, in der Regel war vier bis fünf Tage nach dem ersten Zilienschlag ein über das ganze Epithel verteilter Zilienschlag der zilientragenden Zellen zu beobachten. In den Epithelien, die aus bestrahlten NHBE differenziert wurden, war der erste Zilienschlag nach 0,5 Gy Röntgen und 0,25 Gy  $\alpha$ -Partikelbestrahlung zeitgleich oder mit einem Tag Verzögerung, verglichen mit der Kontrolle zu sehen, während eine Bestrahlung mit 2 Gy Röntgen und 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln zu einer Verzögerung von zwei bis drei Tagen führte.

---

Ein Teil des produzierten Mukus wurde in den Kontrollepithelien aus mit niedriger Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel Dosen bestrahlten NHBE differenzierten Epithelien von den Zilien zu einem Agglomerat zusammengeschoben, welches mit dem bloßen Auge sichtbar war (siehe Abbildung 35 (A)). Dieses Phänomen wurde bereits kurz vor oder kurz nach dem ersten Abwaschen des Mukus beobachtet. Bereits am Tag nach dem wöchentlichen Abwaschen des Mukus war wieder ein Mukusagglomerat sichtbar. In den Epithelien aus höher bestrahlten NHBE wurde zu keinem Zeitpunkt ein Agglomerat beobachtet (siehe Abbildung 35 (B)).

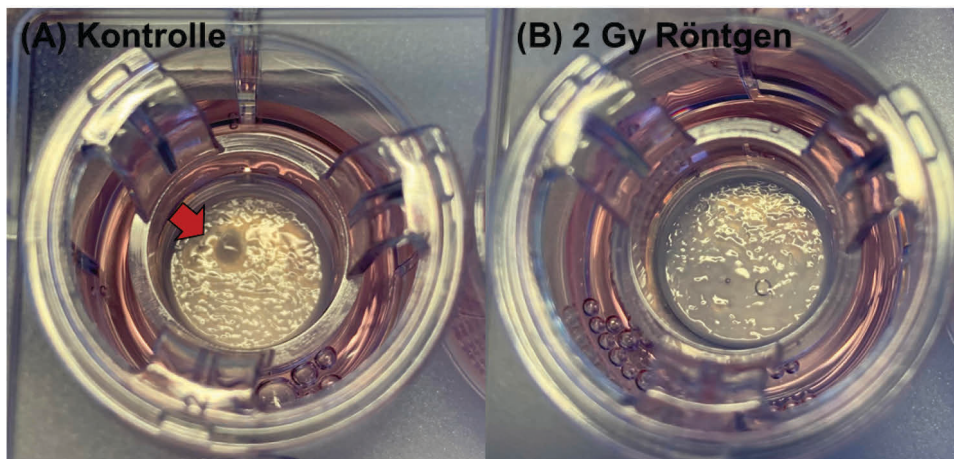


Abbildung 35: Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa inklusive Mukus. (A) Kontrollepithel mit makroskopischer (roter Pfeil) Mukusansammlung (B) Epithel aus 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten NHBE differenziert, zeigt keine Agglomeration von Mukus

### 3.2.2. Expression im Laufe der Differenzierung nach Bestrahlung

Um den Einfluss einer Bestrahlung auf den Verlauf der Differenzierung von NHBE in ALI Kultur zu untersuchen, wurden RNS Proben vor der Bestrahlung im undifferenzierten Zustand und ab der Luftexposition (ALI-Kultur) 7; 14; 21; 28 und 35 Tage genommen und analysiert (siehe Kapitel 2.6). Diese Zeitpunkte wurden anhand der entscheidenden Phasen in der normalen Differenzierung [128] ausgewählt. Alle Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle zum Zeitpunkt 7 dpa normiert. Ein intaktes Bronchialepithel besteht aus Basalzellen, Becherzellen, Clubzellen und zilientragenden Zellen, daher wurden für diese zelltypspezifische Marker ausgewählt. Ebenso wurden Marker für Autophagie, Seneszenz, *tight junctions* und Entzündungsmarker analysiert.

Aufgrund von zu geringen RNS Konzentrationen, wurde nur das mRNS Expressionslevel von KRT14 bei Spender 1 nach  $\alpha$ -Partikelbestrahlung analysiert. Im Laufe der Differenzierung nimmt die KRT14 Expression strahlungsunabhängig um ~75 % ab (siehe Abbildung 36).

## Spender 1 – KRT14

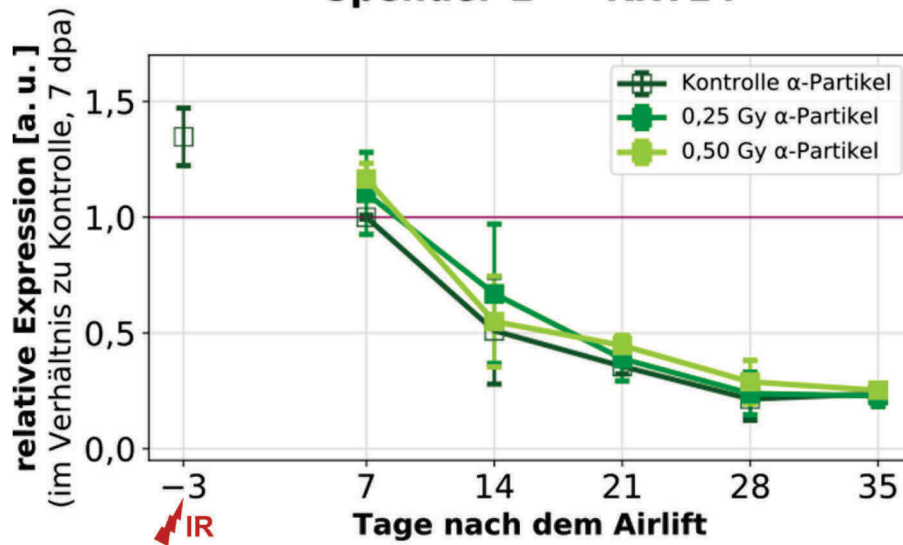


Abbildung 36: Expressionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 der NHBE von Spender 1 nach  $\alpha$ -Bestrahlung. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Auf Ebene des späten Basalzellmarkerlevels KRT5 (Daten gepoolt) war kein direkter Effekt der Bestrahlung der NHBE zu detektieren. Generell nimmt die Expression im Laufe der Differenzierung unabhängig von der Bestrahlung ab (siehe Abbildung 37).

## Spenderdaten gepoolt – KRT5

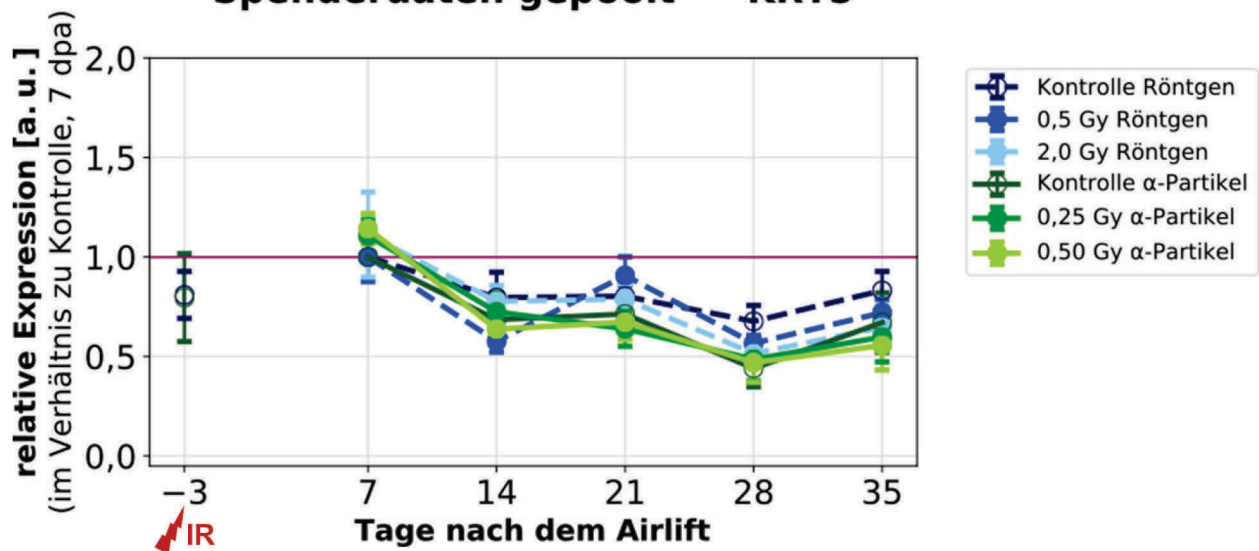


Abbildung 37: Expressionslevel des späten Basalzellmarkers KRT5 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Bei dem MUC5AC Markerlevel wurde ein interindividueller Unterschied in der Strahlenantwort festgestellt (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39). In den Kontrollen war mit einsetzender Differenzierung (7 dpa) ein signifikanter Anstieg um das 99-fache im mRNA Level des

Becherzellmarkers MUC5AC zu messen. Bei den Epithelien, welche aus bestrahlten NHBE von Spender 1 differenziert wurden zeigte sich nach  $\alpha$ -Partikeln ein initialer Anstieg um ~80 % bei 7 dpa, danach glich sich die Expression der Kontrolle an, während nach 2,0 Gy Röntgenstrahlung Bestrahlung eine leichte Zunahme um das Ein- bis Zweifache gegen Ende der Differenzierung zu beobachten war im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Epithelien, welche aus NHBE von Spender 2 differenziert wurden, war nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln eine Verdopplung der Expression bei 7 dpa verglichen mit der Kontrolle zu detektieren, im weiteren Verlauf der Differenzierung näherte sich der Wert dem Kontrollwert an. Im Gegensatz dazu stieg nach 2,0 Gy Röntgenstrahlung das Expressionslevel ab 14 dpa im Vergleich zur Kontrolle stetig an.

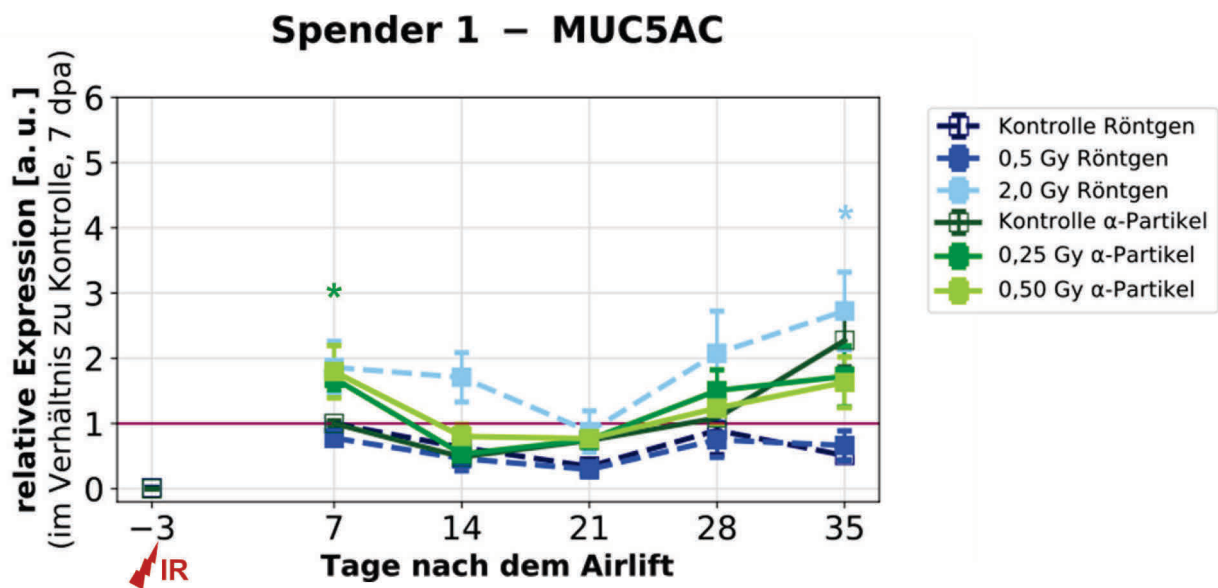


Abbildung 38: Expressionslevel des Becherzellmarkers MUC5AC der NHBE von Spender 1. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p$  0,05



## Spender 2 – MUC5AC

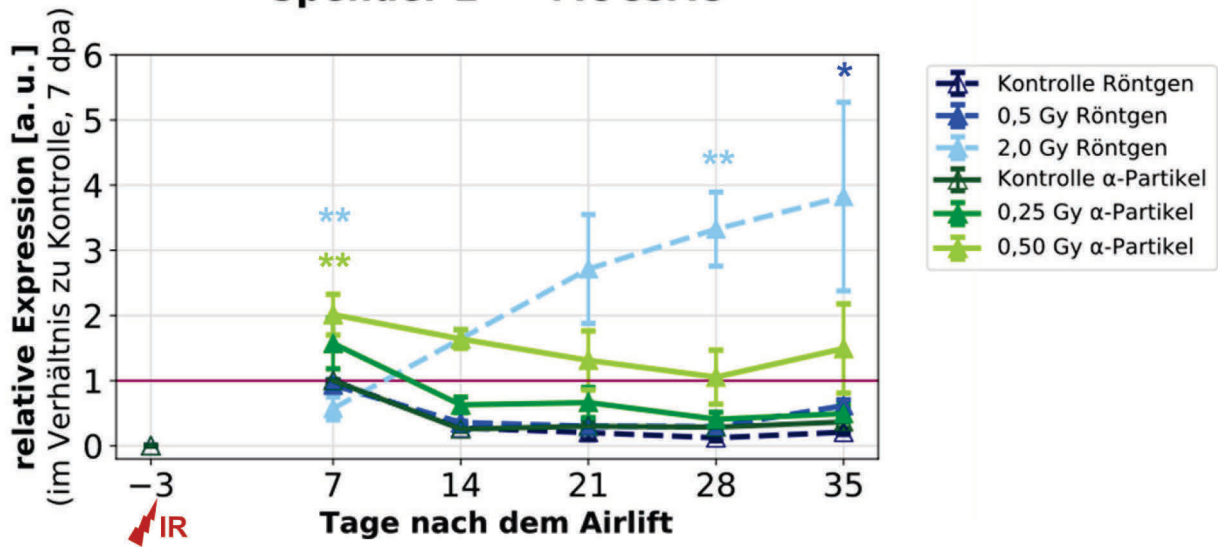


Abbildung 39: Expressionslevel des Becherzellmarkers MUC5AC von der NHBE von Spender 2. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01

Die Analyse des Clubzellmarkers SCGB1A1 zeigte einen interindividuellen Unterschied. Die NHBE von Spender 1 zeigten einen strahlungsunabhängigen Anstieg um das 16-fache im SCGB1A1 Niveau von -3 dpa zu 7 dpa, danach blieb das Niveau konstant (siehe Abbildung 40). Bei den NHBE von Spender 2 war ein Anstieg um das 50-fache zu sehen (siehe Abbildung 41), allerdings stieg das Level nach 2,0 Gy Röntgenbestrahlung über die gesamte Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle um 300 % an. Nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung war ein geringer Anstieg um 10-20 % verglichen mit der Kontrolle zu beobachten.

## Spender 1 – SCGB1A1

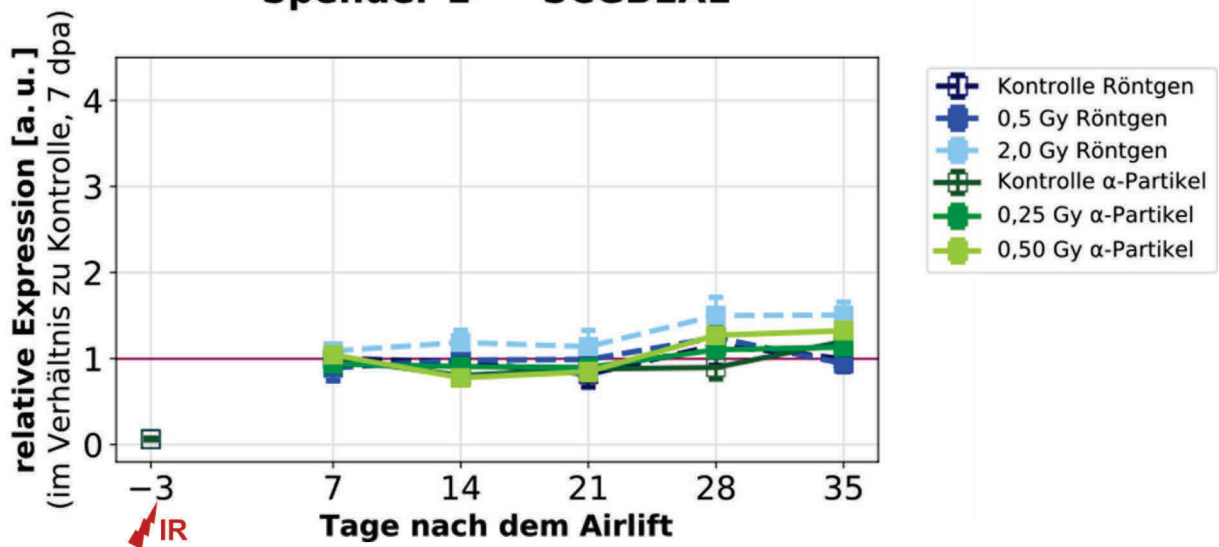


Abbildung 40: Expressionslevel des Clubzellmarkers SCGB1A1 der NHBE von Spender 1. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

## Spender 2 – SCGB1A1

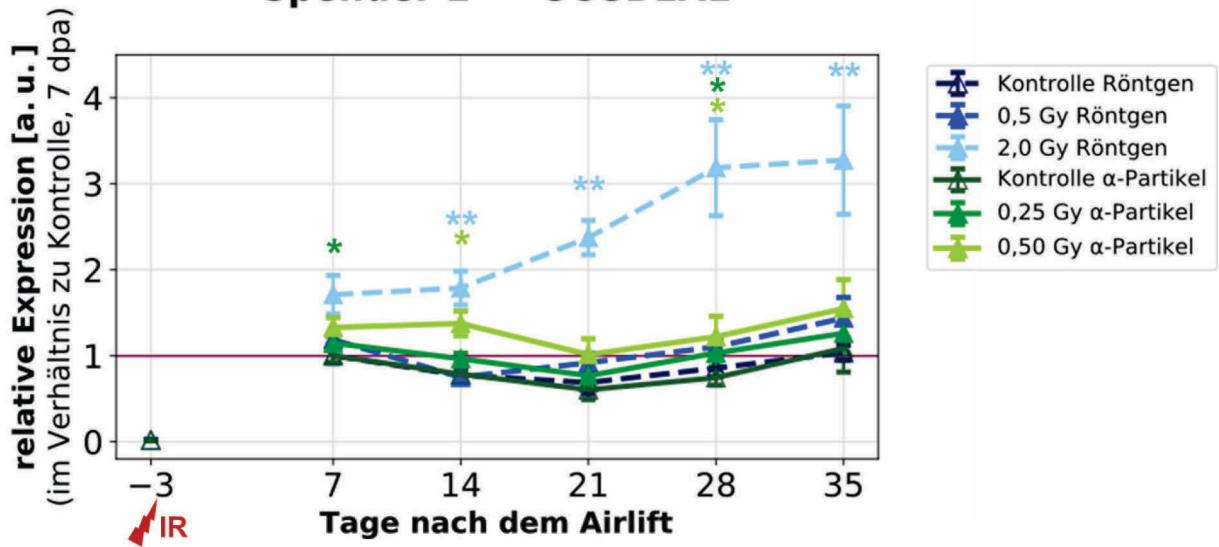


Abbildung 41: Expressionslevel des Clubzellmarkers SCGB1A1 der NHBE von Spender 1. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p 0,05$ ; \*\*  $\leq p 0,01$

FOXJ1 ist spezifisch für ziliotragende Zellen, mit einsetzender Expression wird die Ziliogenese induziert [129].

Die Quantifizierung des relativen Expressionslevels von FOXJ1 zeigte einen deutlichen interindividuellen Unterschied. Bei Spender 1 (siehe Abbildung 42) lag dieses bei den Epithelien aus  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE um das etwa 10-fache niedriger als bei Spender 2 (siehe Abbildung 43), bei den Epithelien aus Röntgenstrahlen bestrahlten NHBE war es etwa um das 3-fache. Zum Zeitpunkt -3 dpa wurde kein FOXJ1 exprimiert, mit dem Einsetzen der Differenzierung stieg es signifikant an. Sieben Tage nach dem *Airlift* war das FOXJ1 Markerlevel nach Bestrahlung signifikant niedriger als bei den Kontrollen (siehe Abbildung 42 und Abbildung 43). Diese Reduktion war nach 2,0 Gy Röntgenstrahlung bei den NHBE von Spender 2 deutlich stärker ausgeprägt als bei Spender 1. Nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln war es um 75 % reduziert, während 0,5 Gy Röntgenstrahlung nur zu einer Reduktion um etwa 25 % führen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung war kein Strahleneffekt auf FOXJ1 mRNA Ebene mehr zu detektieren.

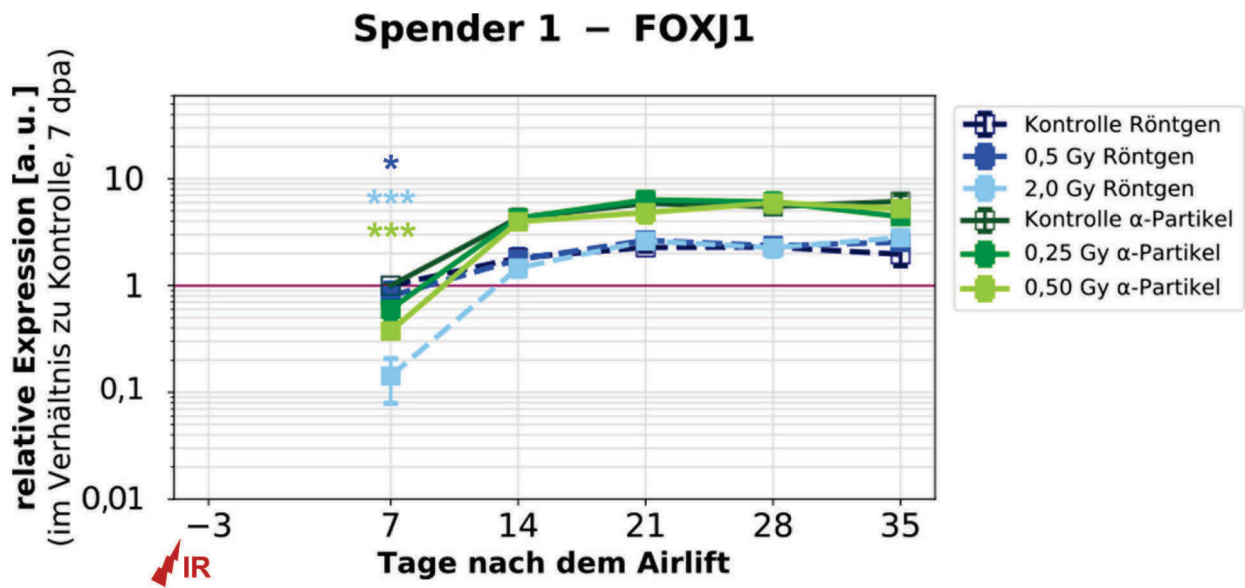


Abbildung 42: Expressionslevel des Flimmerepithelmarkers FOXJ1 der NHBE von Spender. Zum Zeitpunkt -3 dpa wurde kein FOXJ1 exprimiert. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01; \*\*\*  $\leq p$  0,001

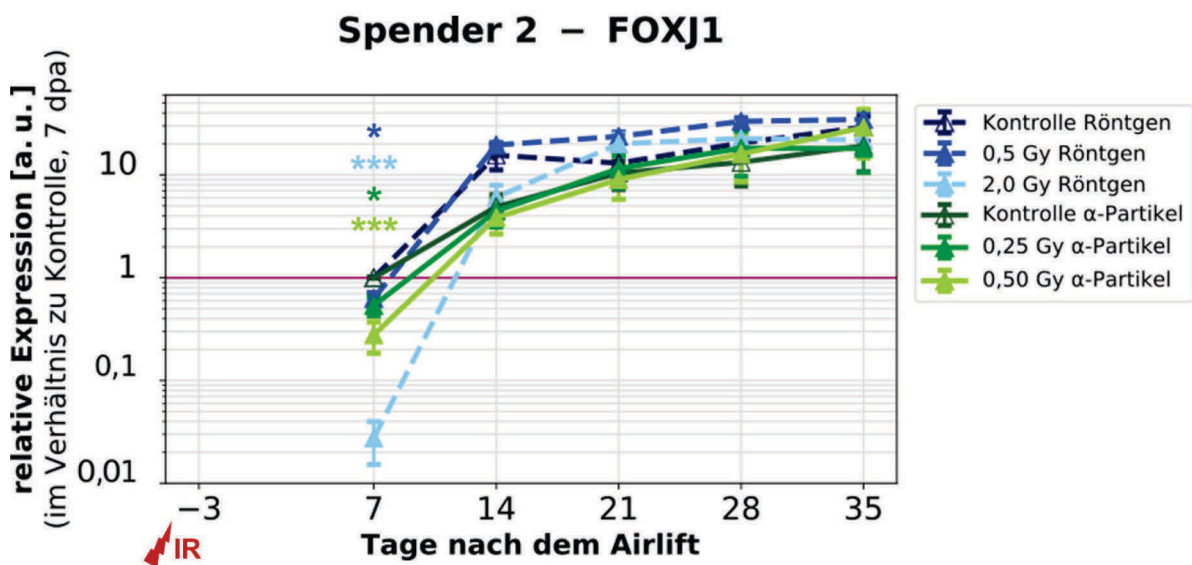


Abbildung 43: Expressionslevel des Flimmerepithelmarkers FOXJ1 der NHBE von Spender. Zum Zeitpunkt -3 dpa wurde kein FOXJ1 exprimiert. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01; \*\*\*  $\leq p$  0,001

Wie bei den undifferenzierten NHBE, wurde auch für die in ALI differenzierten NHBE die zwei Seneszenzmarker p16 und p21 analysiert, aufgrund von zu geringen RNS Konzentrationen wurde für p21 nur die Differenzierung nach  $\alpha$ -Partikelbestrahlung untersucht. Bei beiden Markern wurde kein interindividueller Unterschied im Expressionslevel gemessen.

Das Expressionslevel der p16 mRNS stieg im gesamten Verlauf der Differenzierung im Vergleich zum Ausgangswert an (siehe Abbildung 44), ein Strahleneffekt war allerdings nicht festzustellen.

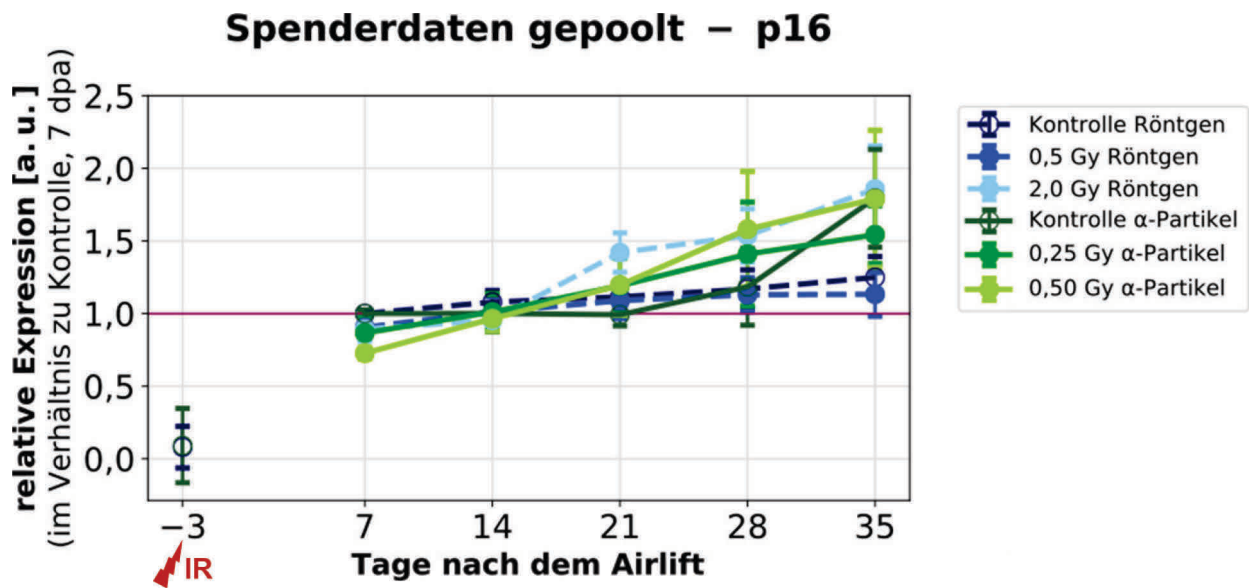


Abbildung 44: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p16 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben die SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Das Markerlevel von p21 blieb relativ konstant bei dem Expressionslevel zu Beginn der Differenzierung (siehe Abbildung 45), die Werte nach α-Partikelbestrahlung lagen im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht, der Anstieg war allerdings nicht signifikant.

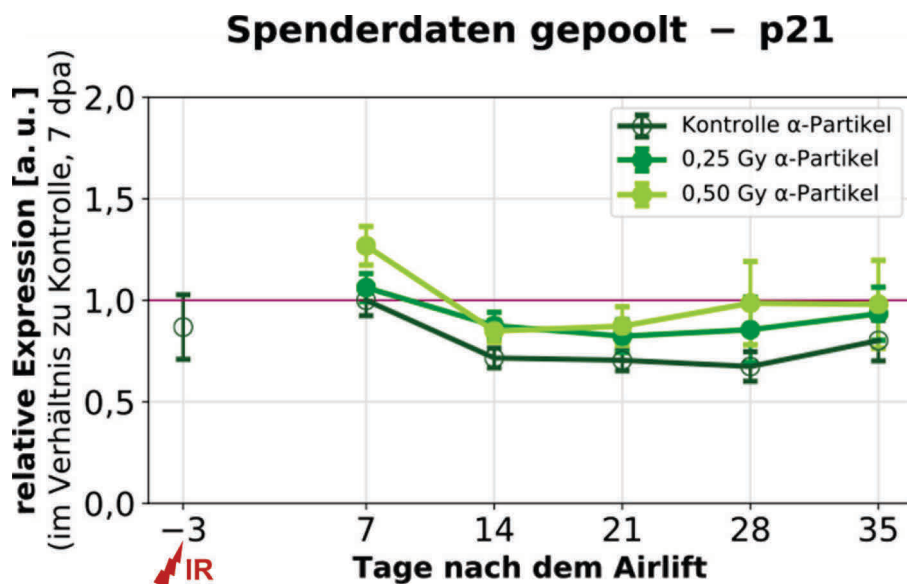


Abbildung 45: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p21 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Das LC3B Markerniveau als Indikator für die Autophagie konnte aus zu geringen RNS Proben ebenfalls nur für die Epithelien aus  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE analysiert werden, ebenso fehlt der Zeitpunkt der Bestrahlung. Es war über den Zeitraum der Untersuchung ein stetiger Anstieg des LC3B Markerlevels zu messen (siehe Abbildung 46). Mit Abschluss der Differenzierung lagen die Werte nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle höher. Aufgrund der hohen Fehlerbalken war dieser Unterschied nicht signifikant.

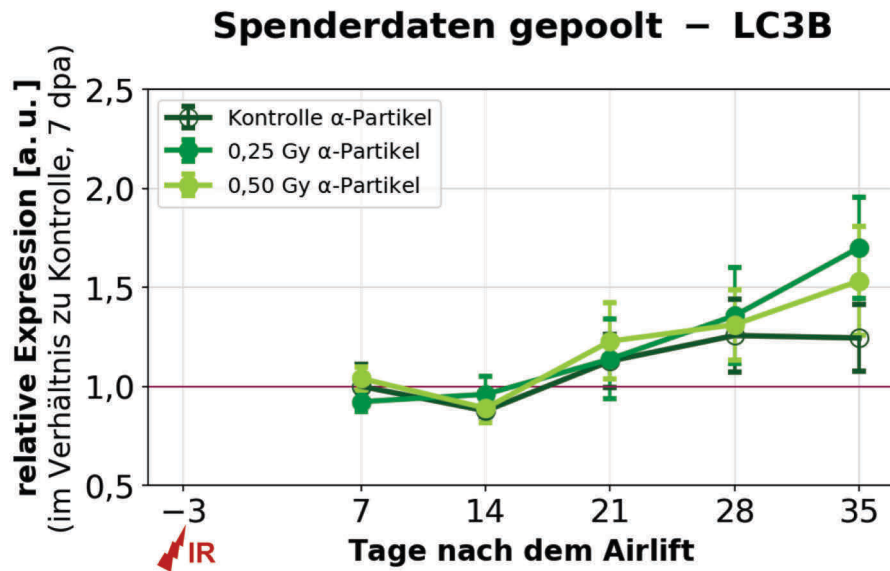


Abbildung 46: Expressionslevel des Autophagiemarkers LC3B der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Als Entzündungsmarker wurden die beiden proinflammatorischen Zytokine IL8 [130] und IL1 $\beta$  [131] ausgewählt.

Das Level des Markers für das proinflammatorische Zytokin IL8 sank mit Beginn der Differenzierung in Relation zu -3 dpa signifikant ab, und das mRNA Niveau blieb konstant (siehe Abbildung 47). Ein interindividueller Unterschied oder eine Auswirkung der Strahlung auf das Expressionslevel wurde nicht festgestellt.

## Spenderdaten gepoolt – IL8

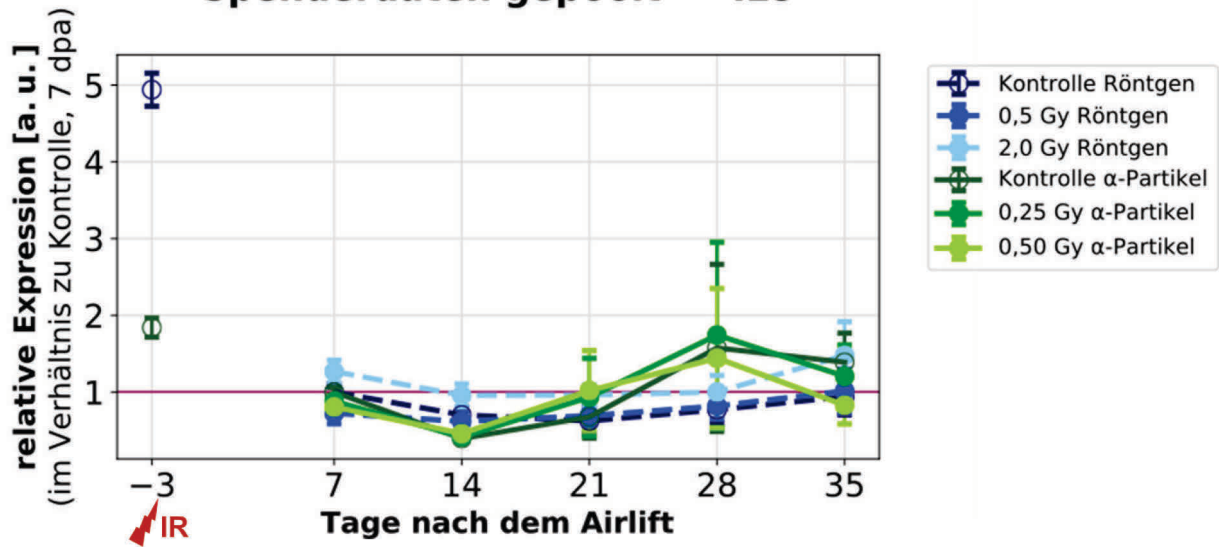


Abbildung 47: Expressionslevel des proinflammatorischen Markers IL8 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3

Auch das Markerlevel des proinflammatorischen Zytokines IL1 $\beta$  sank von -3 dpa zu 7 dpa in der Röntgen Kontrolle um das 141-fache und in der  $\alpha$ -Partikel Kontrolle um das 52-fache ab, daher sind diese Punkte nicht im Plot dargestellt, sondern nur der Zeitraum 7 dpa bis 35 dpa (siehe Abbildung 48). Ein interindividueller Unterschied wurde nicht festgestellt. Nach 2 Gy Röntgenstrahlung blieb das IL1 $\beta$  Markerlevel den kompletten Untersuchungszeitraum erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Nach Bestrahlung der NHBE mit  $\alpha$ -Partikeln änderte sich das Niveau nur zu Beginn der Differenzierung, danach glich sich das Level der Kontrolle an.

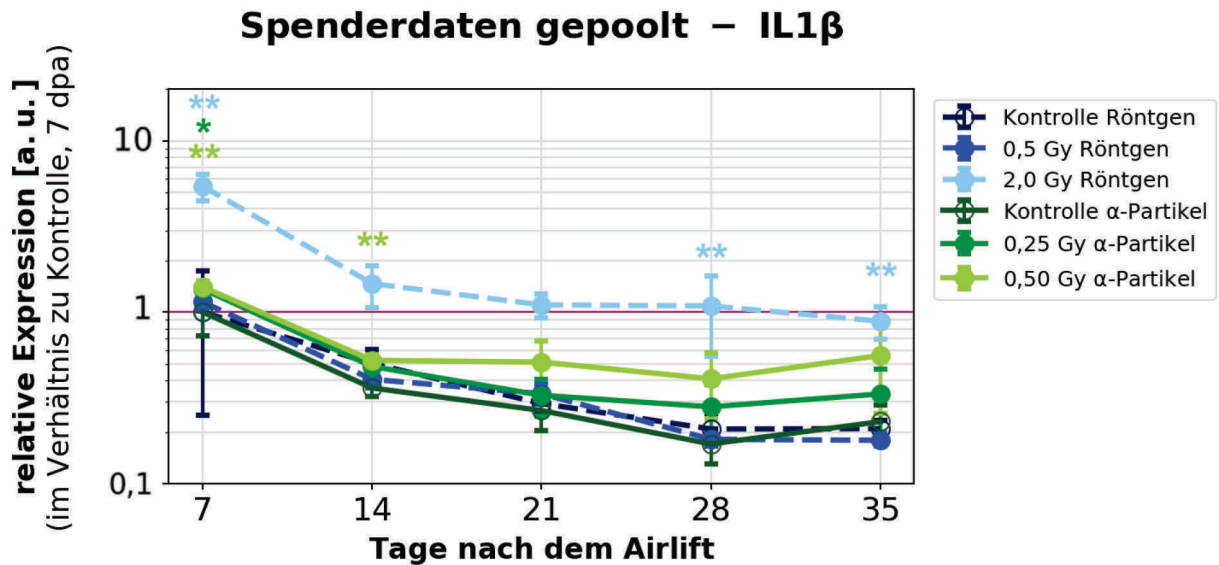


Abbildung 48: Expressionslevel des proinflammatorischen Markers IL1 $\beta$  der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; \*  $\leq$  p 0,05; \*\*  $\leq$  p 0,01

### 3.2.3. Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf die Morphologie und Funktion des aus den bestrahlten NHBE differenzierten Epithels

Für die Analyse der Morphologie des vollständig differenzierten Epithels, wurde am 35 dpa das Epithel fixiert, später Kryoschnitte angefertigt und diese mittels Antikörperfärbung auf die verschiedenen Zelltypen angefärbt (siehe Kapitel 2.7). Die vier Zelltypen Basal-, Becher-, Club- und zilientragende Zellen wurden im Epithel identifiziert (siehe Abbildung 49).

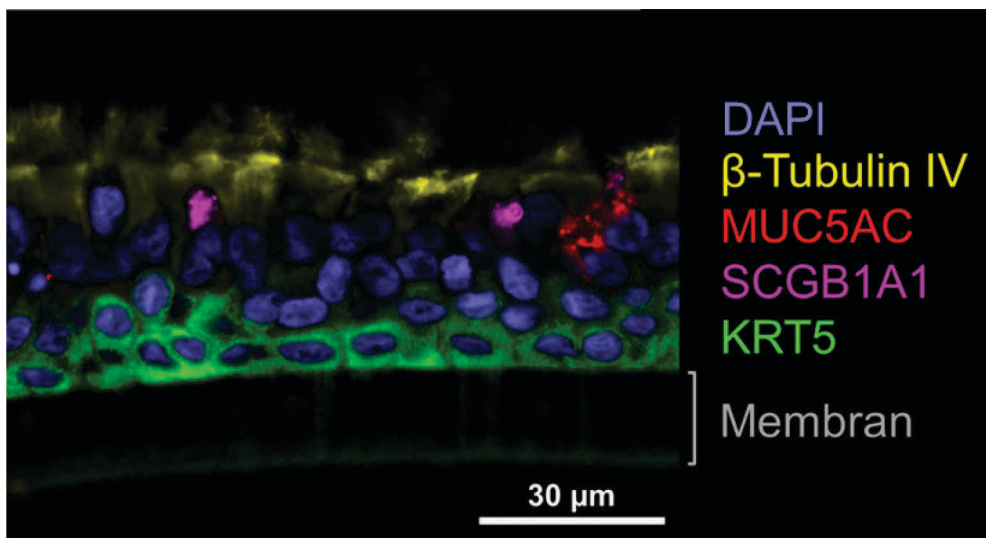


Abbildung 49: Immunocytochemisch gefärbter Kryoschnitt (4  $\mu$ m) eines 35 dpa Bronchialepithels. Das  $\beta$ -Tubulin IV markiert in Gelb die zilientragenden Zellen, MUC5AC in Rot die Becherzellen, SCGB1A1 in Pink die Clubzellen und KRT5 markiert in Grün die Basalzellen welche direkt auf der Membran (grau) des Transwelleinsatzes wachsen. Die Nuklei sind mit DAPI blau gefärbt.

Die Höhe des Epithels und die Länge der Zilien wurde für beide Spender an je drei Kryoschnitten aus wiederum drei separaten Epithelien an mindestens 20 Stellen gemessen. Daraus ergab sich für Spender 1 eine Epithelhöhe von  $37,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$  (MW  $\pm$  SD) und  $34,7 \pm 2,6 \mu\text{m}$  für Spender 2 (siehe Abbildung 50). Eine Zilienlänge von  $7,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$  wurde bei Spender 1 und  $7,3 \pm 2,6 \mu\text{m}$  für Spender 2 bestimmt

Nach Bestrahlung wurden nur je zwei Epithelien nach 2 Gy Röntgenstrahlung und 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln untersucht. Bei Spender 1 zeigte sich nach beiden Strahlenqualitäten eine Reduktion der Epithelhöhe, während sie bei Spender 2 unverändert blieb. Eine signifikante Veränderung der Zilienlänge nach Bestrahlung wurde nicht ermittelt.

### Epitheldicke und Zilienlänge

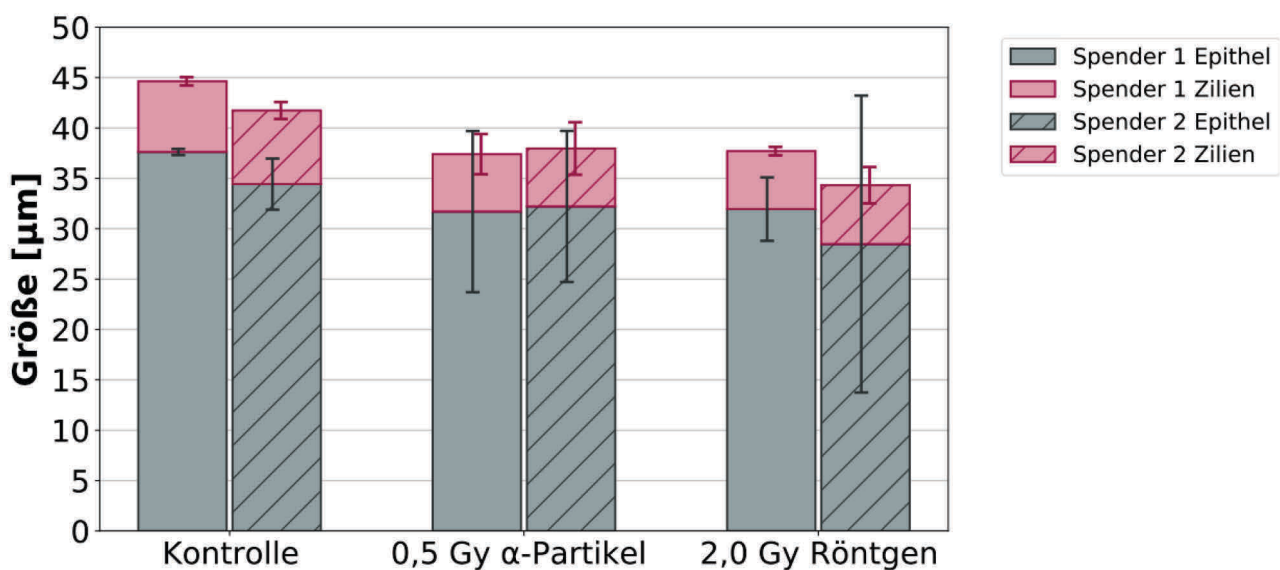


Abbildung 50: Darstellung der Epitheldicke und Zilienlänge der Bronchialepithelien, welche aus bestrahlten NHBE differenziert wurden, zum Zeitpunkt 35 dpa. Die Fehlerbalken geben den SD an.

Der prozentuale Anteil der vier Zelltypen wurde für beide Spender in je drei Epithelien, welche aus unbestrahlten NHBE differenziert wurden, an fünf unabhängigen Stellen anhand von über 2500 Zellen mit DotDot Goose ausgezählt. Zellen, die nicht eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden konnten, wurden als nicht zuordenbar gezählt. Für Spender 1 ergab sich eine Zellzusammensetzung von  $51,6 \pm 6,3 \%$  Basalzellen,  $33,4 \pm 5,2 \%$  zilientragende Zellen,  $4,1 \pm 1,9 \%$  Clubzellen,  $4,1 \pm 1,9 \%$  Becherzellen und  $7,3 \pm 5,6 \%$  der Zellen konnten nicht eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden (siehe Abbildung 51). Für Spender 2 ergab sich eine Zellzusammensetzung von  $43,0 \pm 9,1 \%$  Basalzellen,  $31,9 \pm 4,4 \%$  zilientragende Zellen,  $3,6 \pm 3,3 \%$  Clubzellen,  $7,0 \pm 5,0 \%$  Becherzellen und  $14,5 \pm 10,3 \%$  nicht zuzuordnende Zellen. Der Stichprobenumfang für die Epithelien aus bestrahlten NHBE war zu gering, sodass eine eindeutige Aussage über den Einfluss der Strahlung auf die Zellkomposition des Epithels nicht getroffen werden konnte.



## Zellkomposition im Epithel

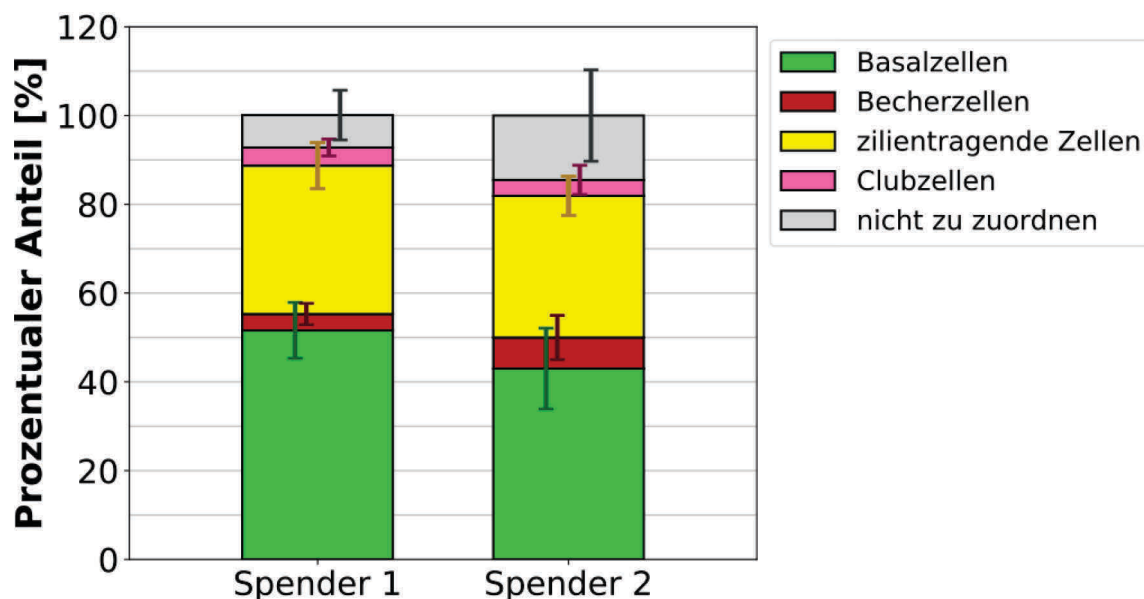


Abbildung 51: Zellkomposition der Bronchialepithelien, welche aus unbestrahlten NHBE differenziert wurden, zum Zeitpunkt 35 dpa. Die Fehlerbalken geben den SD an.

### 3.2.3.1. Mukoziliärer Transport

Der mukoziliäre Transport (MCT) wurde zum Zeitpunkt 35 dpa mittels Video erfasst und anschließend mit der Software ImageD auf die Parameter mittlere Geschwindigkeit, Winkelgeschwindigkeit und koordinierten Transport hin ausgewertet und analysiert (siehe Kapitel 2.9).

Bei allen drei Parametern sind große Schwankungen innerhalb der Experimente deutlich, daher wurden die Daten beider Spender nicht gepoolt, da ein interindividueller Unterschied nicht ausgeschlossen werden konnte (komplette Daten siehe Anhang).

Die mittlere Geschwindigkeit der Kontrollen wies große Schwankungen auf. Bei den Epithelien von Spender 1 lag die mittlere Geschwindigkeit des MCT bei  $80,4 \pm 14,8 \mu\text{m/s}$  (MW  $\pm$  SEM) in der  $\alpha$ -Kontrolle und bei  $46,4 \pm 16,2 \mu\text{m/s}$  in der Röntgen-Kontrolle. Bei Spender 2 lag sie in der  $\alpha$ -Kontrolle bei  $53,7 \pm 23,0 \mu\text{m/s}$  und in der Röntgenkontrolle bei  $49,8 \pm 15,6 \mu\text{m/s}$ . Die mittlere Geschwindigkeit des MCT des aus 2,0 Gy Röntgenstrahlung oder 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE differenzierten Epithels war im Vergleich zur Kontrolle um etwa 50 % geringer (siehe Abbildung 52). Eine Ausnahme zeigte sich bei den Epithelien aus den 2 Gy Röntgen bestrahlten NHBE von Spendern 2, hier zeigte sich eine Reduktion der mittleren Geschwindigkeit um über 90 %. Durch den großen Stichprobenumfang lässt sich trotz der Schwankungen auf eine dosisabhängige Reduktion der mittleren Geschwindigkeit schließen, betrachtet man die lineare Regression der MW inklusive des SEM (siehe Abbildung 53).

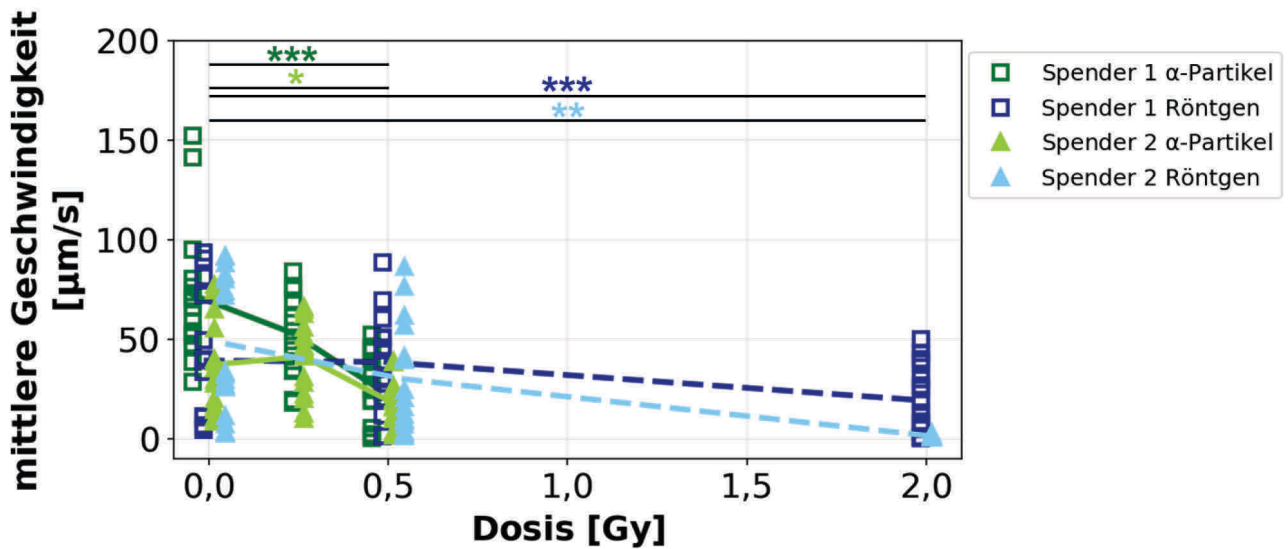


Abbildung 52: Mittlere Geschwindigkeit des MCT der aus NHBE differenzierten Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa. N=3; n=6; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01; \*\*\*  $\leq p$  0,001

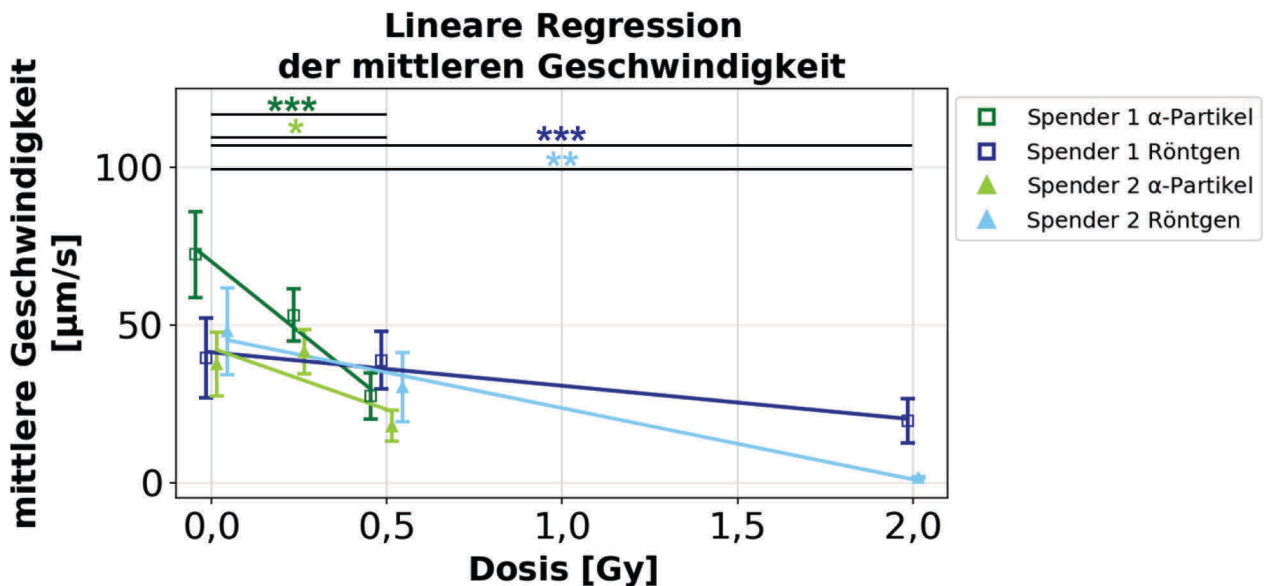


Abbildung 53: Lineare Regression der mittleren Geschwindigkeit des MCT über die MW und den SEM zum Zeitpunkt 35 dpa. N=3; n=6; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01; \*\*\*  $\leq p$  0,001

Für die Bestimmung der Winkelgeschwindigkeit wurden 55 % der Videos aufgrund von unplausiblen Wirbelzentren ausgeschlossen (geringe Robustheit bei der Bestimmung der Wirbelzentren). Die Analyse der verbliebenen Videos zeigte eine mittlere Winkelgeschwindigkeit der Epithelien aus den  $\alpha$ -Partikel scheinbestrahlten NHBE von  $0,091 \pm 0,014$  Grad/s in den Epithelien aus Röntgenstrahlen scheinbestrahlten NHBE wurden  $0,117 \pm 0,050$  Grad/s gemessen. Bei Spender 2 wurden in der  $\alpha$ -Partikel Kontrolle  $0,055 \pm 0,019$  Grad/s ermittelt und in der Röntgenkontrolle  $0,066 \pm 0,024$  Grad/s. Eine Reduktion der Winkelgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle wurde

sowohl nach Röntgen- als auch nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung, mit Ausnahme der Epithelien aus  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE von Spender 2, festgestellt (siehe Abbildung 54).

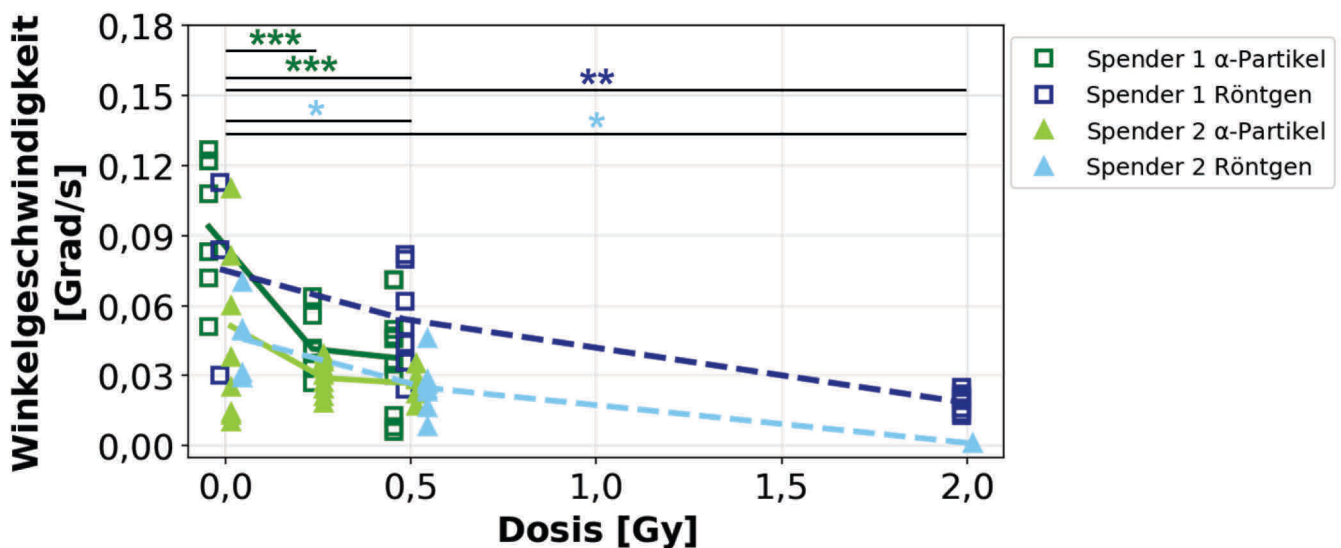


Abbildung 54: Winkelgeschwindigkeit des MCT der aus NHBE differenzierten Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa. N=3; n=6; \*  $\leq p$  0,05; \*\*  $\leq p$  0,01; \*\*\*  $\leq p$  0,001

Die Winkelschwankung der mittleren Bewegung des MCT wurde als Parameter für die Koordination des MCT ausgewählt. Je stärker die Richtung der Bewegung variiert, desto geringer ist die Koordination der gerichteten Bewegung. Die Winkelschwankung war in den Epithelien, welche aus unbestrahlten und bestrahlten NHBE differenziert wurden, mit etwa  $100 \pm 40$  Grad sehr breit gefächert (Daten nicht gezeigt). Ein interindividueller Unterschied konnte nicht beobachtet werden. Ein Anstieg war bei 0,25 Gy  $\alpha$ -Partikeln zu detektieren und eine Reduktion bei 2 Gy Röntgenstrahlung im Vergleich zur Kontrolle. Eine quantitative Aussage über die Veränderung der Koordination durch die Bestrahlung konnte aufgrund der noch nicht korrekt implementierten Parameter für die Koordination nicht getroffen werden. Aktuell berechnet die Software nur für annähernd lineare Bewegungen ein realistisches Maß für die Koordination. Für andere Bewegungsmuster, wie den Wirbel, muss die Software dahingehend angepasst werden, dass nur Abweichungen von einer erkannten Laufbahn gewertet werden. Dies zeigt sich darin, dass ein Wirbelzentrum, welches das höchste Maß an Koordination darstellt, von der Software aufgrund der vielen Bewegungsrichtungen der Sphären als maximal unkoordiniert erkannt wird.

Anhand der Videos wurde qualitativ eine Abnahme der Koordination des MCT der Epithelien aus mit hohen Dosen Röntgenstrahlen und  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE im Vergleich zu unbehandelten NHBE festgestellt.

Die entwickelte Software weist noch Probleme hinsichtlich der benötigten Messgenauigkeiten auf, sodass bei den verschiedenen Parametern der Selbstreinigung kein interindividueller Unterschied

festgestellt wurde. Qualitativ war nach den hohen Dosen eine Reduktion der Geschwindigkeit und der Koordination des MCT im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel führten zu einem ähnlichen Effekt, wie 2,0 Gy Röntgenstrahlung. Für eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Reduktion ist noch weitere Entwicklungsarbeit beim Algorithmus zur Detektion des Bewegungsablaufs, gerade was die Zuverlässigkeit und die Robustheit betrifft, notwendig.

### 3.2.3.2. Transepithelialer elektrischer Widerstand

Der transepitheliale elektrische Widerstand wurde zum Zeitpunkt 35 dpa gemessen (siehe Kapitel 2.10) um zu gewährleisten, dass ein vollständig differenziertes Epithel vorliegt. Der TEER der Epithelien aus scheinbestrahlten NHBE von beiden Spendern war signifikant unterschiedlich. Die Epithelien aus bestrahlten NHBE von Spender 1 waren mit  $187,8 \pm 11,2 \Omega \times \text{cm}^2$  (MW  $\pm$  SEM) in der Röntgenkontrolle und  $177,2 \pm 9,4 \Omega \times \text{cm}^2$  in der  $\alpha$ -Partikel Kontrolle deutlich niedriger als die von Spender 2 mit  $459,0 \pm 31,6 \Omega \times \text{cm}^2$  und  $356,5 \pm 12,0 \Omega \times \text{cm}^2$ .

Nach Röntgenstrahlung war eine Zunahme nach 2 Gy Röntgenstrahlung von  $27,1 \pm 2,8 \%$  bei Spender 1 und  $17,3 \pm 0,9 \%$  bei Spender 2 messbar (siehe Abbildung 55). Die Epithelien, welche aus  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE differenziert wurden, zeigten eine dosisabhängige Zunahme des TEERs. Nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln war bei Spender 1 ein Anstieg um  $41,9 \pm 6,3 \%$  und bei Spender 2 um  $21,5 \pm 9,1 \%$  zu sehen. Bei den niedrigen Dosen ist mit Ausnahme der Epithelien aus 0,25 Gy  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE von Spender 2 kein Anstieg im TEER zu beobachten.

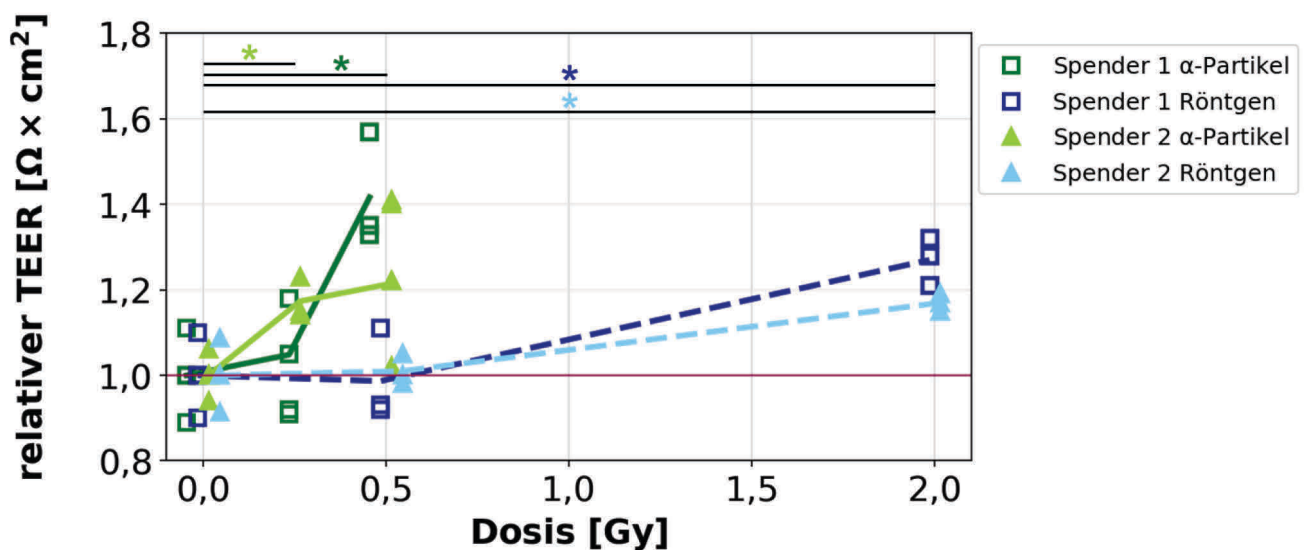


Abbildung 55: Relativer TEER der aus den NHBE der beiden Spender differenzierten Bronchialepithelien zum Zeitpunkt 35 dpa. Die Linien verbinden die Mittelwerte der gemessenen Werte. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle gesetzt (pinke Linie). N=3; n=4; \*  $\leq$  p 0,05

### 3.2.3.2.1. Immunfluoreszenzfärbung des *tight junction* Markers ZO-1

Ein weiteres Maß für die Permeabilität ist auch die Anzahl an *tight junctions* zwischen den zilientragenden und den Becherzellen, als Marker für *tight junctions* kann ZO-1 verwendet werden [132]. Dafür wurde das ZO-1 Protein in 4 µm dünnen Kryoschnitten von Bronchialepithelien in ALI-Kultur 35 dpa mittels Immunfluoreszenz angefärbt (siehe Kapitel 2.7.3). Die Epithelien bilden an der apikalen Seite *tight junctions* aus. In den Epithelien, welche aus 2 Gy Röntgenstrahlung oder 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln bestrahlten NHBE differenziert wurden, wurde keine eindeutige Zunahme oder Abnahme des ZO-1 Proteins im Vergleich zu Epithelien aus unbestrahlten NHBE ermittelt. Eine quantitative Bestimmung der Signalstärke war aufgrund von Artefakten mit starker Fluoreszenz nicht möglich (siehe Abbildung 56). Sobald die Artefakte in der Nähe der apikalen Seite des Epithels lokalisiert waren, überdeckte ihre Fluoreszenz das schwächere Signal des ZO-1. Die Artefakte waren auch durch optimierte Waschschriffe und einen anderen Sekundärantikörper nicht zu entfernen.

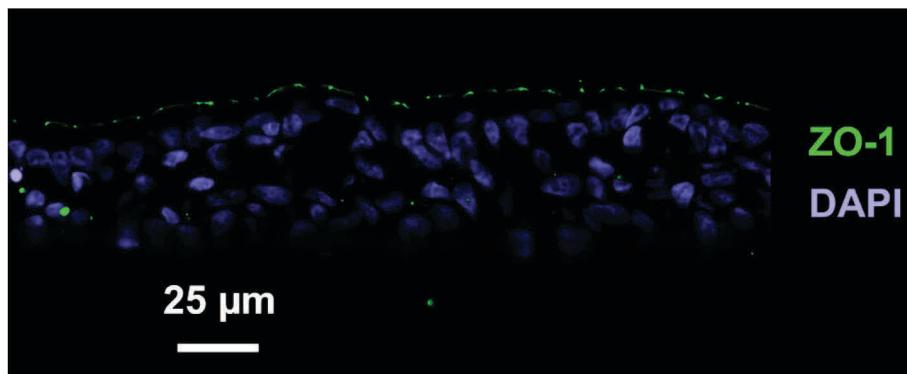


Abbildung 56: Bronchialepithel in ALI Kultur 35 dpa (4 µm Kryoschnitt) gefärbt auf den *tight junction* Marker ZO-1 (grün) und die mit DAPI gegengefärbten Nuklei (blau). An der apikalen Seite des Epithels ist das ZO-1 lokalisiert, innerhalb des Epithels sind grün fluoreszierende Artefakte deutlich zu erkennen.

---

## 4. Diskussion

---

### 4.1. Strahlenreaktion von primären humanen Bronchialepithelzellen

---

#### 4.1.1. Charakterisierung der unbestrahlten Bronchialepithelzellen

---

Die NHBE wurden erstmalig an der GSI eingesetzt, daher wurden die undifferenzierten NHBE zuerst charakterisiert (siehe Kapitel 3.1.1). Interindividuelle Unterschiede zwischen den NHBE verschiedener Spender, besonders im Bereich der Differenzierung und in der Reaktion auf Noxen, sind bekannt [116], [133]. Um diese möglichen Unterschiede zu detektieren wurden NHBE, die primären Stammzellen des Bronchialepithels, von zwei Spendern für die Versuche verwendet. Die NHBE wiesen wie in der Literatur beschrieben [134], eine quaderförmige Morphologie auf und waren zu über 98 % positiv auf den Basalzellmarker KRT5.

Das Wachstum wurde analysiert und eine Verdopplungszeit von  $7,2 \pm 0,1$  h bei den NHBE von Spender 1 und  $13,5 \pm 1,7$  h für die NHBE von Spender 2 sowohl mittels Wachstumskurve als auch via EdU/BrdU/Ki67 Färbung bestimmt. Sie ist um über 50 % niedriger als die in dem Analysezertifikat von Lonza angegebenen Verdopplungszeit. Dieser gravierende Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass verschiedene Zellkulturmedien verwendet wurden (siehe Kapitel 2.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das PneumaCult Ex Plus™ Medium von Stemcell anstelle von BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium von Lonza verwendet, das zu einem besseren Wachstum (d.h. einer kürzere Verdopplungszeit) führt [38], [116], [135]. Da beide Hersteller keine genauen Angaben zu Komponenten des Mediums angeben, kann das Supplement, das für das verbesserte Wachstum verantwortlich ist, nicht identifiziert werden.

Auf mRNA Ebene wurden der Lungenzellenmarker Nkx2.1, der Basalzellenmarker KRT5, der Becherzellenmarker MUC5AC und der Seneszenzmarker p16 über die Passagen zwei bis sieben analysiert. Nkx2.1 ist essentiell für die Plastizität der Lungenstammzellen [136] und sank im Laufe der Passagen stark ab. Im Laufe der Passagen blieben der Basalzellmarker und der Becherzellmarker nahezu konstant. Dies spricht dafür, dass es sich weiterhin hauptsächlich um Basalzellen handelt, nur  $1,9 \pm 0,2$  % der NHBE differenzieren im Lauf der Passagen spontan zu Becherzellen (siehe Kapitel 3.1.3.2.1). Der Seneszenzmarker p16 stieg ab Passage 5 an. Auch Munye et al beschreiben einen Anstieg von p16 via Western Blot bei regulär passagierten NHBE ab Passage 4 [137]. Ab Passage 5 eignen sich die Basalzellen nicht mehr für die Differenzierung in ein funktionales Bronchialepithel [116]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die NHBE beider Spender Eigenschaften aufweisen, die mit denen in der Literatur angegebenen Werten übereinstimmen.

---

#### 4.1.2. Strahlung reduziert die Proliferationsfähigkeit und das klonogene Überleben

---

Bei der Antikörperfärbung des Proliferationsmarkers Ki67 (siehe Kapitel 3.1.2.3.1) zeigte sich ebenfalls ein Unterschied zwischen den NHBE der beiden Spender, allerdings nur nach  $\alpha$ -Partikelexposition. Es wurde eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Ki67-positiven Zellen nach Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung festgestellt. Die  $\alpha$ -Partikel führten zu einer deutlicheren Reduktion der proliferierenden Zellen als die Isodosis Röntgenstrahlung (siehe Abbildung 23). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch den unterschiedlichen LET der beiden Strahlenqualitäten begründet. Die  $\alpha$ -Partikel, als hoch-LET Strahlung induzieren komplexere DNS-Schäden als die niedrig-LET Röntgenstrahlung. Je stärker die DNS einer Zelle geschädigt ist, desto wahrscheinlicher aktiviert dies einen Checkpoint im Zellzyklus und verhindert damit je nach Schädigung transient oder permanent die weitere Proliferation [138].

In der Zellzyklusphasenverteilung (siehe Kapitel 3.1.2.3.2) nach 2 Gy Röntgenbestrahlung zeigte sich ein transienter G2/M-Arrest, welcher nach 10-12 h wieder von den Zellen verlassen wurde. Ein interindividueller Unterschied wurde nicht festgestellt.

Auch bei der EdU/BrdU/Ki67 Färbung (siehe Kapitel 3.1.1) 24 h nach 2 Gy Röntgenbestrahlung wurde eine deutliche Verlängerung der Verdopplungszeit der NHBE der beiden Spender ermittelt. Wenn man allerdings den durch die Strahlung gesunkenen Wachstumsfaktor (basiert auf dem Anteil der Ki67-positiven Zellen) mit einberechnet, ist die Verdopplungszeit nur um 7-11 % verlängert. Bei der prozentualen Zunahme der Verdopplungszeit war kein Unterschied zwischen den NHBE beider Spender festzustellen.

Ionisierende Strahlung führt bei den NHBE zu einer reduzierten Proliferationsfähigkeit, einem transienten Zellzyklus-Arrest und einer verlängerten Verdopplungszeit. Giuranno et al zeigten ebenfalls, dass bei humanen Basalzellen der Anteil an Ki67-positiven Zellen nach 2 Gy Röntgenstrahlung reduziert ist [22]. Strahlung induziert bei den NHBE eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit, dadurch wird die Vererbung von strahleninduzierten DNS-Schäden verhindert und das Risiko zur Tumorgenese reduziert. In verschiedenen menschlichen Zelllinien wurde gezeigt, dass eine Reduktion von Ki67 den Übergang aus der G1 in die S-Phase inhibiert. Es leitet die p21-vermittelte G1/S Checkpoint Aktivierung ein, die ein Fortlaufen des Zellzyklus verhindert. Diese Regulation ist bei manchen Krebszelllinien gestört [139], [140].

Der Vergleich der Überlebenskurve zeigte, dass  $\alpha$ -Partikel als hoch-LET Strahlung bei gleicher Dosis zu einer stärkeren Reduktion des klonogenen Zellüberlebens führen als Röntgenstrahlen. Ein signifikanter interindividueller Unterschied war nach Röntgenstrahlung in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Werten festzustellen (siehe Abbildung 19). Es ergab sich für Spender 1 ein  $RBW_{max}$  für das klonogene Überleben nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung von  $3,82 \pm 0,14$  im Vergleich zu Röntgenstrahlung und für Spender 2 von  $3,11 \pm 0,26$  (siehe 2.5.1). Während Themis et al. einen  $RBW_{max}$  von 8,2 für  $\alpha$ -

---

Partikeln ermittelten, allerdings definierten sie bereits Zellgruppen von  $\geq 25$  Zellen als Kolonie, verwendeten NHBE eines anderen Spenders und ein anderes Medium (BEGM™) [141]. *In vivo* wird ein RBW von  $3,8 \pm 0,8$  für Lungengewebe angegeben [142].

Im Kolonien-Formations-Assay ergab sich für die NHBE beider Spender eine unterschiedliche Plattierungseffizienz, welche mit  $32,4 \pm 5,2$  % für Spender 1 und  $18,6 \pm 3,2$  % bei Spender 2 weit unter der jeweiligen im Analysezertifikat angegebenen lag. Grund hierfür könnte sein, dass bei Lonza die PE über die Anzahl angehefteter Zellen, anstatt über die Koloniebildung ermittelt wurde.

#### **4.1.3. Strahlung induziert kaum Autophagie oder Apoptose**

---

Die Autophagie spielt eine wichtige Rolle bei der Eliminierung fehlgefalteter oder aggregierter Proteine und beschädigter Organellen, wie sie zum Beispiel durch Bestrahlung hervorgerufen werden, aber auch von intrazellulären Krankheitserregern. Die Autophagie begünstigt die zelluläre Seneszenz und die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche, schützt vor Genominstabilität und verhindert Nekrosen, was ihr eine Schlüsselrolle bei der Prävention von Krankheiten wie Krebs, Neurodegeneration, Autoimmunerkrankungen und Infektionen verleiht [143]. In der Regel wird die Autophagie durch zellulären Stress wie Nährstoffmangel oder erhöhte ROS Induktion ausgelöst, sodass die Zelle in eine reversible Quieszenz eintritt. In diesem Zustand kann die Zelle vorhandene Schäden reparieren, ist dies nicht möglich, geht die Zelle von der Autophagie in die Seneszenz oder Apoptose über [144]. Auch in der Homöostase wird die Autophagie genutzt um nicht mehr benötigtes Zellmaterial abzubauen, sodass es auch hier zur vereinzelt Bildung von autophagischen Vesikeln kommt. Um eine Zelle als autophagisch zu definieren, muss sie  $\geq 3$  autophagische Vesikel aufweisen [145]. Typischer Marker für die Autophagie ist das Protein LC3B, welches in die Membran der autophagischen Vesikel eingebaut wird [126].

Auf mRNA- und Proteinebene wurde LC3B nach Bestrahlung untersucht. Auf mRNA Ebene wurden interindividuelle Unterschiede in der Konzentration des Markers, sowie der Reaktion auf die Bestrahlung beobachtet (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Bei gleicher Dosis zeigen  $\alpha$ -Partikel eine stärkere Induktion von LC3B als Röntgenstrahlung. Ein geringer Anstieg des Markers um 10-40 % war bei den NHBE beider Spender bereits 24 h nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Bei den NHBE von Spender 1 ist das Level in der Kontrolle nach 120 h 10-mal höher als nach 24 h, mit steigender Dosis wurde der Anstieg von 24 h auf 120 h geringer. Während bei den NHBE von Spender 2 der Anstieg von 24 h auf 120 h in der Kontrolle als auch bei der jeweils höchsten Dosis der beiden Strahlenqualitäten am höchsten war. Da zum Zeitpunkt 120 h in den Kontrollen eine höhere Konfluenz vorlag, als bei den bestrahlten NHBE, kann das erhöhte LC3B Level durch einen Nährstoffmangel begründet sein.

Auf Proteinebene (siehe Kapitel 3.1.3.4.1) wurde 24 h nach Strahlenexposition kein deutlicher Anstieg an Zellen mit  $\geq 3$  autophagischen Vesikeln nach Bestrahlung beobachtet, weder nach 4 Gy



---

Röntgen-, noch nach 1 Gy  $\alpha$ -Partikelstrahlung. Allerdings war die Zuordnung der einzelnen autophagischen Vesikel zu der jeweiligen Zelle schwierig (siehe Abbildung 34). Die Auswertung könnte durch eine Cofärbung mit einem Zellmembranmarker wie dem Transmembranprotein Natrium-Kalium-ATPase, E-Cadherin oder ZO-1 verbessert werden [132], [146], [147], da so die Vesikel einzelnen Zellen zugeordnet werden können.

Die Lunge gilt als ein Gewebe, das höhere Dosen, wie 5 Gy Röntgenstrahlung, ionisierender Strahlung zur deutlichen Apoptose Induktion benötigt [148]. Andere Noxen wie Dieselabgase induzieren *in vitro* hingegen Apoptoseraten von bis zu 40 % als Stressreaktion [145].

Bei der Apoptosefärbung (siehe Kapitel 3.1.2.2) war kein Spenderunterschied festzustellen. Die Analyse der Apoptoserate 24 h nach Bestrahlung zeigte sowohl nach Röntgenstrahlen- als auch nach  $\alpha$ -Partikelbestrahlung eine minimale Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen mit steigender Dosis. Mit einem Anstieg von 0,5 % auf 2,4 % ist der Anstieg nach 4 Gy Röntgenstrahlung zwar signifikant (siehe Abbildung 21), aber trotzdem sehr gering.

Betrachtet man den geringen Anteil von Apoptose und Autophagie nach Bestrahlung, bedeutet dies, dass die NHBE vorwiegend über die permanente Unterbindung der Proliferation eine Weitergabe von Schäden an die nächsten Zellgenerationen verhindern. Da es sich bei den NHBE um Epithelzellen handelt, deren Aufgabe der Abschluss eines Gewebes ist, ist es wichtig für den Erhalt der Barrierefunktion keine Zellen absterben zu lassen, da diese zu Lücken im Epithel führen würden. Eine Differenzierung der Zelle, sodass sie nicht mehr proliferieren kann, erhält hingegen die Barrierefunktion und weniger Zellen müssen ersetzt werden.

#### **4.1.4. Strahlung begünstigt Seneszenz**

---

Bei der zellulären Seneszenz handelt es sich um einen sehr stabilen Stillstand des Zellzyklus, der als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren ausgelöst wird. Die Seneszenz unterbindet die Replikation alter oder geschädigter Zellen. Neben dem Austritt aus dem Zellzyklus findet auch eine Umprogrammierung des Stoffwechsels, die Umstrukturierung des Chromatins oder die Einleitung der Autophagie statt [149]. Eine Deregulation der Seneszenz begünstigt die Tumorgenese von Lungenkrebs und Pathogenese altersbedingter Krankheiten [150]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Seneszenzmarker p16 und p21 untersucht.

Bei der Expression der beiden Seneszenzmarker wurden keine interindividuellen Unterschiede festgestellt. Es wurde keine Veränderung des Levels von p16 nach Bestrahlung beobachtet, jedoch war das Expressionslevel nach 120 h 30-70-fach höher als nach 24 h (siehe Abbildung 30).

Im Gegensatz dazu wurde bei p21 zum Zeitpunkt 24 h nach Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung ein dosisabhängiger Anstieg gemessen (siehe Abbildung 31). Der Anstieg blieb auch 120 h nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung bestehen bzw. stieg nach Röntgenbestrahlung noch etwas weiter

---

an. Die  $\alpha$ -Partikel führten bei gleicher Dosis zu einem stärkeren Anstieg des p21 Levels, der Isoeffekt war bei 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel im Vergleich zu 2,0 Gy Röntgenstrahlung zu sehen.

Dieser Unterschied könnte durch die unterschiedliche Expressionsdynamik der beiden Seneszenzmarker begründet sein. Eine erhöhte Expression des Seneszenzmarkers p16 wird erst nach der Etablierung der Seneszenz in der Zelle eingeleitet [151] oder durch intrazellulären Stress, welcher zum Beispiel von Doppelstrangbrüchen hervorgeht [152], während das Expressionslevel des Seneszenzmarkers p21 sehr schnell ansteigt, sobald sich die Zelle der replikativen Seneszenz nähert [151], [153]. Seneszente Zellen proliferieren nicht mehr und geben strahleninduzierten DNS-Schäden nicht an die Nachkommen weiter. Die Proliferationskapazität der Kultur sinkt durch die replikative Seneszenz, wie auch schon anhand der Ki67 Antikörperfärbung nach Bestrahlung erläutert wurde (siehe Kapitel 4.1.2).

#### **4.1.5. Strahlung induziert Differenzierung der Basalzellen in Becherzellen**

---

Auf Ebene der RNS- und Proteinexpression wurde untersucht in wie weit Strahlung die Differenzierung der Nachkommen der bestrahlten NHBE verändert, dazu wurde das Level der zelltypspezifischen Marker untersucht (siehe Kapitel 3.1.3). Damit sollte aufgeklärt werden wie eine Strahlenexposition die Differenzierung der NHBE, bei denen es sich fast ausschließlich um Basalzellen handelt, in ein Bronchialepithel beeinflusst.

Bei der Expression des frühen Basalzellmarkers auf mRNA Ebene zeigten sich interindividuelle Unterschiede in der Strahlenantwort. Das Level des frühen Basalzellmarkers KRT14 war bei den NHBE von Spender 1 24 h nach Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung höher als in der Kontrolle und sank 120 h nach Bestrahlung strahlungsunabhängig unter das Anfangsniveau (siehe Abbildung 25). Im Gegensatz dazu blieb das Expressionslevel bei den NHBE von Spender 2 24 h nach Bestrahlung auf dem Niveau der Kontrolle (siehe Abbildung 26). 120 h nach Bestrahlung war das Kontrolllevel im Vergleich zu 24 h erhöht und nahm mit zunehmender Dosis ab

Bezogen auf die strahleninduzierte Veränderung der Expression war kein Unterschied zwischen Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikeln festzustellen, allerdings führten bei gleicher Dosis  $\alpha$ -Partikel zu einem stärkeren Effekt als Röntgenstrahlung. In murinen Bronchialepithelzellen wurde *in vivo* nach Naphtalenschädigung eine gestiegene KRT14 Expression als Marker für die Induktion der Schadensreparatur identifiziert [154]. Ob dies auch auf die NHBE zutrifft, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, kann derzeit nicht beantwortet werden.

Bei dem späten Basalzellmarker KRT5 zeigen sich weder interindividuellen Unterschiede noch eine Strahlenreaktion bei den NHBE beider Spender. Über die Zeit von 24 h zu 120 h kam es zu einer Reduktion des Levels (siehe Abbildung 27).

---

Betrachtet man die Expression des Becherzellmarkers MUC5AC zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Spendern, hier führte die Bestrahlung bereits nach 24 h zu einem dosisabhängigen Anstieg des MUC5AC Levels. Der Anstieg war nach 120 h noch deutlicher zu sehen (siehe Abbildung 28). Auf Proteinebene wurde nach 2 Gy Röntgenstrahlung ebenfalls eine Zunahme an MUC5AC-positiven Zellen nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1.3.2.1). Mögliche Gründe für die Differenzierung der Basalzellen sind DNS-Schäden, welche wie bereits erläutert (siehe Kapitel 4.1.2), zu einem Zellzyklusarrest führen, was bei Stammzellen oftmals mit einer Differenzierung einhergeht [155]. Des Weiteren können strahleninduzierte ROS die Differenzierung beeinflussen. Ein strahlungsinduzierter ROS-Anstieg aktiviert den NOTCH Signalweg, welcher die Differenzierung in Becherzellen einleitet [23]. Ebenso können andere Stressfaktoren wie Hypoxie oder Zigarettenrauchexposition zu einem Anstieg von MUC5AC führen, was bereits in humanen primären Bronchialzellen gezeigt wurde [28], [156], [157]. Diese Noxen induzieren einen Anstieg an ROS [158], [159]. Auffällig war bei der Antikörperfärbung der Basal- und Becherzellen, dass alle MUC5AC-positiven Zellen auch KRT5-positiv waren (siehe Abbildung 29). Bei diesen Zellen könnte es sich um intermediäre Basalzellen, auch Para- oder Suprabasalzellen genannt, handeln, also Basalzellen die beginnen in Becherzellen zu differenzieren oder sogar schon differenziert sind und dann Merkmale beider Zelltypen aufweisen. Bei Biopsien gesunder Spender wurden im humanen Bronchialepithel im Mittel 3 % Parabasalzellen ermittelt, wobei der Anteil in den proximalen Bronchien etwa 7 % beträgt, in den distalen Bronchien dagegen nur 1 % [103], [160], [161]. Diese Parabasalzellen könnten ein Grund dafür sein, dass trotz steigendem MUC5AC mRNA Level, das KRT5 Level nicht im gleichen Maß sinkt.

#### **4.2. Einfluss einer Strahlenexposition auf die Differenzierungsfähigkeit in ein Bronchialepithel**

---

Um die Auswirkung der ionisierenden Strahlung auf die Differenzierungsfähigkeit der Basalzellen nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde ein organotypisches Modell (ALI Kultur) des Bronchialepithels etabliert. Dabei sollte geklärt werden, ob die Nachkommen der bestrahlten NHBE andere Expressionsmuster der verschiedenen Zelltypen aufweisen als die von unbestrahlten NHBE und ob das resultierende Bronchialepithel funktional ist. Das ALI Modell wurde ausgewählt, da es das bisher einzige ist, bei dem das Bronchialepithel in direkter Interaktion mit der umgebenden Atmosphäre steht [62]. Dieser Aspekt ist wichtig um die MCC mittels Tracerpartikeln visualisieren zu können. In Sphären oder Organoide könnten die Tracerpartikel nicht ohne Schädigung des Epithels eingebracht werden. Zudem ist der direkte Kontakt zwischen Epithel und Umgebungsluft essentiell, wenn in Zukunft auch die Auswirkung von Radon untersucht werden soll.

Um zu untersuchen, ob NHBE nach einer Strahlenexposition mit Röntgenstrahlung- oder  $\alpha$ -Partikeln ein pseudostratifiziertes, funktionales Epithel bilden, wurden anhand der Überlebenskurve

---

Isoeffektdosen ermittelt, die zu einem Zellüberleben von  $78,5 \pm 3,5 \%$  (0,25 Gy  $\alpha$ -Partikeln und 0,5 Gy Röntgenstrahlung) oder  $35,5 \pm 5,5 \%$  (0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel und 2,0 Gy Röntgenstrahlung) führten (siehe Kapitel 3.1.2.1).

#### **4.2.1. Eigenschaften des Bronchialepithels**

---

Die morphologischen Eigenschaften des differenzierten Epithels wurden zum Zeitpunkt 35 dpa anhand von Immunfluoreszenzfärbungen der Kryoschnitte überprüft. Das Epithel wies im Mittel eine Höhe von  $36 \mu\text{m}$  auf und trug Zilien mit einer Länge von  $7 \mu\text{m}$  (siehe Kapitel 3.2.3).

Leung et al haben bei NHBE von sechs Spendern nach vier Wochen Kultivierung in ALI eine Epitheldicke von  $20 - 36 \mu\text{m}$  gemessen [38], während Rayner et al bei drei Spendern eine Spanne von  $33 - 49 \mu\text{m}$  ermittelt haben. Die Epitheldicke hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie dem verwendeten Medium, dem Alter der Zellen und dem Spender [38], [116]. Die Länge der Zilien entspricht den Angaben aus der Literatur [35], [38]. *In vivo* weist das Bronchialepithel proximal eine Höhe von  $42 \mu\text{m}$  und distal von  $29 \mu\text{m}$  auf [162].

Zudem wurden alle vier Hauptzelltypen anhand einer Immunfluoreszenzfärbung mit zelltypspezifischen Markern identifiziert, ihre prozentuale Zusammensetzung im Epithel (siehe Abbildung 51) stimmt mit Literaturwerten überein [28], [44]. Die typische pseudostratifizierte Morphologie war zu beobachten, dabei bilden die Basalzellen die unterste Schicht auf der Membran, die Zellkörper der zilientragenden Zellen, Club- und Becherzellen bilden die mittlere Schicht des Epithels und die apikale Seite der zilientragenden Zellen bildet den apikalen Abschluss, über den die Zilien hinausragen (siehe Abbildung 49).

##### **4.2.1.1. Erhöhte MUC5AC Transkription und verzögerte Ziliogenese bei der Differenzierung von den Nachkommen der bestrahlten Basalzellen**

---

Die Differenzierung der Basalzellen, also der KRT14- und KRT5-positiven Stammzellen, in ein Bronchialepithel beginnt mit der Generierung von sekretorischen Zellen, wie den MUC5AC-positiven Becherzellen und den SCGB1A1-positiven Clubzellen. Die Ziliogenese der zilientragenden Zellen, wird durch die Expression von FOXJ1 induziert [45], [134].

Im Laufe der Differenzierung der bestrahlten Basalzellen in ALI-Kultur sank das Transkriptionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 deutlich über den Beobachtungszeitraum von fünf Wochen (siehe Abbildung 36), während das von dem späten Basalzellmarker KRT5 nur leicht sank (siehe Abbildung 37). Bei der Expression von KRT5 wurde kein interindividueller Unterschied festgestellt, inwiefern das auch auf KRT14 zu trifft, muss noch überprüft werden, da für KRT14 nur Daten von Spender 1 ermittelt werden konnten. Die Reduktion der Basalzellmarker über den Differenzierungszeitraum spricht dafür, dass die Stammzellkapazitäten der Basalzellen mit der Zeit

---

im Epithel sinken. Damit ist die Expression des KRT14 Markers bei dem aus bestrahlten Basalzellen differenzierten Bronchialepithel gegensätzlich zu der Reaktion in den undifferenzierten Basalzellen, bei der die Strahlung zu einem Anstieg der Basalzellaktivität führte (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Dies deutet daraufhin, dass die Bestrahlung die Aktivität der Basalzellen auf Ebene der mRNA nicht langfristig beeinflusst oder durch das regenerative Potential der verbleibenden Basalzellen der Verlust ausgeglichen werden kann.

Das Expressionslevel von MUC5AC stieg mit einsetzender Differenzierung (7 dpa) um das 99-fache an und blieb anschließend konstant. Ein individueller Unterschied zeigte sich nach Bestrahlung. Bei den NHBE von Spender 1 zeigte sich nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln eine Verdopplung der Expression bei 7 dpa verglichen mit der Kontrolle, anschließend sank die Expression wieder auf das Kontrollniveau. 2,0 Gy Röntgenstrahlung führten ebenfalls zu einer Verdopplung ab 7 dpa und bei 35 dpa zu einer signifikanten Verdreifachung des Expressionslevel, verglichen mit der Kontrolle. Bei den NHBE von Spender 2 war nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln eine konstante Verdopplung der Expression verglichen mit der Kontrolle zu beobachten, während nach 2,0 Gy Röntgenstrahlung erst ab 14 dpa ein stetiger Anstieg um bis zu 300 % zu beobachten war (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39).

Das veränderte Expressionslevel lässt auf eine Dysregulation der Differenzierung durch die ionisierende Strahlung schließen, wobei das Ausmaß spenderspezifisch ist. Ob die veränderte Genexpression auf eine höhere Mukussynthese zurückgeht oder ob vermehrt Becherzellen gebildet werden, kann anhand der qPCR nicht ermittelt werden. Eine gestiegene Mukussynthese kann mittels Enzymgebundener Immunosorbent-Assay (ELISA) der verschiedenen Muzine aufgeklärt werden, während eine vermehrte Differenzierung in Becherzellen mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung oder eines Western Blots festgestellt werden kann [23].

Auch bei dem Clubzellmarker SCGB1A1 gab es interindividuelle Unterschiede. Während bei den Epithelien von Spender 1 weder ein Strahlungseffekt noch eine Veränderung über die Zeit zu beobachten war, wurde bei Spender 2 ein deutlicher Anstieg im Transkriptionslevel nach 2 Gy Röntgenstrahlen und ein leichter Anstieg nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln detektiert. Auch die Differenzierung von Clubzellen aus Basalzellen wird durch ein erhöhtes NOTCH Level begünstigt [73], [163]. Warum die NHBE beider Spender unterschiedlich reagieren ist nicht geklärt.

Der zilienträgende Zell Marker FOXJ1 wies bei den Kontrollen deutliche Konzentrationsunterschiede der beiden Spendern auf. Die beginnende Zunahme des FOXJ1 Levels war nach 2,0 Gy Röntgenstrahlung bei Spender 2 geringer als bei Spender 1. Das Transkriptionslevel von FOXJ1 war am Anfang der Differenzierung (7 dpa) sowohl nach Röntgenstrahlung als auch nach  $\alpha$ -Partikel Bestrahlung dosisabhängig reduziert, danach glichen sich die Werte an (siehe Abbildung 42 und Abbildung 43). Dies wird auf eine verstärkte NOTCH Aktivierung durch die strahleninduzierten ROS

---

zurückgeführt und spricht sehr für eine Verzögerung der Ziliogenese bei der Differenzierung von bestrahlten NHBE in ein Epithel im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle [23], [45]. Die regelmäßige mikroskopische Überprüfung der Epithelien bestätigte, dass bei Epithelien, die aus Röntgenstrahlung oder  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE differenziert wurden, der erste Zilienschlag in Abhängigkeit von der Dosis ein bis drei Tage später einsetzte verglichen mit der Kontrolle (siehe Kapitel 3.2.1). Bei Epithelien aus Röntgen- oder  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE zeigte sich ein dosisabhängiges um 1-3 Tage verspätetes Zilienschlagen verglichen mit der Kontrolle. *In vivo* ist dies nur lokal begrenzt relevant, wenn eine massive Schädigung des Epithels erfolgt und durch die Strahlenexposition der Regenerationsprozess beeinträchtigt ist.

Die Differenzierung der Basalzellen wird vor allem über den NOTCH-Signalweg reguliert. Ein hohes NOTCH Level führt zu einer Differenzierung in sekretorische Zellen wie Becher- und Clubzellen, während eine niedrige NOTCH Konzentration über die Aktivierung der FOXJ1 Expression die Ziliogenese einleitet und damit die Differenzierung in zilientragende Zellen (siehe Abbildung 4). Der NOTCH Signalweg wird durch endogene ROS Konzentrationen reguliert, diese Regulation kann durch strahlungsinduzierte ROS gestört werden [23], [45]. Dieser oxidative Stress kann über mehrere Zellgenerationen weitergegeben werden und so noch lange nach der eigentlichen Bestrahlung bestehen bleiben [56]. *In vivo* bedeutet eine Dysregulation der Differenzierung durch die Strahlenexposition eine veränderte Regeneration der geschädigten Bereiche. In wie weit dies die Funktionalität beeinträchtigt muss noch ermittelt werden.

#### **4.2.1.2. Keine Hinweise auf permanente strahleninduzierte Seneszenz oder Autophagie im Bronchialepithel**

---

Bei den Seneszenzmarkern p16 und p21, sowie dem Autophagiemarker LC3B war keine Veränderung der Transkription während der Differenzierung der bestrahlten NHBE im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten, ebenso kein interindividueller Unterschied. Die Transkription von p16 und LC3B stieg im Verlauf der Differenzierung, was für eine strahlenunabhängige Alterung des Epithels spricht. Das Expressionslevel von p21 bleibt vom Zeitpunkt vor der Differenzierung bis zum ausdifferenzierten Epithel konstant. In den Epithelien, welche aus bestrahlten NHBE differenziert wurden, war kein Hinweis auf strahleninduzierte Seneszenz oder Autophagie zu detektieren. Das deutet daraufhin, dass durch ionisierende Strahlung geschädigte NHBE weder die Seneszenz noch die Autophagie nutzen um eine Weitergabe von Schäden zu unterbinden. Die qPCR ist eine etablierte und weitverbreitete Methode um p16 und p21 nachzuweisen, allerdings könnte sie bei einem geringen Anteil an seneszenten Zellen an ihre Nachweisgrenze gelangen [164]. Da die Seneszenz und die Autophagie als direkte Reaktion auf Zellschädigungen, wie zum Beispiel DNS-Schäden auftreten [164], kann der Zeitpunkt 7 dpa mit 10 Tagen nach der Bestrahlung zu spät für den Nachweis dieser Strahlenantwort sein.

---

## 4.2.2. Bestrahlung der undifferenzierten NHBE führt zu einer veränderten Funktionalität des differenzierten Bronchialepithels

---

Die Funktionalität des resultierenden Epithels wurde anhand der drei Hauptaufgaben Immunabwehr, Barrierefunktion und MCC untersucht. Sie sind entscheidend um eine intakte Pathogenabwehr zu gewährleisten um das Infektionsrisiko zu minimieren. Als Parameter für die Immunabwehr wurde die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL1 $\beta$  und IL8 (auch CXCL8 genannt) analysiert. Maß für die Permeabilität, also die Qualität der Barrierefunktion, ist der TEER [165]. Die MCC wurde anhand von Tracerpartikeln visualisiert und mittels videobasierter Software ausgewertet [35].

### 4.2.2.1. Erhöhtes Level des proinflammatorischen Zytokin IL1 $\beta$

---

Auf Transkriptionsebene wurden die zwei proinflammatorischen Zytokine IL1 $\beta$  und IL8 untersucht, da ihre Expression durch geschädigte Zellen, wie sie durch Strahlenexposition entstehen, und Pathogene induziert wird und in Verbindung mit der Entstehung von strahleninduzierten Lungenschäden wie Pneumonitis und Fibrose stehen [166]–[168]. Im Bronchialepithel ist IL1 $\beta$  an der Regulation der Muzinsekretion beteiligt, eine Disregulation wurde bei der Pathogenese von Mukoviszidose, COPD und Asthma nachgewiesen, was zu einem chronisch erhöhten IL1 $\beta$ -Level führt [169]–[171]. Dies begünstigt durch die Induktion von Wachstumsfaktoren die Tumorgenese und Metastasierung von Lungenkrebs [172]. Auch IL8 spielt eine Rolle bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Krankheiten und der Tumorgenese [173]. Bei Lungenkrebs ist die IL8 Expression erhöht, besonders bei NCSCl verschlechtert sich die Behandlungs- und Überlebensprognose mit steigendem IL8-Level [174]. Als Ursache wird eine gestiegene genetische Instabilität angenommen, die durch das chronisch erhöhte IL8 Level induziert wird. Dies wurde *in vitro* an immortalisierten humanen Bronchialepithelzellen anhand von Mikronukleibildung und  $\gamma$ -H2AX- sowie 53BP1-Foci nach Röntgenstrahlung und Eisen-Ionen Bestrahlung festgestellt [80].

Undifferenzierte NHBE beider Spender wiesen zum Zeitpunkt -3 dpa ein höheres Level beider Interleukine auf verglichen mit dem Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung (7 dpa). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Interleukine auch an dem Erhalt der Stammzeleigenschaften beteiligt sind [175]. Die Bestrahlung der NHBE mit 2 Gy Röntgenstrahlung führte zu einem 500%-igem Anstieg des IL1 $\beta$  Level über den gesamten Differenzierungszeitraum (7-35 dpa) im Vergleich zur Kontrolle, während 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel nur zu einem geringeren Anstieg um 50 % führten (siehe Abbildung 48). Eine Veränderung bei der Expression von IL8 nach Bestrahlung wurde nicht festgestellt (siehe Abbildung 47). Es wurde bereits festgestellt, dass hoch-LET Strahlung wie  $\alpha$ -Partikel sieben Tage nach Bestrahlung zu einer deutlicheren Zunahme der IL8 Synthese in undifferenzierten immortalisierten humanen Bronchialepithelzellen führt als Röntgenstrahlung, wobei diese bereits 14 Tage nach Bestrahlung nicht mehr detektierbar ist [80], [176]. Werner et al.

---

korrelieren die IL8 Induktion mit der gravierenderen genetischen Instabilität, welche durch hoch-LET Strahlung im Vergleich zu niedrig-LET Strahlung induziert wird [80].

Da das Level des entzündungsfördernden IL1 $\beta$  auch über fünf Wochen nach Bestrahlung noch erhöht ist, deutet dies auf eine anhaltende Entzündungsreaktion hin. Auf den Menschen bezogen begünstigt eine chronische Entzündung eine Tumorgenese.

Für eine genauere Analyse der proinflammatorischen Zytokine in der ALI-Kultur sollte in weiteren Versuchen eine ELISA als sensiblere Methode zur Messung der Zytokinkonzentration durchgeführt werden, um mögliche Veränderungen des IL8 Levels zu detektieren. Dadurch kann ebenfalls verifiziert werden, ob es sich um die aktive Form der Zytokine handelt oder die inaktive Form, welche im Fall von IL8 kontinuierlich von den Epithelzellen sezerniert wird [177].

#### **4.2.2.2. Strahlung führt zu einem Anstieg des transepithelialen elektrischen Widerstands**

---

Die Barrierefunktion des Bronchialepithels wurde anhand des TEER ermittelt (siehe Kapitel 3.2.3.2). Dieser wurde bei den ausdifferenzierten Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa gemessen. Hier war ein deutlicher interindividueller Unterschied zu erkennen. Das Epithel aus den NHBE von Spender 1 wies einen TEER von 190  $\Omega \times \text{cm}^2$  auf, der Wert für Spender 2 betrug mit 460  $\Omega \times \text{cm}^2$ , mehr als den doppelten Widerstand. Große Unterschiede zwischen Spendern wurden schon in der Literatur beschrieben, bei Bronchialepithelien von 16 Spendern, welche in ALI kultiviert wurden, wurden TEER Werte von 700-1200  $\Omega \times \text{cm}^2$  gemessen [165], [178].

Eine Bestrahlung mit niedrigeren Dosen Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikeln führten zu keinem signifikanten Anstieg. Bei den Epithelien, welche aus 2 Gy Röntgen oder 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel bestrahlten NHBE differenziert wurden, zeigte sich ein signifikanter Anstieg um 17 - 42 % des Widerstands im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 55). Diese deutet auf eine geringere Permeabilität hin. Auch O'Sullivan et al. detektierten einen Anstieg des TEERs, die Bronchialzellen wurden in ALI kultiviert und nach dreimaliger Bestrahlung des sich differenzierenden Epithels mit 1 Gy Röntgenstrahlung stieg der TEER [21]. Im Gegensatz dazu führte die Exposition von NHBE mit Zigarettenrauch, der ebenfalls  $\alpha$ -Partikel freisetzt, zu einer erhöhten Permeabilität, also einer schlechteren Barrierefunktion des Epithels in ALI [28], [39]. Da *tight junctions* für die Permeabilität des Epithels wichtig sind, wurden Epithelien aus Röntgenstrahlung-,  $\alpha$ -Partikel bestrahlten und unbestrahlten NHBE mit dem *tight junction* Marker ZO-1 gefärbt (siehe Abbildung 56). Alle Epithelien bilden *tight junctions* aus, ob diese aufgrund der Strahlenexposition verändert waren und somit zu einer niedrigeren Permeabilität führten, konnte nicht ermittelt werden und muss noch weiter untersucht werden. Auch ein dickeres Epithel kann zu einer verringerten Permeabilität durch einen erhöhten Widerstand führen, die Untersuchung von Kryoschnitten zeigte jedoch nach Bestrahlung bei den Epithelien von Spender 1 eine nicht signifikante Reduktion der Epitheldicke, während sich bei Spender 2 die Dicke nicht veränderte (siehe Abbildung 50). Ein dickeres Epithel kann damit als



---

Grund für die gestiegene Permeabilität ausgeschlossen werden. Als weiterer Anhaltspunkt für die Integrität der Barrierefunktion kann neben der extrazellulären Permeabilität auch die intrazelluläre Permeabilität mittels FITC markierter Dextrose überprüft werden [165].

#### **4.2.2.3. Strahlung reduziert die Geschwindigkeit und Koordination der mukoziliären Reinigung**

---

Für die Analyse der MCC wurde im Rahmen einer Masterarbeit eine videobasierte Analysesoftware entwickelt [125]. Diese basiert auf der Verfolgung von fluoreszierenden Tracerpartikeln im Mukus, welcher durch die Zilien der zilientragenden Zellen transportiert wird. Damit ist es möglich, die mittlere Geschwindigkeit des Transports, die Winkelgeschwindigkeit und die Koordination der MCC zu quantifizieren (siehe Kapitel 3.2.3.1). Als Maß für die Koordination wurde die Winkelschwankung der einzelnen Partikel bestimmt. Besonders die Koordination ist ein wichtiger Parameter zur Einschätzung der Strahlenwirkung, da die Strahlung die Zell-Zell-Interaktionen beeinflussen kann und eine deregulierte MCC zu einem erhöhten Risiko für Infektionen und chronische entzündliche Lungenerkrankungen führt [75], [179].

Aufgrund der geringen Robustheit im Zusammenhang mit der Bestimmung der MCC zum gegenwärtigen Entwicklungsstand, ist es noch nicht möglich akkurat alle Zustände zu erfassen. Aufgrund von großen Berechnungsungenauigkeiten konnte nicht festgestellt werden, ob es interindividuelle Unterschiede in der MCC gibt. Durch den hohen Stichprobenumfang konnten trotzdem erste Rückschlüsse auf den Einfluss der Strahlenexposition gemacht werden. Dennoch bietet diese Methode Potential, zukünftig die MMC robuster zu bestimmen und quantitative Aussagen zuzulassen.

Sowohl nach 2,0 Gy Röntgen, als auch nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikelbestrahlung der NHBE zeigte das resultierende Epithel eine reduzierte mittlere Geschwindigkeit (siehe Abbildung 52), sowie eine reduzierte Winkelgeschwindigkeit (siehe Abbildung 54) im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig waren die großen Abweichungen der einzelnen Messwerte innerhalb einer Kultur und auch zwischen den Experimenten. Ein Erklärungsansatz für die großen Abweichungen bei der mittleren Geschwindigkeit bietet die Geometrie der Bewegung, durch die Wirbelbewegung ist die Geschwindigkeit im Zentrum geringer als am Rand des Wirbels [35]. Daher hat neben der Strahlenbehandlung auch die Lokalisation des Videoausschnitts im Wirbel einen großen Einfluss auf die Bewegungsgeschwindigkeit. Um diese Schwankung zu reduzieren, wurde die Winkelgeschwindigkeit bestimmt, da diese im gesamten Wirbel ähnlich sein sollte. Hier ist die Schwierigkeit, dass für die Berechnung der Winkelgeschwindigkeit das Wirbelzentrum lokalisiert werden muss. Dies gelang mit der Software nur bei 45 % der Videos mit klarer Wirbelstruktur. Weichen Partikel von der Wirbelbewegung ab, wird das Wirbelzentrum nicht korrekt ermittelt. In Folge dessen ist die Winkelgeschwindigkeit mit großen Fehlern behaftet. Eine Optimierung der Wirbelzentumberechnung ist Gegenstand aktueller Arbeiten.

---

Die bisherigen Messungen weisen darauf hin, dass durch ionisierende Strahlung die Winkelgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle sinkt. Eine Reduktion der Geschwindigkeit kann durch verkürzte Zilien, reduzierte Zilienzahl, eine Reduktion der CBF, veränderter Mukuszusammensetzung oder gestörte Zell-Zell-Interaktionen begründet sein [32], [33], [44], [45]. Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Zilienlänge aufgrund der vorangegangenen Bestrahlung (siehe Abbildung 50), während *in vitro* als Reaktion auf viermalige Rauchexposition eine Verkürzung der Zilien des Bronchialepithels in ALI-Kultur um über 20 % beobachtet wurde [31]. Auch *in vivo* wurde eine Reduktion um ~10 % der Zilienlänge des Bronchialepithels von Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern beschrieben [180].

Die Analyse der Winkelschwankung zeigte, dass die Schwankungen hier deutlich größer waren als bei der Winkelgeschwindigkeit, sodass keine quantitative Aussage über die Koordination getroffen werden kann. Allerdings war beim Vergleich der Videos mit dem Auge zu erkennen, dass die Koordination durch die Bestrahlung abnimmt. Auch hier ist eine Softwareoptimierung notwendig, sodass die Bewegungsrichtung erkannt wird und dann eine Abweichung von dieser Richtung als Reduktion der Koordination erfasst wird.

Weitere Hinweise auf eine schlechtere Koordination der MCC aufgrund einer Strahlenexposition ergaben eine makroskopische (siehe Abbildung 35) sowie mikroskopische Untersuchung der Epithelien. Epithelien aus unbestrahlten NHBE waren in der Lage ein makroskopisch sichtbares Mukusagglomerat zu bilden, während dies den Epithelien aus bestrahlten NHBE (2 Gy Röntgenstrahlung oder 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel) nicht gelang. Weiterhin ergab eine Überprüfung der Epithelien im Durchlichtmikroskop, dass im gesamten Epithel ein Schlagen der Zilien zu sehen war, während nach Zugabe von fluoreszierenden Mikrosphären im Fluoreszenzkanal keine Bewegung der Sphären festzustellen war.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die MCC eines Bronchialepithels, das aus bestrahlten NHBE (0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln und 2,0 Gy Röntgenstrahlung) generiert wird, beeinträchtigt ist. Erste Ergebnisse weisen auf eine geringere Geschwindigkeit und eine reduzierte Koordination der MCC hin, welche nicht auf verkürzte Zilien oder mangelnden Zilienschlag zurückzuführen ist. 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikel führen zu einer ähnlichen Reduktion um ~75 % wie 2,0 Gy Röntgenstrahlung. Da eine beeinträchtigte MCC ein höheres Infektionsrisiko darstellt und die Pathogenese von chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen begünstigt, ist eine bessere Kenntnis der Strahlenwirkung auf das Bronchialepithel notwendig, um das Strahlenrisiko genauer zu bestimmen. Das ALI-Modell eignet sich weitergehend, auch im Hinblick auf die Analyse des Effekts von hoch-LET Strahlung, wie Kohlenstoff-Ionen, bei der Therapie von Lungentumoren [181], [182].

---

### 4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

---

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von Röntgen- und  $\alpha$ -Partikelstrahlung auf die Vorläufer- und Stammzellen des humanen Bronchialepithels und deren Proliferations- und Differenzierungseigenschaften, sowie die Funktionalität des daraus resultierenden Epithels, untersucht (Abbildung 57 zeigt eine schematische Zusammenfassung der verschiedenen Strahleneffekte).

Das ALI-Modell hat sich als geeignetes Modell für die Untersuchung der Strahleneffekte erwiesen. Sowohl die Differenzierung der NHBE in das Epithel, als auch die Überprüfung der Funktionalität anhand der Barriereigenschaften und MCC wurden erfolgreich untersucht. Durch den direkten Kontakt mit der umgebenden Atmosphäre ist auch die Analyse der Kombination von Bestrahlung und Zigarettenrauchexposition der NHBE möglich. Dies ist von klinischer Relevanz, da Patienten, welche sich einer Strahlentherapie unterziehen, durchaus auch Raucher sein können und ihre Strahlenantwort von der eines Nicht-Rauchers abweichen kann.

Es wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Partikel bei gleicher Dosis zu einem stärkeren Strahleneffekt führen verglichen mit Röntgenstrahlen bezogen auf das klonogene Zellüberleben, die Differenzierung und die Funktionalität des Epithels. Für das klonogene Zellüberleben wurde eine Isoeffektdosis von 0,25 Gy  $\alpha$ -Partikeln zu 0,5 Gy Röntgenstrahlung und von 0,5 Gy  $\alpha$ -Partikeln zu 2,0 Gy Röntgenstrahlung abgeschätzt.

Untersuchungen an Basalzellen zeigten, dass beide Strahlungsarten die Proliferationsfähigkeit reduzieren, während ihre Stammzeleigenschaften nicht beeinflusst wurden. Dafür wurde die Differenzierung durch den Anstieg des ROS Levels nach Bestrahlung verschoben, die Bildung von Becherzellen wird begünstigt und die Einleitung der Ziliogenese verzögert. Um zu bestätigen, dass diese Effekte durch das veränderte ROS Level induziert werden, kann in weiteren Experimenten aufgeklärt werden, indem strahlungsunabhängig auf chemischem Weg das ROS Level vor der Differenzierung der NHBE erhöht wird.

Strahlung führte in undifferenzierten NHBE zu einem Anstieg des Seneszenzmarkers p21, während dies in der Differenzierung in ein Epithel nicht zu beobachten war. Eventuell führt die Zell-Zell-Interaktion zu einem besseren Erhalt der Stammzeleigenschaften. Eine deutliche Induktion von Apoptose oder Autophagie durch die Strahlenexposition wurde nicht ermittelt.

Zudem wurde gezeigt, dass die Funktionalität des aus bestrahlten NHBE resultierenden Epithels in ALI beeinträchtigt ist. Bei höheren Dosen führen beide Strahlungsarten zu einem Anstieg des Widerstands des Epithels, was auf eine geringere Permeabilität hinweist, ob es sich dabei um einen positiven oder negativen Effekt handelt, ist in weiteren Untersuchungen zu klären, ebenso der Grund für diesen Anstieg des Widerstands. Die Analysesoftware der MCC bietet großes Potential für ausführlichere Untersuchungen der MCC *in vitro*. Dazu ist eine Optimierung und die Steigerung der Robustheit gegenüber Ausreißern, wie sie durch die Strahlung vermehrt vorkommen, notwendig.

Qualitativ wurde bereits festgestellt, dass die Bestrahlung der NHBE zu einer verminderten Geschwindigkeit und Koordination der MCC führen, eine Quantifizierung des Ausmaßes ist von großem Interesse um etwaige Dosisabhängigkeiten oder auch Unterschiede zwischen Röntgen- und  $\alpha$ -Partikelbestrahlung zu ermitteln. Übertragen auf den Mensch, bedeutet eine Beeinträchtigung der Selbstreinigung ein höheres Risiko für Infektionen und chronisch entzündliche Lungenkrankheiten. Ein permanent erhöhtes Entzündungsmarkerlevel wurde nach der Bestrahlung der NHBE im differenzierenden Epithel beobachtet, das spricht für eine chronische Dysregulation der proinflammatorischen Zytokine *in vitro*. Dies sollte anhand von einem ELISA Assay verschiedener Entzündungsmarker auf Proteinebene verifiziert werden. Ob durch die Bestrahlung die Tumorgenese von Lungenkrebs induziert wird, konnte durch den kurzen Untersuchungszeitraum nicht festgestellt werden. In weiterführenden Experimenten kann die Analyse von frühen Lungenzellmarkern darüber Aufschluss geben [183].

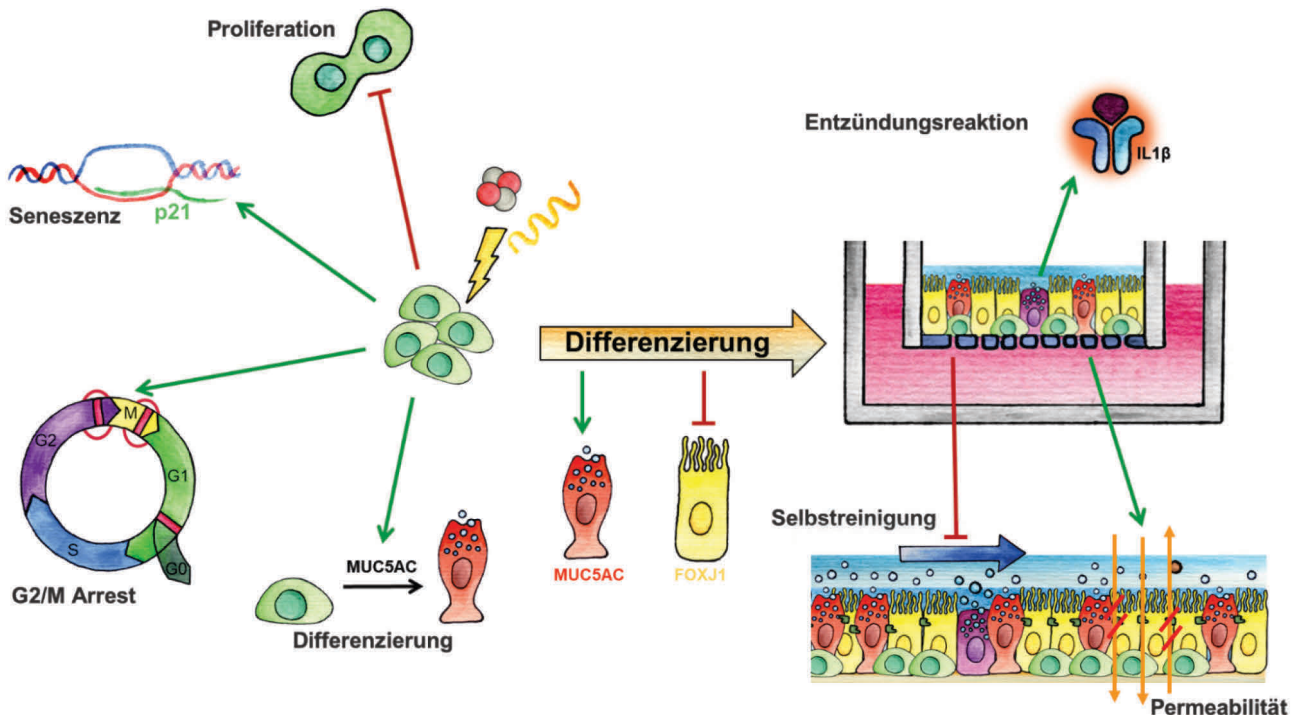


Abbildung 57: Schematische Zusammenfassung der Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel induzierten Veränderungen der NHBE. Auf der linken Seite sind die Strahleneffekte der undifferenzierten NHBE zu sehen. Eine Strahlenexposition inhibiert die Proliferation, induziert eine p21-vermittelte Seneszenz und die Differenzierung der Basalzellen in Becherzellen wird gefördert, sowie einen transienten G2/M-Arrest. Mittig bei der Differenzierung der Nachkommen der bestrahlten NHBE in ein Bronchialepithel führt die ionisierende Strahlung zu einer Dysregulation der Differenzierung durch vermehrte Expression des Becherzellmarkers MUC5AC und verspäteter Expression von FOXJ1, dem Marker für ziliare Zellen. Rechts sind die Auswirkungen auf das differenzierte Bronchialepithel gezeigt. Hier führte die Strahlenexposition zu einer permanenten IL1 $\beta$  Expression, einer reduzierten Permeabilität und beeinträchtigten Selbstreinigung des Epithels.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die NHBE von zwei Spendern untersucht, welche ähnliche biologische Eigenschaften aufwiesen (Alter, ethnische Herkunft, Geschlecht und Gesundheitszustand) und hauptsächlich im Expressionsmuster, dem TEER und der Verdopplungszeit Unterschiede festgestellt. Diese wirkten sich allerdings nicht auf die Funktionalität des Epithels aus. Daher ist es

---

essentiell für Experimente mit neuen Spendern, die individuellen Eigenschaften der NHBE genau zu charakterisieren. Eine weitere zu untersuchende Frage ist, ob zum Beispiel das Spenderalter oder das Rauchverhalten deutlichere Unterschiede bei den NHBE und dem resultierenden Epithel hervorrufen. Ebenso sollte die Auswirkung von Strahlung auf die NHBE von Rauchern untersucht werden, da die Effekte von Rauchen und Strahlung sich nicht additiv, sondern sub-multiplikativ (synergistisch) zu einander verhalten [26], [27].

---

---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] Forum of International Respiratory Societies., *The Global Impact of Respiratory Disease*. 2017.
- [2] H. Wang *et al.*, “Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015,” *The Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1459–1544, Oct. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
- [3] P. Deetjen, “Radon als Heilmittel,” *Wissenschaft und Umwelt*, no. 3, pp. 139–140, 1995.
- [4] A. Franke, L. Reiner, H. G. Pratzel, T. Franke, and K. L. Resch, “Long-term efficacy of radon spa therapy in rheumatoid arthritis—a randomized, sham-controlled study and follow-up,” *Rheumatology*, vol. 39, no. 8, pp. 894–902, Aug. 2000, doi: 10.1093/rheumatology/39.8.894.
- [5] K. Becker, “One century of radon therapy,” *International Journal of Low Radiation*, vol. 1, no. 3, p. 333, 2004, doi: 10.1504/IJLR.2004.005434.
- [6] A. Maier *et al.*, “Radon exposure—therapeutic effect and cancer risk,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 1, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3390/ijms22010316.
- [7] I. Santos, P. Cantista, and C. Vasconcelos, “Balneotherapy in rheumatoid arthritis—a systematic review,” *International Journal of Biometeorology*, vol. 60, no. 8, pp. 1287–1301, Aug. 2016, doi: 10.1007/s00484-015-1108-5.
- [8] S. Darby *et al.*, “Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies,” *British Medical Journal*, vol. 330, no. 7485, pp. 223–226, Jan. 2005, doi: 10.1136/bmj.38308.477650.63.
- [9] E. S. Cheng *et al.*, “Systematic review and meta-analysis of residential radon and lung cancer in never-smokers,” *European Respiratory Review*, vol. 30, no. 159, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1183/16000617.0230-2020.
- [10] D. Krewski *et al.*, “Residential Radon and Risk of Lung Cancer,” *Epidemiology*, vol. 16, no. 2, pp. 137–145, Mar. 2005, doi: 10.1097/01.ede.0000152522.80261.e3.
- [11] D. Laurier, M. Valenty, and M. Tirmarche, “Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies,” *Health Physics*, vol. 81, no. 3, pp. 272–288, Sep. 2001, doi: 10.1097/00004032-200109000-00009.
- [12] J. Schüz and F. Erdmann, “Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview,” *Archives of Medical Research*, vol. 47, no. 8, pp. 607–614, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.arcmed.2016.11.017.
- [13] I. Balásházy, Á. Farkas, B. Gergely Madas, and W. Hofmann, “Non-linear relationship of cell hit and transformation probabilities in a low dose of inhaled radon progenies,” *Journal of Radiological Protection*, vol. 29, no. 2, pp. 147–162, Jun. 2009, doi: 10.1088/0952-4746/29/2/003.

- 
- [14] P. Fűri *et al.*, “The degree of inhomogeneity of the absorbed cell nucleus doses in the bronchial region of the human respiratory tract,” *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 59, no. 1, pp. 173–183, 2020, doi: 10.1007/s00411-019-00814-0.
- [15] J. Mirsch, L. Hintz, A. Maier, C. Fournier, and M. Löbrich, “An Assessment of Radiation Doses From Radon Exposures Using a Mouse Model System,” *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, vol. 108, no. 3, pp. 770–778, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.ijrobp.2020.05.031.
- [16] A. Sakoda, Y. Ishimori, K. Fukao, K. Yamaoka, T. Kataoka, and F. Mitsunobu, “Lung dosimetry of inhaled radon progeny in mice,” *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 51, no. 4, pp. 425–442, 2012, doi: 10.1007/s00411-012-0431-z.
- [17] J. L. McQualter, “Endogenous lung stem cells for lung regeneration,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 19, no. 6, pp. 539–546, 2019, doi: 10.1080/14712598.2019.1596256.
- [18] C. E. Weeden *et al.*, “Lung Basal Stem Cells Rapidly Repair DNA Damage Using the Error-Prone Nonhomologous End-Joining Pathway,” *PLoS Biology*, vol. 15, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1371/journal.pbio.2000731.
- [19] I. O. Gordon, S. Sitterding, A. C. Mackinnon, and A. N. Husain, “Update in Neoplastic Lung Diseases and Mesothelioma,” *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 133, no. 7, pp. 1106–1115, Jul. 2009, doi: 10.5858/133.7.1106.
- [20] B. G. Madas, “Radon induced hyperplasia: Effective adaptation reducing the local doses in the bronchial epithelium,” *Journal of Radiological Protection*, vol. 36, no. 3, pp. 653–666, 2016, doi: 10.1088/0952-4746/36/3/653.
- [21] M. J. O’Sullivan *et al.*, “Irradiation Induces Epithelial Cell Unjamming,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, no. February, p. 21, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00021.
- [22] L. Giuranno *et al.*, “NOTCH signaling promotes the survival of irradiated basal airway stem cells,” *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 317, no. 3, pp. L414–L423, 2019, doi: 10.1152/ajplung.00197.2019.
- [23] L. Giuranno *et al.*, “NOTCH inhibition promotes bronchial stem cell renewal and epithelial barrier integrity after irradiation,” *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 9, no. 7, pp. 799–812, 2020, doi: 10.1002/sctm.19-0278.
- [24] M. K. Paul *et al.*, “Dynamic Changes in Intracellular ROS Levels Regulate Airway Basal Stem Cell Homeostasis through Nrf2-Dependent Notch Signaling,” *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 199–214, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.05.009.
- [25] B. S. Cohen, M. Eisenbud, and N. H. Harley, “Alpha Radioactivity in Cigarette Smoke,” *Radiation Research*, vol. 83, no. 1, p. 190, Jul. 1980, doi: 10.2307/3575269.
- [26] M. Kreuzer, C. Sobotzki, M. Schnelzer, and N. Fenske, “Factors Modifying the Radon-Related Lung Cancer Risk at Low Exposures and Exposure Rates among German Uranium Miners,” *Radiation Research*, vol. 189, no. 2, p. 165, Dec. 2017, doi: 10.1667/RR14889.1.

- 
- [27] J. H. Lubin, "Models for the analysis of radon-exposed populations.," *The Yale journal of biology and medicine*, vol. 61, no. 3, pp. 195–214, 1988.
- [28] A. C. Schamberger, C. A. Staab-Weijnitz, N. Mise-Racek, and O. Eickelberg, "Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface," *Scientific Reports*, vol. 5, Feb. 2015, doi: 10.1038/srep08163.
- [29] A. C. Schamberger *et al.*, "Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor- $\beta$ ," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 50, no. 6, pp. 1040–1052, 2014, doi: 10.1165/rcmb.2013-0090OC.
- [30] M. Aufderheide and M. Emura, "Phenotypical changes in a differentiating immortalized bronchial epithelial cell line after exposure to mainstream cigarette smoke and e-cigarette vapor," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 69, no. 6, pp. 393–401, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.etp.2017.03.004.
- [31] M. Aufderheide, S. Scheffler, S. Ito, S. Ishikawa, and M. Emuraa, "Ciliotoxicity in human primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure at the air-liquid interface with native mainstream smoke of K3R4F cigarettes with and without charcoal filter," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 67, no. 7–8, pp. 407–411, 2015, doi: 10.1016/j.etp.2015.04.006.
- [32] P. R. Sears, W.-N. N. Yin, and L. E. Ostrowski, "Continuous mucociliary transport by primary human airway epithelial cells in vitro," *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 309, no. 2, pp. L99–L108, Jul. 2015, doi: 10.1152/ajplung.00024.2015.
- [33] J. Hussong *et al.*, "Cilia-driven particle and fluid transport over mucus-free mice tracheae," *Journal of Biomechanics*, vol. 46, no. 3, pp. 593–598, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.jbiomech.2012.08.020.
- [34] J. S. Uzeloto *et al.*, "Mucociliary Clearance of Different Respiratory Conditions: A Clinical Study," *International Archives of Otorhinolaryngology*, vol. 25, no. 01, pp. 35–40, Jan. 2021, doi: 10.1055/s-0039-3402495.
- [35] M. K. Khelloufi *et al.*, "Spatiotemporal organization of cilia drives multiscale mucus swirls in model human bronchial epithelium," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20882-4.
- [36] M. Bottier *et al.*, "A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part II, modeling," *PLOS Computational Biology*, vol. 13, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005552.
- [37] M. Bottier *et al.*, "A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part I, experimental analysis," *PLOS Computational Biology*, vol. 13, no. 7, pp. 1–21, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005605.
- [38] C. Leung, S. J. Wadsworth, S. Jasmine Yang, and D. R. Dorscheid, "Structural and functional variations in human bronchial epithelial cells cultured in air-liquid interface using different



- 
- growth media,” *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 318, no. 5, pp. L1063–L1073, 2020, doi: 10.1152/AJPLUNG.00190.2019.
- [39] L. D. Chandrala *et al.*, “A Device for measuring the in-situ response of Human Bronchial Epithelial Cells to airborne environmental agents,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43784-5.
- [40] A. Maier *et al.*, “Experimental setup for radon exposure and first diffusion studies using gamma spectroscopy,” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 362, pp. 187–193, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.nimb.2015.09.042.
- [41] A. Maier *et al.*, “ $\alpha$ -Irradiation setup for primary human cell cultures,” *International Journal of Radiation Biology*, pp. 1–8, Nov. 2019, doi: 10.1080/09553002.2020.1683641.
- [42] D. Bösch, *Lunge und Atemwege*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-28223-2.
- [43] M. Schünke, E. Schulte, and U. Schumacher, *PROMETHEUS Innere Organe*, 5. , übera. Georg Thieme Verlag KG, 2020.
- [44] J. C. Nawroth, A. M. Van Der Does, A. Ryan, and E. Kanso, “Multiscale mechanics of mucociliary clearance in the lung,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 375, no. 1792, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1098/rstb.2019.0160.
- [45] Adivitiya, M. S. Kaushik, S. Chakraborty, S. Veleri, and S. Kateriya, “Mucociliary Respiratory Epithelium Integrity in Molecular Defense and Susceptibility to Pulmonary Viral Infections,” *Biology-Basel*, vol. 10, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.3390/biology10020095.
- [46] C. H. Dean and R. J. Snelgrove, “New Rules for Club Development: New Insights into Human Small Airway Epithelial Club Cell Ontogeny and Function,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 198, no. 11, pp. 1355–1356, Dec. 2018, doi: 10.1164/rccm.201805-0925ED.
- [47] J. Garth, J. W. Barnes, and S. Krick, “Targeting Cytokines as Evolving Treatment Strategies in Chronic Inflammatory Airway Diseases,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.3390/ijms19113402.
- [48] M. Galeas-Pena, N. McLaughlin, and D. Pociask, “The role of the innate immune system on pulmonary infections,” *Biological Chemistry*, vol. 400, no. 4, pp. 443–456, Apr. 2019, doi: 10.1515/hsz-2018-0304.
- [49] R. A. Sheller, M. E. Cuevas, and M. C. Todd, “Comparison of transepithelial resistance measurement techniques: Chopsticks vs. Endohm,” *Biological Procedures Online*, vol. 19, no. 1, pp. 1–5, 2017, doi: 10.1186/s12575-017-0053-6.
- [50] D. Hartl *et al.*, “Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine,” *Journal of Innate Immunity*, vol. 10, no. 5–6, pp. 487–501, 2018, doi: 10.1159/000487057.

- 
- [51] A. E. Tilley, M. S. Walters, R. Shaykhiev, and R. G. Crystal, "Cilia Dysfunction in Lung Disease," *Annual Review of Physiology*, vol. 77, no. 1, pp. 379–406, 2015, doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071931.
- [52] M. Aghapour, P. Raee, S. J. Moghaddam, P. S. Hiemstra, and I. H. Heijink, "Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 58, no. 2, pp. 157–169, Feb. 2018, doi: 10.1165/rcmb.2017-0200TR.
- [53] L. Denney and L.-P. P. Ho, "The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection," *Biomedical Journal*, vol. 41, no. 4, pp. 218–233, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.004>.
- [54] F. Semple and J. R. Dorin, "β-Defensins: Multifunctional Modulators of Infection, Inflammation and More?," *Journal of Innate Immunity*, vol. 4, no. 4, pp. 337–348, 2012, doi: 10.1159/000336619.
- [55] N. C. Di Paolo and D. M. Shayakhmetov, "Interleukin 1α and the inflammatory process," *Nature Immunology*, vol. 17, no. 8, pp. 906–913, Aug. 2016, doi: 10.1038/ni.3503.
- [56] I. Szumiel, "Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: The pivotal role of mitochondria," *International Journal of Radiation Biology*, vol. 91, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2015, doi: 10.3109/09553002.2014.934929.
- [57] V. Boggaram, "Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung," *Clinical Science*, vol. 116, no. 1, pp. 27–35, 2008, doi: 10.1042/CS20080068.
- [58] C. F. Bender Kim *et al.*, "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer," *Cell*, vol. 121, no. 6, pp. 823–835, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.03.032.
- [59] B. L. M. M. Hogan *et al.*, "Repair and regeneration of the respiratory system: Complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 123–138, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.07.012.
- [60] P. Rao Tata and J. Rajagopal, "Plasticity in the lung: Making and breaking cell identity," *Development (Cambridge)*, vol. 144, no. 5, pp. 755–766, 2017. doi: 10.1242/dev.143784.
- [61] D. N. Kotton and E. E. Morrisey, "Lung regeneration: Mechanisms, applications and emerging stem cell populations," *Nature Medicine*, vol. 20, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 822–832, 2014. doi: 10.1038/nm.3642.
- [62] J. Vaart and H. Clevers, "Airway organoids as models of human disease," *Journal of Internal Medicine*, vol. 289, no. 5, pp. 604–613, May 2021, doi: 10.1111/joim.13075.
- [63] J. K. Watson *et al.*, "Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium," *Cell Reports*, vol. 12, no. 1, pp. 90–101, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.011.
- [64] F. J. Hawkins *et al.*, "Derivation of Airway Basal Stem Cells from Human Pluripotent Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 28, no. 1, pp. 79-95.e8, 2021, doi: 10.1016/j.stem.2020.09.017.

- 
- [65] B. B. Cole, R. W. Smith, K. M. Jenkins, B. B. Graham, P. R. Reynolds, and S. D. Reynolds, "Tracheal Basal Cells: A Facultative Progenitor Cell Pool," *The American Journal of Pathology*, vol. 177, no. 1, pp. 362–376, 2010, doi: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090870>.
- [66] J. R. Rock *et al.*, "Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 31, pp. 12771–12775, 2009, doi: 10.1073/pnas.0906850106.
- [67] M. Wolf *et al.*, "Human CC10, the homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning, chromosomal localization and expression in endometrial cell lines," *Human Molecular Genetics*, vol. 1, no. 6, pp. 371–378, 1992, doi: 10.1093/hmg/1.6.371.
- [68] S. J. Bray, "Notch signalling: a simple pathway becomes complex," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 9, pp. 678–689, Sep. 2006, doi: 10.1038/nrm2009.
- [69] J. L. Lasky and H. Wu, "Notch Signaling, Brain Development, and Human Disease," *Pediatric Research*, vol. 57, no. 5 Part 2, pp. 104R-109R, May 2005, doi: 10.1203/01.PDR.0000159632.70510.3D.
- [70] J. C. Aster, W. S. Pear, and S. C. Blacklow, "HHS Public Access," no. Figure 1, pp. 245–275, 2018, doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100127.The.
- [71] N. F. Smirnova, A. C. Schamberger, S. Nayakanti, R. Hatz, J. Behr, and O. Eickelberg, "Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs," *Respiratory Research*, vol. 17, no. 1, Jul. 2016, doi: 10.1186/s12931-016-0404-x.
- [72] J. R. Rock, X. Gao, Y. Xue, S. H. Randell, Y. Y. Kong, and B. L. M. Hogan, "Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 6, pp. 639–648, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.04.003.
- [73] K. A. A. Schilders *et al.*, "Regeneration of the lung: Lung stem cells and the development of lung mimicking devices," *Respiratory Research*, vol. 17, no. 1, p. 44, 2016, doi: 10.1186/s12931-016-0358-z.
- [74] D. Zheng, L. Yin, and J. Chen, "Evidence for Scgb1a1<sup>+</sup> Cells in the Generation of p63<sup>+</sup> Cells in the Damaged Lung Parenchyma," 2014, doi: 10.1165/rcmb.2013-0327OC.
- [75] J. D. Davis and T. P. Wypych, "Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium," *Mucosal Immunology*, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41385-020-00370-7.
- [76] E. I. Azzam, J.-P. Jay-Gerin, and D. Pain, "Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury," *Cancer Letters*, vol. 327, no. 1–2, pp. 48–60, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012.
- [77] C. I. A. Jack, B. Bottier, M. J. Jackson, L. Cassapi, W. D. Fraser, and C. R. K. Hind, "Indicators of free radical activity in patients developing radiation pneumonitis," *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*, vol. 34, no. 1, pp. 149–154, Jan. 1996, doi: 10.1016/0360-3016(95)00209-X.

- 
- [78] W. Zhao and M. Robbins, "Inflammation and Chronic Oxidative Stress in Radiation-Induced Late Normal Tissue Injury: Therapeutic Implications," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 2, pp. 130–143, Jan. 2009, doi: 10.2174/092986709787002790.
- [79] J. Bartkova *et al.*, "The p16-cyclin D/Cdk4-pRb Pathway as a Functional Unit Frequently Altered in Melanoma Pathogenesis," *Cancer Research*, vol. 56, no. 23, pp. 5475–5483, 1996.
- [80] E. Werner, H. Wang, and P. W. Doetsch, "Role of Pro-inflammatory Cytokines in Radiation-Induced Genomic Instability in Human Bronchial Epithelial Cells," *Radiation Research*, vol. 184, no. 6, pp. 621–629, 2015, doi: 10.1667/RR14045.1.
- [81] M. Kasper and G. Haroske, "Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis.," *Histology and histopathology*, vol. 11, no. 2, pp. 463–83, Apr. 1996.
- [82] J. de Aja *et al.*, "Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer," *Journal of Internal Medicine*, vol. 289, no. 5, pp. 629–635, 2021, doi: <https://doi.org/10.1111/joim.13201>.
- [83] S. Hippenstiel, B. Opitz, B. Schmeck, and N. Suttorp, "Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia – molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction," *Respiratory Research*, vol. 7, no. 1, p. 97, Dec. 2006, doi: 10.1186/1465-9921-7-97.
- [84] J. M. Straub, J. New, C. D. Hamilton, C. Lominska, Y. Shnayder, and S. M. Thomas, "Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 141, no. 11, pp. 1985–1994, Nov. 2015, doi: 10.1007/s00432-015-1974-6.
- [85] A. N. Hanania, W. Mainwaring, Y. T. Ghebre, N. A. Hanania, and M. Ludwig, "Radiation-Induced Lung Injury," *Chest*, vol. 156, no. 1, pp. 150–162, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.chest.2019.03.033.
- [86] S. K. Vinod and E. Hau, "Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions," *Respirology*, vol. 25, no. S2, pp. 61–71, Nov. 2020, doi: 10.1111/resp.13870.
- [87] S. D. Deas, N. Huprikar, and A. Skabelund, "Radiation exposure and lung disease in today's nuclear world," *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 167–172, 2017, doi: 10.1097/MCP.0000000000000349.
- [88] O. G. Raabe, "Concerning ionizing radiation-induced cancer from internally deposited radionuclides," *International Journal of Radiation Biology*, vol. 91, no. 10, pp. 810–819, 2015, doi: 10.3109/09553002.2015.1061719.
- [89] M. Lorenzo-González, M. Torres-Durán, R. Barbosa-Lorenzo, M. Provencio-Pulla, J. M. Barros-Dios, and A. Ruano-Ravina, "Radon exposure: a major cause of lung cancer," *Expert Review of Respiratory Medicine*, vol. 13, no. 9, pp. 839–850, 2019, doi: 10.1080/17476348.2019.1645599.
- [90] K. Kamiya *et al.*, "Long-term effects of radiation exposure on health," *The Lancet*, vol. 386, no. 9992, pp. 469–478, 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(15)61167-9.

- 
- [91] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, “Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) 2016 Report,” UN, 2017.
- [92] World Health Organisation, “Indoor Radon a Public Health Perspective,” 2009.
- [93] N. R. Council, *Health Effects of Exposure to Radon: BEIR VI*. Washington, DC: The National Academies Press, 1999. doi: 10.17226/5499.
- [94] N. Hunter *et al.*, “Joint Analysis of Three European Nested Case-control Studies of Lung Cancer among Radon Exposed Miners: Exposure Restricted to Below 300 WLM,” *Health Physics*, vol. 104, no. 3, 2013.
- [95] K. Leuraud *et al.*, “Radon, Smoking and Lung Cancer Risk: Results of a Joint Analysis of Three European Case-Control Studies Among Uranium Miners,” *Radiation Research*, vol. 176, no. 3, pp. 375–387, 2011, doi: 10.1667/RR2377.1.
- [96] J. W. Stather, “Dosimetric and epidemiological approaches to assessing radon doses—can the differences be reconciled?,” *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 112, no. 4, pp. 487–492, Dec. 2004, doi: 10.1093/rpd/nch103.
- [97] F. Papenfuß, “Physikalische Parameter bei der Inkorporation von Radon und seinen Folgeprodukten im Modell und Organismus,” 2021.
- [98] G. M. Kendall and T. J. Smith, “Doses to organs and tissues from radon and its decay products,” *Journal of Radiological Protection*, vol. 22, no. 4, pp. 389–406, Dec. 2002, doi: 10.1088/0952-4746/22/4/304.
- [99] A. Khursheed, “Doses to Systemic Tissues from Radon Gas,” *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 88, no. 2, pp. 171–171, Mar. 2000, doi: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033035.
- [100] I. Bertonecello, “Properties of Adult Lung Stem and Progenitor Cells,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 231, no. 12, pp. 2582–2589, 2016, doi: 10.1002/jcp.25404.
- [101] J. L. Wright, M. Cosio, and A. Churg, “Animal models of chronic obstructive pulmonary disease,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 295, no. 1, pp. L1–L15, Jul. 2008, doi: 10.1152/ajplung.90200.2008.
- [102] S. Lin *et al.*, “Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 48, pp. 17224–17229, Dec. 2014, doi: 10.1073/pnas.1413624111.
- [103] J. R. Rock, S. H. Randell, and B. L. M. Hogan, “Airway basal stem cells: A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling,” *DMM Disease Models and Mechanisms*, vol. 3, no. 9–10, pp. 545–556, Sep. 2010. doi: 10.1242/dmm.006031.
- [104] Junhee Seok *et al.*, “Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 9, pp. 3507–3512, 2013, doi: 10.1073/pnas.1222878110.

- 
- [105] A. J. Ghio, L. A. Dailey, J. M. Soukup, J. Stonehuerner, J. H. Richards, and R. B. Devlin, "Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, no. 1, Jun. 2013, doi: 10.1186/1743-8977-10-25.
- [106] S. Ishikawa, K. Ishimori, and S. Ito, "A 3D epithelial–mesenchymal co-culture model of human bronchial tissue recapitulates multiple features of airway tissue remodeling by TGF- $\beta$ 1 treatment," *Respiratory Research*, vol. 18, no. 1, p. 195, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12931-017-0680-0.
- [107] P. Chandorkar *et al.*, "Fast-track development of an in vitro 3D lung/immune cell model to study Aspergillus infections," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 11644, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11271-4.
- [108] D. Cei *et al.*, "Development of a dynamic in vitro stretch model of the alveolar interface with aerosol delivery," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 118, no. 2, pp. 690–702, Feb. 2021, doi: 10.1002/bit.27600.
- [109] A. Doryab *et al.*, "Evolution of Bioengineered Lung Models: Recent Advances and Challenges in Tissue Mimicry for Studying the Role of Mechanical Forces in Cell Biology," *Advanced Functional Materials*, vol. 29, no. 39, p. 1903114, Sep. 2019, doi: 10.1002/adfm.201903114.
- [110] S. R. Franzdóttir, I. T. Axelsson, A. J. Arason, Ó. Baldursson, T. Gudjonsson, and M. K. Magnusson, "Airway branching morphogenesis in three dimensional culture," *Respiratory Research*, vol. 11, Nov. 2010, doi: 10.1186/1465-9921-11-162.
- [111] J. Choi, E. Ilich, and J. H. Lee, "Organogenesis of adult lung in a dish: Differentiation, disease and therapy," *Developmental Biology*, vol. 420, no. 2. Academic Press Inc., pp. 278–286, Dec. 15, 2016. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.10.002.
- [112] M. Hild and A. B. Jaffe, "Production of 3-D airway organoids from primary human airway basal cells and their use in high-throughput screening," *Current Protocols in Stem Cell Biology*, vol. 2016, no. May, p. IE.9.1-IE.9.15, 2016, doi: 10.1002/cpsc.1.
- [113] M. J. Bissell, P. A. Kenny, and D. C. Radisky, "Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: The role of extracellular matrix and its degrading enzymes," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 70, pp. 343–356, Jan. 2005, doi: 10.1101/sqb.2005.70.013.
- [114] B. R. Dye *et al.*, "In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids," *eLife*, vol. 2015, no. 4, pp. 1–25, 2015, doi: 10.7554/eLife.05098.
- [115] K. Y. G. Choi, B. C. Wu, A. H. Y. Lee, B. Baquir, and R. E. W. Hancock, "Utilizing Organoid and Air-Liquid Interface Models as a Screening Method in the Development of New Host Defense Peptides," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10, no. May, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.00228.

- 
- [116] R. E. Rayner, P. Makena, G. L. Prasad, and E. Cornet-Boyaka, "Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-36735-z.
- [117] A. J. Ross, L. A. Dailey, L. E. Brighton, and R. B. Devlin, "Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 37, no. 2, pp. 169–185, Aug. 2007, doi: 10.1165/rcmb.2006-0466OC.
- [118] C. M. Lederer, J. M. Hollander, and I. Perlman, *Table of isotopes*. 1967.
- [119] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, "Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions," *Bio/Technology*, vol. 11, no. 9, pp. 1026–1030, 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1026.
- [120] A. Turabelidze, S. Guo, and L. A. DiPietro, "Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 18, no. 5, pp. 460–466, Aug. 2010, doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x.
- [121] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, and H. Stein, "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.," *The Journal of Immunology*, vol. 133, no. 4, pp. 1710–1715, 1984.
- [122] T. Zerjatke *et al.*, "Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification," *Cell Reports*, vol. 19, no. 9, pp. 1953–1966, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.022>.
- [123] L. Harris, O. Zalucki, and M. Piper, "BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations," *Journal of Molecular Histology*, vol. 49, no. 3, pp. 229–234, 2018, doi: 10.1007/s10735-018-9761-8.
- [124] A. J. Fischer *et al.*, "Mucus strands from submucosal glands initiate mucociliary transport of large particles," *JCI Insight*, vol. 4, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1172/jci.insight.124863.
- [125] D. Eilenstein, "Bewegungsanalyse von Microsphären auf Zilien-Zellen in fluoreszenzmikroskopischen Videos mittels Videobildverarbeitung," Hochschule Darmstadt, 2021.
- [126] I. Tanida, T. Ueno, and E. Kominami, "LC3 and Autophagy," 2008, pp. 77–88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4\_4.
- [127] M. Mauthe *et al.*, "Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion," *Autophagy*, vol. 14, no. 8, pp. 1435–1455, Aug. 2018, doi: 10.1080/15548627.2018.1474314.
- [128] T. E. Gray, K. Guzman, C. W. Davis, L. H. Abdullah, and P. Nettekheim, "Mucociliary Differentiation of Serially Passaged Normal Human Tracheobronchial Epithelial Cells," 1995.

- 
- [129] X. Yu, C. P. Ng, H. Habacher, and S. Roy, "Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 12, pp. 1445–1453, 2008, doi: 10.1038/ng.263.
- [130] M. Bickel, "The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation.," *Journal of periodontology*, vol. 64, no. 5 Suppl, pp. 456–60, May 1993.
- [131] M. Kolb, P. J. Margetts, D. C. Anthony, F. Pitossi, and J. Gaudie, "Transient expression of IL-1 $\beta$  induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 12, pp. 1529–1536, Jun. 2001, doi: 10.1172/JCI12568.
- [132] C. E. Stewart, E. E. Torr, N. H. Mohd Jamili, C. Bosquillon, and I. Sayers, "Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research," *Journal of Allergy*, vol. 2012, no. di, pp. 1–11, 2012, doi: 10.1155/2012/943982.
- [133] S. C. Faber and S. D. McCullough, "Through the Looking Glass: In Vitro Models for Inhalation Toxicology and Interindividual Variability in the Airway," *Applied In Vitro Toxicology*, vol. 4, no. 2, pp. 115–128, Jun. 2018, doi: 10.1089/aivt.2018.0002.
- [134] A. L. Firth *et al.*, "Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 17, pp. E1723–E1730, Apr. 2014, doi: 10.1073/pnas.1403470111.
- [135] StemCell Technologies, "Document #27134 Modelling CYSTIC Fibrosis Airway - PneumaCult™ -Ex Plus and PneumaCult™-ALI," 2018.
- [136] K. J. Goh, E. K. Tan, H. Lu, S. Roy, and N. R. Dunn, "An NKX2-1GFP and TP63tdTomato dual fluorescent reporter for the investigation of human lung basal cell biology," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 4712, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83825-6.
- [137] M. M. Munye *et al.*, "BMI-1 extends proliferative potential of human bronchial epithelial cells while retaining their mucociliary differentiation capacity," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 312, no. 2, pp. L258–L267, Feb. 2017, doi: 10.1152/ajplung.00471.2016.
- [138] A. J. G. Eric J. Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [139] X. Sun and P. D. Kaufman, "Ki-67: more than a proliferation marker," *Chromosoma*, vol. 127, no. 2, pp. 175–186, Jun. 2018, doi: 10.1007/s00412-018-0659-8.
- [140] X. Sun, A. Bizhanova, T. D. Matheson, J. Yu, L. J. Zhu, and P. D. Kaufman, "Ki-67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 37, no. 17, Sep. 2017, doi: 10.1128/MCB.00569-16.
- [141] M. Themis, E. Garimberti, M. A. Hill, and R. M. Anderson, "Reduced chromosome aberration complexity in normal human bronchial epithelial cells exposed to low-LET  $\gamma$ -rays and high-



- 
- LET  $\alpha$ -particles,” *International Journal of Radiation Biology*, vol. 89, no. 11, pp. 934–943, Nov. 2013, doi: 10.3109/09553002.2013.805889.
- [142] W. Schmidt, K. Merkle, and S. Matschke, “[Calculation of the relative biological efficiency (RBE) of neutron radiation],” *Radiobiologia, radiotherapia*, vol. 31, no. 1, p. 47–52, 1990.
- [143] D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, “Autophagy: cellular and molecular mechanisms,” *The Journal of Pathology*, vol. 221, no. 1, pp. 3–12, May 2010, doi: 10.1002/path.2697.
- [144] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [145] T. Colasanti *et al.*, “Diesel exhaust particles induce autophagy and citrullination in Normal Human Bronchial Epithelial cells,” *Cell Death and Disease*, vol. 9, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.1038/s41419-018-1111-y.
- [146] X. Bao, J. Wu, J. Jiang, A. Tien, N. Sanai, and J. Li, “Quantitative protein expression of blood-brain barrier transporters in the vasculature of brain metastases of patients with lung and breast cancer,” *Clinical and Translational Science*, vol. 14, no. 4, pp. 1265–1271, Jul. 2021, doi: 10.1111/cts.12978.
- [147] H. Ren, N. Birch, and V. Suresh, “An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport,” *PLOS ONE*, vol. 11, p. e0165225, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0165225.
- [148] B. A. Rupnow and S. J. Knox, “The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy,” *Apoptosis*, vol. 4, pp. 115–143, 1999.
- [149] N. Herranz and J. Gil, “Mechanisms and functions of cellular senescence,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, no. 4, pp. 1238–1246, Apr. 2018, doi: 10.1172/JCI95148.
- [150] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The Hallmarks of Cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [151] U. Herbig, W. Wei, A. Dutriaux, W. A. Jobling, and J. M. Sedivy, “Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence,” *Aging Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 295–304, Aug. 2008, doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00067.x.
- [152] S. J. Robles and G. R. Adami, “Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts,” *Oncogene*, vol. 16, no. 9, pp. 1113–1123, Mar. 1998, doi: 10.1038/sj.onc.1201862.
- [153] Y. Kong, H. Cui, C. Ramkumar, and H. Zhang, “Regulation of Senescence in Cancer and Aging,” *Journal of Aging Research*, vol. 2011, pp. 1–15, 2011, doi: 10.4061/2011/963172.
- [154] K. U. Hong, S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B. R. Stripp, “Basal Cells Are a Multipotent Progenitor Capable of Renewing the Bronchial Epithelium,” *The American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 2, pp. 577–588, Feb. 2004, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63147-1.

- 
- [155] D. Sun and L. Buttitta, "States of G0 and the proliferation-quiescence decision in cells, tissues and during development," *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 61, no. 6–7, pp. 357–366, 2017, doi: 10.1387/ijdb.160343LB.
- [156] Y.-Y. Y. Yang, C.-J. J. Lin, C.-C. C. Wang, C.-M. M. Chen, W.-J. J. Kao, and Y.-H. H. Chen, "Consecutive Hypoxia Decreases Expression of NOTCH3, HEY1, CC10, and FOXJ1 via NKX2-1 Downregulation and Intermittent Hypoxia-Reoxygenation Increases Expression of BMP4, NOTCH1, MKI67, OCT4, and MUC5AC via HIF1A Upregulation in Human Bronchial Epithelial C," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, no. September, p. 900, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.572276.
- [157] G. E. Duclos *et al.*, "Characterizing smoking-induced transcriptional heterogeneity in the human bronchial epithelium at single-cell resolution," *Science Advances*, vol. 5, no. 12, p. eaaw3413, Dec. 2019, doi: 10.1126/sciadv.aaw3413.
- [158] I. Azimi, R. M. Petersen, E. W. Thompson, S. J. Roberts-Thomson, and G. R. Monteith, "Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 15140, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15474-7.
- [159] Y. Lin, N. Hoffman, M. Aksoy, M. Muniswamy, and S. Kelsen, "Cigarette Smoke-Induced Reactive Oxygen Species (ROS) Production In Human Airway Epithelial Cells Is Calcium And NADPH-Oxidase (NOX) Dependent," in *c53. COPD Pathogenesis: in vitro and in vivo studies*, May 2012, pp. A4561–A4561. doi: 10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1\_MeetingAbstracts.A4561.
- [160] J. E. Boers, A. W. Ambergen, and F. B. J. M. Thunnissen, "Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 157, no. 6 Pt 1, pp. 2000–6, Jun. 1998, doi: 10.1164/ajrccm.157.6.9707011.
- [161] M. Legendre, L. E. Zaragosi, and H. M. Mitchison, "Motile cilia and airway disease," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 110, no. November, pp. 19–33, 2021, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.11.007.
- [162] D. H. Bowden and F. Baldwin, "Measurement of the thickness of the bronchial epithelium." 1989.
- [163] J. R. Rock and B. L. M. Hogan, "Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 27, pp. 493–512, 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104040.
- [164] D. Zhou, M. Borsa, and A. K. Simon, "Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells," *Aging Cell*, vol. 20, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1111/acel.13316.

- 
- [165] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, and J. J. Hickman, "TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems," *Journal of Laboratory Automation*, vol. 20, no. 2, pp. 107–126, Apr. 2015. doi: 10.1177/2211068214561025.
- [166] L. A. Borthwick, "The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung," *Seminars in Immunopathology*, vol. 38, no. 4, pp. 517–534, Jul. 2016, doi: 10.1007/s00281-016-0559-z.
- [167] W. Liu *et al.*, "Interleukin 1 $\beta$  (IL1B) Signaling is a Critical Component of Radiation-Induced Skin Fibrosis," *Radiation Research*, vol. 165, no. 2, pp. 181–191, Feb. 2006, doi: 10.1667/RR3478.1.
- [168] A. Poghosyan, J. K. Patel, R. L. Clifford, and A. J. Knox, "Epigenetic dysregulation of interleukin 8 (CXCL8) hypersecretion in cystic fibrosis airway epithelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 476, no. 4, pp. 431–437, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.140.
- [169] G. Chen *et al.*, "IL-1 $\beta$  dominates the promucin secretory cytokine profile in cystic fibrosis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 129, no. 10, pp. 4433–4450, 2019, doi: 10.1172/JCI125669.
- [170] G. Yi *et al.*, "A large lung gene expression study identifying IL1B as a novel player in airway inflammation in COPD airway epithelial cells," *Inflammation Research*, vol. 67, no. 6, pp. 539–551, Jun. 2018, doi: 10.1007/s00011-018-1145-8.
- [171] E. T. Osei, C.-A. Brandsma, W. Timens, I. H. Heijink, and T.-L. Hackett, "Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD," *European Respiratory Journal*, vol. 55, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.1183/13993003.00563-2019.
- [172] E. B. Garon, J. Chih-Hsin Yang, and S. M. Dubinett, "The Role of Interleukin 1 $\beta$  in the Pathogenesis of Lung Cancer," *JTO Clinical and Research Reports*, vol. 1, no. 1, p. 100001, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jtocrr.2020.100001.
- [173] H. Ha, B. Debnath, and N. Neamati, "Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases," *Theranostics*, vol. 7, no. 6, pp. 1543–1588, 2017, doi: 10.7150/thno.15625.
- [174] Q. Liu *et al.*, "The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 31, pp. 61–71, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.08.002.
- [175] H. H. Al-Khalaf, H. Ghebeh, S. M. Wakil, F. Al-Mohanna, and A. Aboussekhra, "Interleukin-8 Dedifferentiates Primary Human Luminal Cells to Multipotent Stem Cells," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 40, no. 9, Apr. 2020, doi: 10.1128/MCB.00508-19.
- [176] D. M. Sridharan *et al.*, "Understanding Cancer Development Processes after HZE-Particle Exposure: Roles of ROS, DNA Damage Repair and Inflammation," *Radiation Research*, vol. 183, no. 1, pp. 1–26, Jan. 2015, doi: 10.1667/RR13804.1.

- 
- [177] L. J. Marshall, B. Perks, T. Ferkol, and J. K. Shute, "IL-8 Released Constitutively by Primary Bronchial Epithelial Cells in Culture Forms an Inactive Complex with Secretory Component," *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 5, pp. 2816–2823, Sep. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2816.
- [178] A. A. Pezzulo *et al.*, "The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 300, no. 1, pp. L25–L31, Jan. 2011, doi: 10.1152/ajplung.00256.2010.
- [179] M. Munkholm and J. Mortensen, "Mucociliary clearance: pathophysiological aspects," *Clinical Physiology and Functional Imaging*, vol. 34, no. 3, pp. 171–177, May 2014, doi: 10.1111/cpf.12085.
- [180] P. L. Leopold, M. J. O'Mahony, X. J. Lian, A. E. Tilley, B.-G. Harvey, and R. G. Crystal, "Smoking Is Associated with Shortened Airway Cilia," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 12, p. e8157, Dec. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0008157.
- [181] T. Ogata *et al.*, "Carbon Ion Irradiation Suppresses Metastatic Potential of Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells through the Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signaling Pathway," *Journal of Radiation Research*, vol. 52, no. 3, pp. 374–379, 2011, doi: 10.1269/jrr.10102.
- [182] Y. Demizu, O. Fujii, H. Iwata, and N. Fuwa, "Carbon Ion Therapy for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer," *BioMed Research International*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1155/2014/727962.
- [183] M. S. Shiels *et al.*, "Circulating Inflammation Markers, Risk of Lung Cancer, and Utility for Risk Stratification," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, no. 10, Oct. 2015, doi: 10.1093/jnci/djv199.

## Anhang

### Antikörper

Antigen	Konjugat	Hersteller	Wirtstier	Verdünnung
Anti-Maus	Alexa Fluor® 488	Molecular Probes A24339	Esel	1:300
β-Tubulin IV	Alexa Fluor® 647	Abcam #ab204034	Kaninchen	1:75
KRT5	Alexa Fluor® 488	Abcam #ab193894	Kaninchen	1:240
Ki67	Alexa Fluor® 594	Abcam #ab216709	Kaninchen	1:50
LC3B	Alexa Fluor® 647	Abcam #ab225383	Kaninchen	1:800
MoBU-1 (BrdU)	Alexa Fluor® 647	Invitrogen #B35133	Maus	1:30
MUC5AC	Alexa Fluor® 555	Abcam #ab218714	Kaninchen	1:30
SCGB1A1 (CC10)	Alexa Fluor® 594	Santa Cruz, sc-365992	Kaninchen	1:100
ZO-1	unkonjugiert	BD Biosciences 610966	Maus	1:150

### Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer
CellEvent™ Caspase-3/7 Green ReadyProbes™ Reagent	Invitrogen™	R37111
Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 488 dye	Invitrogen™	C10637
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	Solis Biodyne	083600001
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific	K1691
RNase-free DNase Set	QIAGEN	79254
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	74106

### Medien und Zusätze

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Animal Component-Free Cell Dissociation Kit besteht aus Dissoziations- und Inhibitorlösung	STEMCELL™ Technologies	05426
Heparin Solution	STEMCELL™ Technologies	07980
Hydrocortisone Stock Solution	STEMCELL™ Technologies	07925
PneumaCult™-ALI Medium	STEMCELL™ Technologies	05001
PneumaCult™-Ex Plus Medium	STEMCELL™ Technologies	05040

## Chemikalien

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Albumin Fraktion V	Carl Roth	8076.3
BrdU	Sigma-Aldrich	19-160
Chloroquine(phosphat)	Biomol	Cay14194-25
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth	4984.1
Dithiothreitol	Biomol	04010.5
DMSO	Carl Roth	A994.1
Essigsäure ≥99 %, zur Synthese	Carl Roth	7332.1
Ethanol ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth	9065.5
Fluorescent Mounting Medium	Dako	S3023
Formaldehydlösung ≥37 %, zur Synthese	Carl Roth	7398.1
Glycin	Carl Roth	0079.4
Hoechst-33342	Thermo Scientific	62249
LÖFFLERS Methylenblaulösung	Carl Roth	AE64.3
Methanol, ≥99 %, zur Synthese	Carl Roth	8388.6
Natriumhydroxid	Carl Roth	P031.3
PBS-/-	Life Technologies™	14190-144
PBS+/-	Life Technologies™	14040-091
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich	81845
PureLink™ RNase A	Invitrogen™	12091021
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN	79306
Salzsäure 37 % rauchend	Carl Roth	4625.1
Trypanblau	Merck	T8154
Triton X-100	Fisher Scientific	BP151-100
TWEEN20	Sigma-Aldrich	P7949
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen™	10977049
Ziegenserum	VWR	S2000-100
Zitronensäure	Carl Roth	7624.1

## Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Referenz-Nr.
12 mm Transwell® 0.4 µm Pore Polyester Membrane Insert Platte	Corning	3460
12-Well Platte Standard	Sarstedt	83.3921
Aspirationspipetten (2 mL)	Sarstedt	86.1252.001
Calibration Beads 3 µm (für 488 nm Laser)	Sysmex	05-4008
Deckgläser (rechteckig, 24 x 60 mm)	Carl Roth	H878
Kulturflasche 12,5cm <sup>2</sup> mit Belüftungsdeckel	Falcon®	353107
Kulturflasche 25cm <sup>2</sup> mit Belüftungsdeckel	Falcon®	353108
Kulturflasche 75cm <sup>2</sup> mit Belüftungsdeckel	Falcon®	353136
Kryomatrix	Leica	14020108926
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System	Thermo Scientific™	177429PK
Objektträger SuperFrost® Plus	Thermo Scientific™	J1800AMNZ
PCR-Folie	Sarstedt	8 365PK
PCR Platte (0,3)	Sarstedt	72.1979.202
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Sarstedt	72.735.100
Petrischalen Ø 6 cm	Sarstedt	83.3901
Petrischalen Ø 3,5 cm	Thermo Scientific™	153066
Petrischalen Ø 15 cm	Sarstedt	82.1184.500
Pipettenspitzen (10 µL)	Starlab	S1110-3700
Pipettenspitzen (100-200 µL)	Starlab	S1113-1706
Pipettenspitzen (1000 µL)	Starlab	S1111-6701
Pipettenspitzen low-binding (2,5 µL)	Sarstedt	70.1130.212
Pipettenspitzen low-binding (10 µL)	Starlab	S1181-3710
Pipettenspitzen low-binding (100-200 µL)	Starlab	S1183-1740
Pipettenspitzen low-binding (1000 µL)	Biozym	770400
Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Roth	EA83.1
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Sarstedt	72.691
Reaktionsgefäße (2,0 mL)	Sarstedt	72.691
Serologische Pipetten (2 mL)	Sarstedt	86.1252.001
Serologische Pipetten (5 mL)	Sarstedt	86.1253.001
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt	86.1254.001
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt	86.1685.001
Serologische Pipetten (50 mL)	Sarstedt	86.1256.001

Vials CRYO.STM (2 mL)	Greiner Bio-One	126278
Zählkammern dual TC10	Bio-Rad	145-0011
Zellfilter (35 µm) inkl. Auffanfröhrchen	Corning	352235
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Sarstedt	62.554.502
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Sarstedt	62.547.254

## Geräte

Typ	Hersteller
Axio Imager Z2 Mikroskop	Zeiss
Automatischer Zellzähler TC20™	BioRad
EndOhm-12G	World Precision Instruments
EVOM3 Epithelial Volt/Ohm Meter	World Precision Instruments
Fluoreszenzmikroskop BX61	Olympus
Hybrid-Mikroskop (aufrecht/invers), REVOLVE 3M	VWR
Kryostat CM1860 UV	Leica
Nanophotometer Colibri	Titertek Berthold
PCR Thermal Cycler Peqstar	Peqlab/VWR
Quant Studio 3	Thermo Fisher Scientific
SN4 Dosimeter	PRTW
Röntgenröhre MXR 320 / 26	Comet
Vortexer MS2 Minishaker	IKA
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific™
Zentrifuge Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific™



## Programme

Typ	Hersteller
BD FACSDiva™ software	BD Biosciences
Echo Pro Version 5.3.5	Echo Laboratories
Ersts,P.J.[Internet] DotDotGoose (version 1.5.1)	American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation
Fiji	Open source, contributors: <a href="https://imagej.net/Contributors">https://imagej.net/Contributors</a>
FlowJo	Copyright © Trustees of Leland Stanford Jr. University, 1996-1997
ImageD	OpenSource under the GPL3 licence <a href="https://github.com/DavidEilenstein/ImageD/releases">https://github.com/DavidEilenstein/ImageD/releases</a>
ISIS 5.0 Software	MetaSystems
Metafer 5 Software	MetaSystems
Python Software Foundation	Python Language Reference, version 3.7. <a href="https://www.python.org">https://www.python.org</a>
Quant Studio™ Design & Analysis Software v1.5.1	Thermo Fisher Scientific
Spyder The Scientific Python Development Environment	Version 3.3.6 Copyright © 2009-2019 Spyder Project Contributors <a href="https://www.spyder-ide.org">https://www.spyder-ide.org</a>

## RNA und cDNA zur Erstellung der Standardkurven der verschiedenen Marker

Die totale RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und zur Erstellung der Standardkurven für die qPCR aller Marker mit Ausnahme von IL1 $\beta$  und IL8 verwendet. Für IL1 $\beta$  und IL8 wurde die cDNA einer Asthmatiker Lunge verwendet.

RNA	Hersteller	Referenz-Nr.
Total RNA – Human Adult Normal Tissue 5 Donor Pool: Lung	BioChain	R1234152-P
cDNA – Asthma: Lung	BioChain	#C1236152Ld-1
Human Fetal Lung Poly A+ RNA	TaKaRa	636109

## qRT-PCR Primer für humane Ziel-Gene

Alle Primer wurden von Biomers hergestellt.

Ziel-Gen	Sequenz (5'...3')
FOXJ1_3 (s)	ACTCGTATGCCACGCTCATCTG
FOXJ1_3 (as)	GAGACAGGTTGTGGCGGATTGA
IL1 $\beta$ _1 (s)	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG
IL1 $\beta$ _1 (as)	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
IL8 (s)	GCGCCAACACAGAAATTATTGTAA
IL8 (as)	TTCTTGATACCACAGAGAATGAA
KRT14_4 (s)	TGCCGAGGAATGGTTCTTCACC
KRT14_4 (as)	GCAGCTCAATCTCCAGGTTCTG
KRT5_1 (s)	AGGAATGCAGACTCAGTGGAGAAG
KRT5_1 (as)	TGCCATATCCAGAGGAAACACT
LC3B (s)	GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG
LC3B(as)	GTGTCCGTTCCACCAACAGGAAG
MUC5AC_1 (s)	TGTGAGGGCAACAACGTCAT
MUC5AC_1 (as)	CCATCTTGGTCAGCCACCTT
Nkx2.1_1 (s)	CCTCTGGTGGCTGCCTAAAA
Nkx2.1_1 (as)	ACGCCGATCTTGTTGGATGT
p16_1 (s)	TCCCTCAGAAATGATCGGAAACC
p16_1 (as)	GATGCCTGCTTCTACAAACC
p21_1 (s) 395	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG
p21_1 (as) 396	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
RPLP01 (s)	CCTCGTGAAGTGACATCGT
RPLP01 (as)	CTGTCTTCCCTGGGCATCAC
SCGB1A1 (s)	AAAGCATCATTAAAGCTCATGGAAA
SCGB1A1 (as)	TGGAGCAGTTGGGGATCTTC

## Durchflusszytometrie

Prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen beider Spender zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der 2 Gy Röntgenbestrahlung.

Spender	Dosis	Zeit nach Bestrahlung [h]	Anteil G1 [%]	Anteil S [%]	Anteil G2/M [%]
1	Kontrolle	0	54.0	34.5	9.5
		6	52.4	33.8	12.0
		12	59.2	31.0	9.2
	2 Gy	2	49.3	34.4	14.8
		4	43.4	36.5	18.5
		6	51.6	22.9	23.8
		8	61.4	2.9	35.8
		10	63.7	9.2	25.0
		12	73.2	11.7	12.6
		2	Kontrolle	0	58.3
6	54.6			32.8	10.5
12	58.7			28.8	11.4
2 Gy	2		52.9	30.7	14.3
	4		48.2	30.6	19.4
	6		54.1	27.3	15.6
	8		63.1	6.8	28.4
	10		66.8	8.5	22.8
	12		72.3	13.5	8.6

## C<sub>T</sub> Werte der mRNS Expression von IL1 $\beta$

Die C<sub>T</sub> Werte der mRNS Expression von IL1 $\beta$  wurden mit den C<sub>T</sub> Werten von RPLPO1 normiert und anschließend auf das Niveau der Kontrolle zum Zeitpunkt 7 dpa normiert.

Röntgen	Kontrolle Röntgen	0,5 Gy Röntgen	2,0 Gy Röntgen	SEM Kontrolle Röntgen	SEM 0,5 Gy Röntgen	SEM 2,0 Gy Röntgen
-3 dpa	141,1477	141,1477	141,1477	0,2985	0,2985	0,2985
7 dpa	1,0000	1,1452	5,4198	1,0590	0,1898	1,3412
14 dpa	0,5021	0,4058	1,4666	0,1484	0,0603	0,5719
21 dpa	0,2935	0,3344	1,1017	0,0484	0,0630	0,2504
28 dpa	0,2083	0,1815	1,0882	0,0593	0,0196	0,7551
35 dpa	0,2095	0,1789	0,8858	0,0348	0,0175	0,2693

$\alpha$ -Partikel	Kontrolle $\alpha$ -Partikel	0,25 Gy $\alpha$ -Partikel	0,50 Gy $\alpha$ -Partikel	SEM Kontrolle $\alpha$ -Partikel	SEM 0,25 Gy $\alpha$ -Partikel	SEM 0,50 Gy $\alpha$ -Partikel
-3 dpa	52,2129	52,2129	52,2129	0,3347	0,3347	0,3347
7 dpa	1,0000	1,3639	1,3998	0,3856	0,2121	0,1668
14 dpa	0,3614	0,4824	0,5240	0,0539	0,0830	0,0583
21 dpa	0,2670	0,3278	0,5115	0,0904	0,1128	0,2329
28 dpa	0,1703	0,2804	0,4086	0,0556	0,1391	0,2412
35 dpa	0,2299	0,3337	0,5587	0,0834	0,1894	0,4262

## Mittelwerte der Parameter der Videoanalyse

Dosis	mittlere Geschwindigkeit [µm/s]			Winkelschwindigkeit [Grad/s]			Winkelschwankung [Grad]				
	MW	SD	SEM	MW	SD	SEM	Ausschuss [%]	MW	SD	SEM	
Spender 1	a-Partikel	0,00	36,18	14,77	0,091	0,034	0,014	56	111,91	33,08	13,51
		0,25	19,65	8,02	0,043	0,016	0,007	44	109,53	40,92	16,71
		0,50	17,31	7,07	0,038	0,026	0,011	28	114,28	31,89	13,02
Spender 2	a-Partikel	0,0	39,59	16,16	0,117	0,122	0,050	72	101,94	50,48	20,61
		0,5	26,34	10,75	0,057	0,032	0,013	50	91,34	49,84	20,35
		2,0	18,01	7,35	0,018	0,007	0,003	50	103,66	64,70	26,41
Röntgen	a-Partikel	0,00	56,36	23,01	0,055	0,047	0,019	56	95,13	48,34	19,73
		0,25	23,02	9,40	0,030	0,009	0,004	28	124,66	33,51	13,68
		0,50	18,61	7,60	0,027	0,008	0,003	56	105,71	43,59	17,80
Röntgen	Röntgen	0,0	38,14	15,57	0,066	0,059	0,024	61	108,31	59,59	24,33
		0,5	29,69	12,12	0,026	0,017	0,007	39	98,38	47,15	19,25
		2,0	1,94	1,51	0,62	0,002	0,001	89	20,36	27,93	11,40

---

---

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

---

Name: Kim Carola Röder

Geburtsdatum: 31.08.1991

### Ausbildung

---

05.2018 – 11.2021 **Doktorandin** und Mitglied der HGS-HiRe Graduierten Schule  
am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH in Darmstadt  
über die Technische Universität Darmstadt, Deutschland

09.2017 – 04.2018 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie  
Philipps Universität Marburg in Marburg, Deutschland

10.2014 – 10.2016 **Master of Science in Technischer Biologie**  
Thesis: Charakterisierung pflanzlicher Reduktasen der Monoterpen-  
Indolalkaloid Biosynthese  
Technische Universität Darmstadt in Darmstadt, Deutschland  
10.2015 – 02.2016 **Auslandssemester und Forschungspraktikum**  
am Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences  
Uniwersytet Warszawski (Universität Warschau) in Warschau, Polen

10.2011 – 10.2014 **Bachelor of Science in Biologie**  
Thesis: Molecular Engineering in Nicht-Modellpflanzen  
Technische Universität Darmstadt in Darmstadt, Deutschland

05.2011 **Allgemeine Hochschulreife**  
Eleonorenschule in Darmstadt, Deutschland

### Konferenzbeiträge

---

2020 K. Roeder, D. Eilenstein, M. Scholz, M. Durante, S. Ritter.  
**Effects of  $\alpha$ -particles and X-rays on human lung epithelium** (Vortrag)  
Virtuelle 45. Jahrestagung der European Radiation Research Society

### Zusätzliche Qualifikationen

---

24.06.-05.07.2019 European Training course ADORE (Application of cytogenetic and EPR/OSL  
techniques for biological dosimetry and physical retrospective dosimetry)  
am Bundesamt für Strahlenschutz in München, Deutschland

---

## Danksagung

---

Als erstes möchte ich meiner Doktormutter Dr. Sylvia Ritter für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Im Besonderen für die regelmäßigen Diskussionen und dafür, dass ich mich jederzeit mit Fragen und Ideen an sie wenden konnte.

Meinem Erstgutachter Prof. Dr. Marco Durante und meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Gerhard Thiel danke ich gleichermaßen, dass sie das Amt des Gutachters übernommen haben. Vielen Dank für die kompetente Unterstützung, die neuen Denkanstöße und auch die kritischen Fragen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Alexander Löwer und Prof. Dr. Bodo Laube für die Übernahme des Amtes des Prüfers und die freundliche Unterstützung bei meiner mündlichen Verteidigung der vorliegenden Arbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts GREWIS $\alpha$  (Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung) durchgeführt (Förderungsnummer: 02NUK050A). Daher gilt mein Dank dem BMBF für die finanzielle Unterstützung, sowie dem gesamten GREWIS $\alpha$  Konsortium für die jährlichen Treffen und den fachlichen Austausch.

Auch möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Stem Cell Differentiation and Cytogenetics* für die schöne Zeit im Labor, aber auch außerhalb, danken. Ein großes Danke dafür, dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet. Aber auch der gesamten Abteilung Biophysik möchte ich für die freundliche fachliche, wie auch moralische Unterstützung danken.

Im Besonderen möchte ich mich bei Esther, Timo, Kim, Celine, Tabea, Ellen und allen anderen für die erheiternden Mittags-, Kaffeepausen und den motivierenden fachlichen Austausch bedanken.

Bei Dr. Michael Scholz und David Eilenstein möchte ich mich für die Entwicklung der Analysesoftware ImageD bedanken, die eine Auswertung der unzähligen Videos des mukoziliären Transports ermöglicht hat.

Dr. Andreas Maier, Dr. Franziska Papenfuss und Christoph Hartmann-Sauter möchte ich für die Hilfe bei den vielen Bestrahlungen an der Americium-Quelle danken. Danke, dass ihr für mich und meine kleinen NHBE so flexibel wart.

Mein größter Dank geht an meine Familie, meine Freunde und meine kleine Rotte. Besonders meinen Eltern, meinem Freund Alexander, meiner Cousine Juliane und ihrem Freund Lucas möchte ich für die vielen aufbauenden Gespräche danken, ihr habt mich immer wieder neu motiviert und mir den Rücken gestärkt. Vielen herzlichen Dank, dass ihr mein Leben so bereichert, an mich glaubt und immer für mich da seid.

---

## Abbildungsverzeichnis

---

- Abbildung 1: Die unteren Atemwege des Menschen. Sie beginnen proximal mit der Trachea, welche sich in die Hauptbronchien aufteilt. Die Hauptbronchien teilen sich innerhalb der Lungenflügel weiter in die Bronchien auf, welche distal über die Bronchiolen in die respiratorischen Bronchiolen übergehen und schließlich in den Alveolen enden. .... 8
- Abbildung 2: Morphologie der verschiedenen Epithelien des respiratorischen Traktes des Menschen. Im proximalen Bereich, also in der Trachea, den Hauptbronchien und Bronchien ist das Epithel pseudostratifiziert aufgebaut und besteht zum Hauptteil aus Basalzellen, zilientragenden Zellen, Becher- und Clubzellen. Dieser Aufbau wandelt sich distal in den terminalen und respiratorischen Bronchiolen in eine einschichtige säulenartige Struktur um und der Anteil an Basalzellen sinkt, während der der Clubzellen ansteigt. Mit sinkendem Durchmesser der Bronchien nimmt auch die Dicke der Mukusschicht (ML) ab, welche auf der periziliären Flüssigkeit (PCL) liegt. In den Alveolen wird das Epithel durch die flachere Zellmorphologie der Pneumozyt Typen 1 und 2 (ACT1 und ACT2) dünner [44]-[46]. .... 9
- Abbildung 3: Die drei Hauptbestandteile der Immunabwehr des humanen Bronchialepithels. *Tight junctions* verbinden die Becher- und zilientragenden Zellen fest miteinander und schließen den extrazellulären Raum zum Lungenlumen hin ab. Für die mukoziliäre Reinigung (MCC) werden Muzine von Becher- und Clubzellen sezerniert und bilden die ML des airway surface liquids (ASL). Die ML schwimmt auf der PCL und fängt Fremdkörper ab. Die Zilien der zilientragenden Zellen liegen in der PCL und sorgen für einen Transport der ML. Becher- und Clubzellen sezernieren zudem immunmodulierende Proteine, die verschiedene Immunreaktionen auslöserspezifisch einleiten können ..... 11
- Abbildung 4: Differenzierungsschema der verschiedenen Zelltypen unter homöostatischen und stressinduzierten Bedingungen. Als Hauptdifferenzierungsfaktor wurden die jeweils benötigten NOTCH Konditionen dargestellt. .... 12
- Abbildung 5: Lokalisation der Ursprungszellen für verschiedene Lungenkrebsarten. SCLC: kleinzellige Lungenkarzinome, NSCLC: nicht-kleinzellige Lungenkarzinome. SCLC kann im Bereich der Bronchien auftreten, während NSCLC im gesamten Lungengewebe entstehen kann. .... 14
- Abbildung 6: Zerfallsreihe von Radon (Rn). Der  $\alpha$ -Zerfall von  $^{222}\text{Rn}$  führt zu  $^{218}\text{Po}$  (Polonium), welches wiederum auch durch einen  $\alpha$ -Zerfall zu  $^{214}\text{Pb}$  (Blei) zerfällt.  $^{214}\text{Pb}$  gibt bei seinem Zerfall zu  $^{214}\text{Bi}$  (Bismut)  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlung ab, genau wie der Zerfall von  $^{214}\text{Bi}$  zu  $^{214}\text{Po}$ . Der  $\alpha$ -Zerfall von  $^{214}\text{Po}$  führt zu dem relativ stabilen  $^{210}\text{Pb}$ , es hat eine Halbwertszeit von 22,5 Jahren. An den Pfeilen sind die freiwerdenden Teilchen und die Halbwertszeit des Ausgangsatoms vermerkt. Bei einem  $\beta$ -Zerfall wird neben dem Elektron oder Positron auch  $\gamma$ -Strahlung in Form von Photonen emittiert. .... 16



Abbildung 7: Aufbau der verschiedenen Modelle des Lungenepithels, enthaltene Zelltypen, sowie die wichtigsten Vor- und Nachteile des jeweiligen Modells. ....	18
Abbildung 8: (A) Querschnitt der Konstruktion zum faltenfreien kleben der boPET-Folie in einen $\alpha$ -Ring. Der Kupferring zieht aufgrund der Schwerkraft die Folie glatt, welche mit der behandelten Seite (rot) ins Innere des $\alpha$ -Rings zeigt. (B) Querschnitt des fertigen $\alpha$ -Rings inklusive Zellen. ....	23
Abbildung 9: (A) Schematischer Versuchsaufbau für die Bestrahlung an der Americium-Quelle. (B) Versuchsaufbau mit geöffnetem Shutter und eingelegtem $\alpha$ -Ring. Der $\alpha$ -Ring ist mit einem Petrischalendeckel (Durchmesser 6 cm) abgedeckt, um die NHBE steril zu halten. Durch die boPET-Folie und die Zellen ist die Goldbeschichtung der Americium-Quelle zu sehen.....	24
Abbildung 10: (A) Versuchsaufbau für die Aufnahme der Videos. (B) Stack eines Videos, jede helle Linie (blauer Pfeil) entspricht der Bahn einer Sphäre. Je heller eine Bahn ist, desto öfter ist an dieser Stelle eine Sphäre entlang transportiert worden. Mikrosphären, die sich während der gesamten Aufnahme nicht bewegt haben, sind rot markiert (roter Pfeil).....	34
Abbildung 11: (A) Aufbau der TEER Messung in der EndOhm-12-G Kammer, (B) Schematischer Aufbau für die Messung und Darstellung des elektrischen Flusses über das Epithel im Transwelleinsatz für die Messung des TEERs. ....	35
Abbildung 12: Standardmäßig kultivierte NHBE in Passage 3 im Durchlichtmikroskop. Zu erkennen ist die quaderförmige Morphologie. ....	36
Abbildung 13: Wachstumskurve und die resultierende Wachstumskinetik zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums der NHBE beider Spender in Passage 3. Der Wachstumskoeffizient $k$ für das exponentielle Wachstum ist in dem Graphen der Wachstumskinetik angegeben, er wurde anhand der Steigung der exponentiellen Phase zwischen 48 und 72 h ermittelt. Der Fehlerbalken gibt die SD an. $N=2$ ; $n=4$ .....	37
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung der NHBE in Passage, deutlich sichtbar sind die rotgefärbten Becherzellen zwischen den grüngefärbten Basalzellen. In blau sind die Nuklei gefärbt.....	38
Abbildung 15: Expressionslevel des Nkx2.1 Markers für Einleitung der terminalen Differenzierung in die Zelltypen der Lunge und ihre Plastizität im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). $N=3$ ; $n=3$ .....	39
Abbildung 16: Expressionslevel des KRT5 Markers für Basalzellen im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). $N=4$ ; $n=3$ .....	39
Abbildung 17: Expressionslevel des MUC5AC Markers für Becherzellen im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. $N=4$ ; $n=3$ ; * $\leq p$ 0,05.....	40

Abbildung 18: Expressionslevel des p16 Markers für Seneszenz im Verlauf der Passagen. Gepoolte Daten der NHBE beider Spender. Der Fehlerbalken gibt den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert von Passage 3 gesetzt (blaue Linie). N=4; n=3; * ≤ p 0,05.....	40
Abbildung 19: Überlebenskurve von Spender 1 und 2 nach Röntgenstrahlung und α-Partikel Bestrahlung. Der Fehlerbalken gibt die SD an. N=3; n=3.....	41
Abbildung 20: Apoptose-Index 0-96 h nach Röntgenbestrahlung. Die Daten beider Spender wurden gepoolt. Die Fehlerbalken geben den SEM an., zu Zeitpunkten ohne Fehlerbalken wurde nur eine Messung vorgenommen. N = 1-3, n = 1 .....	42
Abbildung 21: Apoptose-Index 24 h nach Bestrahlung anhand der gepoolten Daten beider Spender. Die Fehlerbalken geben den SEM an. N=2; n=1; * ≤ p 0,05.....	43
Abbildung 22: Proliferations-Index der NHBE von Spender 2 24, 48 und 72 h nach Röntgenbestrahlung. N = 1, n = 1.....	44
Abbildung 23: Vergleich des Proliferations-Indices der NHBE von Spender 1 und 2 zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. N=2; n=1; * ≤ p 0,05; ** ≤ p 0,01 .....	45
Abbildung 24: Zellzyklusprofile der NHBE der beiden Spender 6; 8 und 10 h nach Exposition mit 2 Gy Röntgenstrahlen. Für die Kontrolle wird exemplarisch die Messung 6 h nach der Scheinbestrahlung gezeigt. In Lila ist der Anteil an G1-Phase, in Gelb S-Phase und in Grün G2/M-Phase Zellen markiert. Zu sehen ist die Abnahme des S-Phase Anteils und eine Zunahme des G2/M Anteils bei 6 h, bei 8 h sieht man eine weitere Zunahme des G2/M Anteils, während der Anteil an S-Phase Zellen fast komplett verschwunden ist. Nach 10 h sinkt der G2/M Anteil bereits wieder und der Anteil an Zellen in G1 und S-Phase steigt wieder an. N=1; n=1 .....	46
Abbildung 25: Expressionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 in den undifferenzierten NHBE von Spender 1, 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	47
Abbildung 26: Expressionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 in den undifferenzierten NHBE von Spender 2, 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben en SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	47
Abbildung 27: Expressionslevel des späten Basalzellmarkers KRT5 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	48
Abbildung 28: Expressionslevel des Becherzellmarkers MUC5AC 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller	

Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * ≤ p 0,05.....	49
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von NHBE auf MUC5AC (rot) und KRT5 (grün) mit einer DAPI Kernfärbung (blau). In den linken Abbildungen sind die Anteile an KRT5- und MUC5AC-positiven Zellen 24 h nach 2 Gy Röntgenbestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle der NHBE von Spender 2 in Passage 3 zu sehen. In den rechten Bildern ist nur die MUC5AC Färbung zu sehen, also der Anteil an Becherzellen. ....	50
Abbildung 30: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p16 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	51
Abbildung 31: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p21 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * ≤ p 0,05; ** ≤ p 0,01; *** ≤ p 0,001 .....	51
Abbildung 32: Expressionslevel des Autophagiemarkers LC3B der NHBE von Spender 1 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * ≤ p 0,05; ** ≤ p 0,01 .....	52
Abbildung 33: Expressionslevel des Autophagiemarkers LC3B der NHBE von Spender 2 24 und 120 h nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 24 h gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * ≤ p 0,05.....	53
Abbildung 34: (A) Positivkontrolle für den LC3B Antikörper, die Zellen wurden 24 h mit 50 µM Chloroquin kultiviert. (B) unbehandelte NHBE. In Gelb sind die LC3B-positiven autophagischen Vesikel zu sehen, in blau die DAPI gefärbten Nuklei.....	54
Abbildung 35: Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa inklusive Mukus. (A) Kontrollepithel mit makroskopischer (roter Pfeil) Mukusansammlung (B) Epithel aus 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten NHBE differenziert, zeigt keine Agglomeration von Mukus .....	55
Abbildung 36: Expressionslevel des frühen Basalzellmarkers KRT14 der NHBE von Spender 1 nach α-Bestrahlung. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	56
Abbildung 37: Expressionslevel des späten Basalzellmarkers KRT5 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den	

SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	56
Abbildung 38: Expressionslevel des Becherzellmarkers MUC5AC der NHBE von Spender 1. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * $\leq$ p 0,05.....	57
Abbildung 39: Expressionslevel des Becherzellmarkers MUC5AC von der NHBE von Spender 2. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01 .....	58
Abbildung 40: Expressionslevel des Clubzellmarkers SCGB1A1 der NHBE von Spender 1. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	58
Abbildung 41: Expressionslevel des Clubzellmarkers SCGB1A1 der NHBE von Spender 1. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01 .....	59
Abbildung 42: Expressionslevel des Flimmerepithelmarkers FOXJ1 der NHBE von Spender. Zum Zeitpunkt -3 dpa wurde kein FOXJ1 exprimiert. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01; *** $\leq$ p 0,001	60
Abbildung 43: Expressionslevel des Flimmerepithelmarkers FOXJ1 der NHBE von Spender. Zum Zeitpunkt -3 dpa wurde kein FOXJ1 exprimiert. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01; *** $\leq$ p 0,001	60
Abbildung 44: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p16 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	61
Abbildung 45: Expressionslevel des Seneszenzmarkers p21 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	61

Abbildung 46: Expressionslevel des Autophagiemarkers LC3B der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3 .....	62
Abbildung 47: Expressionslevel des proinflammatorischen Markers IL8 der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist mit dem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3.....	63
Abbildung 48: Expressionslevel des proinflammatorischen Markers IL1 $\beta$ der NHBE, die Daten von beiden Spendern wurden gepoolt, da kein signifikanter interindividueller Unterschied festzustellen war. Die Fehlerbalken geben den SEM an. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle bei 7 dpa gesetzt (pinke Linie). N=3; n=3; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01 .....	64
Abbildung 49: Immunocytochemisch gefärbter Kryoschnitt (4 $\mu$ m) eines 35 dpa Bronchialepithels. Das $\beta$ -Tubulin IV markiert in Gelb die zilientragenden Zellen, MUC5AC in Rot die Becherzellen, SCGB1A1 in Pink die Clubzellen und KRT5 markiert in Grün die Basalzellen welche direkt auf der Membran (grau) des Transwelleinsatzes wachsen. Die Nuklei sind mit DAPI blau gefärbt. ....	64
Abbildung 50: Darstellung der Epitheldicke und Zilienlänge der Bronchialepithelien, welche aus bestrahlten NHBE differenziert wurden, zum Zeitpunkt 35 dpa. Die Fehlerbalken geben den SD an.....	65
Abbildung 51: Zellkomposition der Bronchialepithelien, welche aus unbestrahlten NHBE differenziert wurden, zum Zeitpunkt 35 dpa. Die Fehlerbalken geben den SD an. ....	66
Abbildung 52: Mittlere Geschwindigkeit des MCT der aus NHBE differenzierten Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa. N=3; n=6; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01; *** $\leq$ p 0,001 .....	67
Abbildung 53: Lineare Regression der mittleren Geschwindigkeit des MCT über die MW und den SEM zum Zeitpunkt 35 dpa. N=3; n=6; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01; *** $\leq$ p 0,001 .....	67
Abbildung 54: Winkelgeschwindigkeit des MCT der aus NHBE differenzierten Epithelien zum Zeitpunkt 35 dpa. N=3; n=6; * $\leq$ p 0,05; ** $\leq$ p 0,01; *** $\leq$ p 0,001 .....	68
Abbildung 55: Relativer TEER der aus den NHBE der beiden Spender differenzierten Bronchialepithelien zum Zeitpunkt 35 dpa. Die Linien verbinden die Mittelwerte der gemessenen Werte. Die Expression wurde in Relation zum Wert der Kontrolle gesetzt (pinke Linie). N=3; n=4; * $\leq$ p 0,05 .....	69
Abbildung 56: Bronchialepithel in ALI Kultur 35 dpa (4 $\mu$ m Kryoschnitt) gefärbt auf den <i>tight junction</i> Marker ZO-1 (grün) und die mit DAPI gegengefärbten Nuklei (blau). An der apikalen Seite des	

---

Epithels ist das ZO-1 lokalisiert, innerhalb des Epithels sind grün fluoreszierende Artefakte deutlich zu erkennen..... 70

Abbildung 57: Schematische Zusammenfassung der Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Partikel induzierten Veränderungen der NHBE. Auf der linken Seite sind die Strahleneffekte der undifferenzierten NHBE zu sehen. Eine Strahlenexposition inhibiert die Proliferation, induziert eine p21-vermittelte Seneszenz und die Differenzierung der Basalzellen in Becherzellen wird gefördert, sowie einen transienten G2/M-Arrest. Mittig bei der Differenzierung der Nachkommen der bestrahlten NHBE in ein Bronchialepithel führt die ionisierende Strahlung zu einer Dysregulation der Differenzierung durch vermehrte Expression des Becherzellmarkers MUC5AC und verspäteter Expression von FOXJ1, dem Marker für zilientragende Zellen. Rechts sind die Auswirkungen auf das differenzierte Bronchialepithel gezeigt. Hier führte die Strahlenexposition zu einer permanenten IL1 $\beta$  Expression, einer reduzierten Permeabilität und beeinträchtigten Selbstreinigung des Epithels. .... 85

---

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Eigenschaften der Spender und der NHBE (aus dem Analysezertifikat von Lonza).....	20
Tabelle 2: Verwendete Kulturgefäße für die Überlebenskurve mit verschiedenen Strahlenqualitäten .....	25
Tabelle 3: Dosen und Zellzahlen für die unterschiedlichen Strahlenqualitäten .....	26
Tabelle 4: Zusammensetzung der 1×Methylenblau Lösung in Millipore Wasser .....	26
Tabelle 5: PRC Programm.....	29
Tabelle 6: Zusammensetzung der Blocklösung in PBS -/-.....	30
Tabelle 7: Konjugierte Antikörper für die immunzytochemische Analyse. ....	31
Tabelle 8: Zusammensetzung des EdU Reaktionsmixes für eine Probe. Die Substanzen müssen in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert werden und die fertige Mixtur muss innerhalb von 15 min verwendet werden. Das finale Volumen beträgt 500 µl. ....	32

---

## Abkürzungen

---

°C	Celsius
ACF	Tierkomponenten-frei
ACT 1/2	Pneumozyt Typ 1/2 ( <i>alveolar cell type</i> )
ALI	<i>Air-Liquid-Interface</i>
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
CBF	Zilienschlagfrequenz
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankheit
C <sub>T</sub>	Zyklus Schwellenwert ( <i>cycle threshold</i> )
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DSB	Doppelstrangbruch
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpa	Tage nach dem <i>Airlift</i>
DTT	Dithiothreitol
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridin
EtOH	Ethanol
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL8	Interleukin 8
FOXJ1	<i>Forkhead box protein J1</i>
g	Erdbeschleunigung
Gy	Gray
h	Stunde
J	Joule
Ki67	Antigen KI-67
KRT5	Keratin 5
KRT14	Keratin 14
LC3B	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B</i>
LET	Linearer Energietransfer
M	Mol
MCC	mukoziliäre Reinigung ( <i>mucociliary clearance</i> )
MCT	mukoziliarer Transport ( <i>mucociliary transport</i> )
mFISH	Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization



min	Minute
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MUC5AC	Muzin 5AC
MUC5B	Muzin 5B
MW	Mittelwert
NHBE	Normale humane bronchiale Epithelzellen
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung
Nkx2.1	NK2 homeobox 1, auch <i>thyroid transcription factor 1</i> (TTF1)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer)
p16	Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor 2A
p21	Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor 1
PBS -/-	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium und Magnesium
PBS +/-	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Calcium und Magnesium
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> Polymerase Kettenreaktion
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SCGB1A1	<i>secretoglobin family 1A member 1</i> , auch Uteroglobulin genannt
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (small cell lung cancer)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Sv	Sievert
TP63	Tumorprotein 63
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen